

Ensayos

Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas

Zahaed Evangelista Martínez¹, Evangelina E. Quiñones Aguilar², Gabriel Rincón Enríquez².

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC. ¹Unidad Sureste, ²Unidad Zapopan.

Recibido: 17-02-2017 Aceptado: 30-06-2017

Resumen

Las actinobacterias son microorganismos que participan activamente en la descomposición de la materia orgánica de los suelos. La importancia de estas bacterias radica en que algunas especies producen metabolitos bioactivos empleados en el tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos. El presente estudio tuvo la finalidad de aislar actinobacterias del suelo y evaluar su capacidad para producir compuestos que tengan el potencial para combatir microorganismos fitopatógenos que causan enfermedades a plantas de interés comercial. A las cepas aisladas se les determinó la actividad inhibitoria contra bacterias y hongos patógenos, así como la producción de enzimas hidrolíticas. Mediante experimentos *in vitro* se detectaron aislados que inhibieron a las bacterias *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas syringae*; sólo un aislado inhibió a los tres patógenos. Algunos de estos aislados también inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Phytophthora capsici*. Veinticuatro de las actinobacterias aisladas presentaron actividades enzimáticas de quitinasa, xilanasa y celulasa. Los resultados mostrados dan una perspectiva interesante sobre el potencial biotecnológico que presentan las actinobacterias nativas de México en el desarrollo de nuevos productos que sean empleados para el control biológico de las enfermedades que afectan a los cultivos de importancia para la alimentación.

Palabras clave: Streptomyces, metabolitos secundarios, antifúngico, fitopatógeno, control biológico

Abstract

Actinobacteria are soil microorganisms that play an important role in the decomposition of organic matter of soils. These bacteria are of great importance as some species produce bioactive metabolites used in the treatment of diseases produced by pathogenic microorganisms. The present study aims to isolate soil actinobacteria and evaluate their potential to produce compounds to fight against phytopathogenic microorganisms which cause diseases in crops. The antimicrobial activity against bacterial and fungal pathogens, and the ability to produce hydrolytic enzymes was assessed. *In vitro* experiments were carried out to detect inhibitory isolates over *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus pumilus* and *Pseudomonas syringae*; only one isolate inhibited the three pathogens. Additionally, some isolates inhibited the growth of *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Phytophthora capsici*. Twenty-four actinobacteria isolates exhibited chitinase, xylanase, and cellulase activities. The above results provide an interesting perspective on the biotechnological potential of actinobacteria of Mexican soils for the development of new products that could be used for the biocontrol of microbial diseases of food crops.

Keywords: Streptomyces, secondary metabolites, antifungal, phytopathogen, biological control

Résumé

Les actinobactéries sont des microorganismes qui participent activement à la décomposition de la matière organique des sols. L'importance de ces bactéries vient du fait que certaines espèces produisent des métabolites bioactifs utilisés pour le traitement de maladies provoquées par des microorganismes pathogènes. La présente étude a eu comme objectif d'isoler les actinobactéries du sol et d'évaluer leur capacité à produire des composés ayant le potentiel de combattre les microorganismes phytopathogènes qui causent des maladies à des plantes d'intérêt commercial. On a trouvé chez les souches isolées une activité inhibitoire contre les bactéries et les champignons pathogènes ainsi que la production d'enzymes hydrolytiques. Au moyen d'expériences *in vitro* on a détecté des souches isolées qui ont inhibé les bactéries *Pectobacterium carotovorum*, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas syringae*; seulement une souche a inhibé les 3 pathogènes. Certaines de ces souches ont également inhibé la croissance des champignons phytopathogènes *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Phytophthora capsici*. 24 des actinobactéries isolées ont présenté des activités enzymatiques de chitinase, xylanase et cellulase. Les résultats obtenus donnent une perspective intéressante sur le potentiel biotechnologique que présentent les actinobactéries natives du Mexique dans le développement de nouveaux produits employés pour le contrôle biologique des maladies qui affectent les cultures importantes pour l'alimentation.

Mots-clés: Streptomyces, métabolites secondaires, antifongique, phytopathogène, contrôle biologique.

Introducción

Las actinobacterias pertenecen a un grupo de bacterias muy diverso que se encuentran distribuidas en distintos ambientes en los cuales desempeñan una función ecológica importante descomponiendo la materia orgánica del suelo. Estas bacterias se describen como microorganismos Gram positivos, en su mayoría aerobias, algunos grupos presentan desarrollo y crecimiento unicelular, aunque un buen número de especies presentan crecimiento miceliar filamentoso formado por hifas enramadas no septadas. En el caso del género *Streptomyces*, el micelio filamentoso se diferencia en micelio aéreo que puede ser de los tipos: a) Rectiflexible, micelio que presente la cadena de esporas recta o ligeramente curva; b) Retinaculiaperti, micelio recto con la cadena de esporas en forma de gancho o asas abiertas; c) Espiral, micelio que presenta la cadena de esporas en espirales que pueden ir de estar abiertos a completamente cerrados (Figura 1). En algunas ocasiones las esporas pueden ser empleadas para la clasificación taxonómica de las especies tomando en cuenta la presencia y tipo de ornamentaciones externas y la forma (esférica, cilíndrica u oval) (Li, Chen, Jiang, Jiang, 2016). La apariencia de la colonia es otra característica que contribuye con la identificación genérica y descripción de la especie de interés, entre las cuales tenemos la forma, coloración, aspecto (rugoso, liso, polvoso), consistencia (rígida, fragmentada), producción de pigmentos, entre otras características que suelen ser importantes para una clasificación y manejo de las cepas (Van Hop,

Sakiyama, Binh, Otoguro, Han, Miyadoh, Luong, Ando, 2011; Figura 2).

Desde el punto de vista biotecnológico, la importancia de este grupo de bacterias radica en su capacidad para producir moléculas con aplicaciones en medicina, agricultura y veterinaria. Sin lugar a dudas el aspecto más estudiado se refiere a la producción de antibióticos y otras moléculas bioactivas; de los más de 10,000 compuestos catalogados, poco más de 7,600 provienen de especies del género *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Estos datos indican que las bacterias del grupo de los actinomicetos (principalmente del Orden *Actinomycetales*) son el principal grupo de organismos productores de metabolitos, con el género *Streptomyces* a la cabeza y detrás especies de los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptovermicillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium*. Un metabolito secundario muy fácil de reconocer por la mayoría de las personas, es aquel que le confiere al suelo el olor característico a tierra mojada durante un día lluvioso, este metabolito llamado geosmina es sintetizado por un buen número de especies de estreptomicetos en las cuales cumple funciones fisiológicas durante el proceso de diferenciación celular (Schöller, Gürtler, Pedersen, Molin, Wilkins, 2002). Además de la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, también se les reconoce por producir diversas enzimas extracelulares como las lipasas, fosfolipasas, nucleasas, proteasas, amilasas, quitinasas, lignina-hidrolasas, celulasas, entre otras (Chaudhary, Soni, Shrivastava, Shrivastava, 2013).

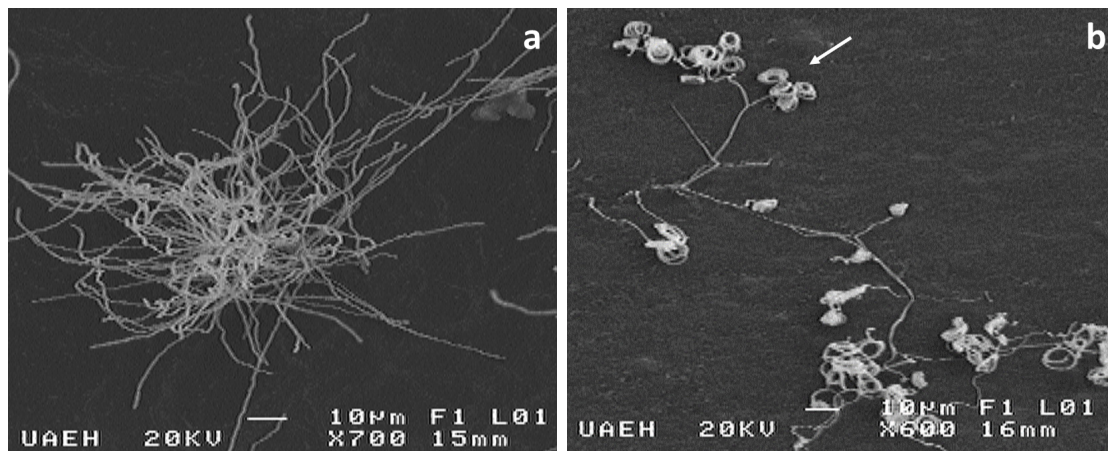


Figura 1. Desarrollo de micelio aéreo y producción de esporas de dos especies del género *Streptomyces*. a) Cadena de esporas tipo rectiflexibles; b) Cadena de esporas tipo espiral (→). Microfotografías tomadas con Microscopio Electrónico de Barrido Joel France, Model 6300 (Dr. Zahaed Evangelista-Martínez y Dr. Juan Hernández-Ávila de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo).

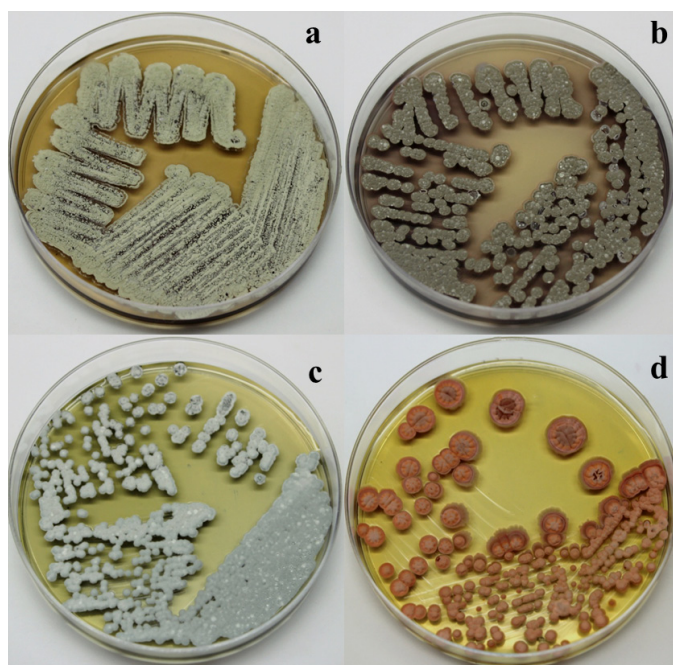


Figura 2. Diferencias morfológicas entre las Actinobacterias aisladas creciendo en medio agar ISP2 durante 21 días. a) ACT-55; b) ACT-2; c) ACT-26; d) ACT-28.

Las especies del género *Streptomyces* se distribuyen ampliamente en el suelo y agua, en el primer caso se han aislado desde suelos considerados moderados hasta suelos ácidos y alcalinos, pasando por suelos halófilos, suelos de la Antártida, suelos marinos y lacustres; del agua se han aislado de ríos y mares de diferentes regiones del mundo (Srivibool y Sukchotiratana, 2006; Hoang, Lee, Tseng, Chu, 2007; Ghorbani-Nasrabadi, Greiner, Alikhani, Hamed, Yakhchali, 2013; Gebreyohannes, Moges, Sahile, Raja, 2013; Cheah, Lee, Chieng, Wong, 2015; Garcia-Bernal, Campa-Córdova, Saucedo, Casanova-Gonzalez, Medina-Marrero, Mazón-Suástegui, 2015). La principal razón por la que se llevan a cabo estudios en diversos ambientes, refleja la intensa búsqueda científica por encontrar moléculas con estructuras químicas novedosas que puedan tener nuevas aplicaciones (Ling, Schneider, Peoples, Spoering, Engels, Conlon, Mueller, Schäberle, Hughes, Epstein, Jones, Lazarides, Steadman, Cohen, Felix, Fetterman, Millett, Nitti, Zullo, Chen, Lewis, 2015). En la actualidad, estas investigaciones se están enfocando a aislar nuevas especies de ambientes terrestres extremos y ambientes marinos de manera simultánea a estrategias de recuperación de nuevas especies aplicando tratamientos físicos y químicos a las muestras de suelo previo a la inoculación en los medios selectivos de aislamiento (Basilio, González,

Vicente, Gorrochategui, Cabello, González, Geniloud, 2003; Tiwari y Gupta, 2013). Considerando lo antes expuesto, el presente estudio tuvo la finalidad de aislar actinobacterias de suelos de campos de cultivo de Chile localizados en el Estado de Aguascalientes y evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos de plantas. Aunado a lo anterior, se determinó la actividad enzimática extracelular de las cepas aisladas, tomando en cuenta la participación que se ha documentado de las enzimas quitinasas, celulasas y proteinasas como factores importantes en el control biológico de organismos fitopatógenos. Con esta información, se podrá vislumbrar el potencial de este grupo de bacterias para investigaciones futuras encaminadas al estudio de los mecanismos que participan en la proliferación de los microorganismos patógenos y poder desarrollar un producto que pueda ser aplicado para el control biológico de las enfermedades que afectan a los cultivos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Los muestreos de suelos se realizaron en campos de cultivo donde se siembran y rotan plantas de vid, frijol y chile de diferentes variedades, localizados en el municipio de Cosío en el Estado de Aguascalientes.

En estos campos de cultivo se tienen antecedentes de problemas severos de marchitez en chile serrano provocados por *Phytophthora capsici*. En total se obtuvieron ocho muestras de suelo de rizósfera y una más obtenida del Cerro del Muerto ubicado en el Municipio Jesús María, las cuales fueron mantenidas a temperatura ambiente y transportadas el mismo día al laboratorio (Tabla 1). Las muestras fueron procesadas durante las primeras 72 horas posteriores a su obtención.

Microorganismos patógenos

Las bacterias que se emplearon fueron *Bacillus pumilus* y *Pectobacterium carotovorum* mantenidos en agar nutritivo, mientras que *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (PspH) en agar King. Las dos primeras fueron aisladas de plantas de agave y la tercera de plantas de frijol. Los hongos fitopatógenos para los experimentos de antagonismo fueron *Fusarium* sp. CDBB:1172 (Colección Nacional del CINVESTAV-IPN), *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium* sp. 1326, *F. solani* y *Phytophthora capsici*, mantenidos en agar papa dextrosa (PDA DIFCO®). Exceptuando a la cepa de *Fusarium* sp CDBB:1172, todas las demás cepas son patógenos que pertenecen al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Unidad Zapopan del

CIATEJ que fueron aislados de distintas plantas enfermas, las dos primeras de plantas de tomate, la cepa 1326 de tallo de maíz y las últimas dos especies de plantas de chile serrano.

Aislamiento de actinobacterias

Los medios de cultivo empleados fueron Agar Glicerol para Aislamiento de Actinomicetos (AIA-DIFCO®), y agar International Streptomyces Project No. 2 y 3 (Shirling y Gottlieb, 1966). Todos los medios se complementaron con 50 µg/ml de ciclohexamida (Sigma-Aldrich® No. 18079) y 12.5 µg/ml de ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich® No. N4382). Las muestras de suelo recibieron un tratamiento térmico a 80° C por 30 minutos de acuerdo a lo mencionado por Takahashi y Omura (2003). Posteriormente, 10 gr de suelo se mezclaron con 90 ml de agua destilada estéril y se agitaron por espacio de 1 hr a 100 rpm. Se prepararon en agua destilada estéril diluciones seriales hasta 1×10^{-4} ; 0.1 ml de cada dilución se distribuyó en placas Petri con medios de cultivo. Las placas inoculadas se incubaron a 29° C por 4-5 semanas (Evangelista-Martínez, 2014a). Las colonias que emergieron fueron seleccionadas de acuerdo a los rasgos morfológicos distintivos del grupo (Holt, Krieg, Sneath, Staley, Williams, 2000). Las colonias

Tabla 1. Actinobacterias aisladas de diferentes suelos del Estado de Aguascalientes diferenciadas con base en las características morfológicas de las colonias.

Muestra*	Tipo de cultivo	ACT aislados por medio de cultivo ⁺			Aislados viables [§]	Localización (UTM)
		ISP2	ISP3	AIA		
S1	Rotación de chile-maíz	5	-	1	3	14 Q 190890 2437085
S2	Chile ancho y húngaro; rotación con parras y vid	10	1	-	10	13 Q 779312 2475683
S3	Rotación de chile, maíz y frijol	5	-	-	5	“
S4	Rotación de chile pasilla y frijol	2	-	1	3	“
S5	Parcela donde sólo se ha cultivado alfalfa	4	-	-	3	“
S6	Cultivo de chile pasilla	5	2	1	6	13 Q 780003 2475419
S7	Rotación de chile-frijol, frijol-vid y chile-vid	8	-	6	10	13 Q 781572 2477325
S8	Cultivo de frijol	10	2	2	11	“
SCM	Suelo rizosférico de mezquite del Cerro del Muerto	7	3	1	7	13 Q 773769 2424090

* S1 al S8 corresponden a suelos rizosféricos de parcelas de cultivo; SCM, Cerro del Muerto. ⁺ El número de actinobacterias (ACT) registradas se obtuvo por selección de colonias con rasgos morfológicos diferentes entre ellas. [§] La viabilidad de los aislados se determinó haciendo una resiembra en medio de cultivo agar IPS2 seis meses posterior al aislamiento primario.

se transfirieron al agar ISP2 en repetidas ocasiones hasta obtener cultivos puros; las esporas y el micelio de cada aislamiento se preservaron en glicerol al 20 % (v/v) a - 20 °C. Para la realización de las distintas evaluaciones de actividad biológica, para cada cepa se preparó un inóculo general (IG) de esporas o micelio en glicerol al 20 % (v/v) para tener una suspensión final de concentración 1.0×10^8 esporas/ml.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Las actinobacterias aisladas se crecieron en placas Petri con agar ISP2 y se mantuvieron por 14 días a 29 °C. Posteriormente, las placas con los cultivos se colocaron de manera invertida por 30 minutos dentro de una cámara sellada que contenía cloroformo y enseguida de cada una se tomaron discos de agar de 0.6 mm de diámetro (Singh, Sharma, Talukdar, 2014). Los discos fueron depositados sobre las placas Petri inoculadas con las distintas bacterias. Esta evaluación de actividad antibacteriana se realizó por el método del disco de agar, de acuerdo al método de la CLSI (2012). Las suspensiones con las bacterias se prepararon en caldo nutritivo o caldo King, a partir de un cultivo crecido por 18 horas, para tener una concentración final de 1×10^6 UFC/ml. Posteriormente, 0.1 ml de la suspensión bacteriana se dispersó en placas de medio de cultivo para cada especie y una vez que se absorbió el cultivo se colocaron los discos de agar mencionados previamente. Las placas Petri se incubaron a 37 °C y después de 24 horas se midió el diámetro del halo de inhibición. Los experimentos se realizaron por triplicado en todos los casos.

Efecto inhibitorio contra los hongos fitopatógenos

El efecto inhibitorio de las actinobacterias sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos se realizó sobre placas Petri con medio de agar nutritivo (AN) (Evangelista-Martínez, 2014a-b). Cerca del borde de la placa Petri se inocularon 2 µl de la suspensión de esporas del IG y enseguida se depositó un bloque de agar PDA de 0.4 X 0.4 cm cubierto completamente con el micelio activo del hongo en crecimiento. Las placas se mantuvieron por 7 días a 29 °C y posteriormente a este periodo de tiempo se midió el crecimiento del micelio del hongo en dirección a la colonia de la actinobacteria. El porcentaje de inhibición (PI) se de-

terminó de acuerdo a la fórmula: $PI (\%) = FR - AR/FR \times 100$, en donde FR representa el radio de crecimiento del hongo (mm) del cultivo control y AR representa el radio de la distancia del crecimiento del hongo en dirección de la colonia de las actinobacterias (mm). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática extracelular de quitinasa, celulasa y xilanasa se realizó empleando el medio base ISP9 (HiMedia®) complementado con 1 % (p/v) de quitina de cáscara de camarón (Sigma-Aldrich® No. C7170), carboximetil celulosa sódica (Sigma-Aldrich® No. 419273) y xilano de abedul (Sigma-Aldrich® No. X4252), respectivamente. 2 µl del IG se depositaron al centro de las placas y mantuvieron por 8 días a 29 °C. La actividad enzimática se detectó empleando la solución de yoduro de la tinción Gram (Kasana, Salwan, Dhar, Dutt, Gulati, 2008). El Índice Enzimático (IE) de cada cepa se obtuvo a partir de la relación “diámetro del halo de hidrólisis/diámetro de la colonia”. Todos los resultados de esta sección fueron realizados por duplicados (Evangelista-Martínez, 2014b)

Bioautografía por cromatografía en capa fina

La actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios producidos por una cepa seleccionada se llevó a cabo mediante un experimento de bioautografía (Dewanjeea, Gangopadhyayb, Bhattacharyaa, Khanraa, Duaa, 2015). Inicialmente, 20 µl del IG se inoculó al centro de un filtro Durapore® de 0.45 µm y 47 mm de diámetro (HVL04700), que previamente fue colocado sobre una placa Petri con agar del medio de cultivo ISP2. Cinco placas en condiciones similares se mantuvieron por un periodo de 14 días a 29 °C. Posteriormente, las membranas con el crecimiento celular fueron retiradas y el agar se maceró en metanol, manteniendo esta mezcla por espacio de 24 horas a 4 °C. Transcurrido este periodo, la mezcla se filtró con papel Whatman® No. 1 y la solución recuperada se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos para descartar el resto del agar. La solución obtenida se mantuvo a - 20 °C hasta su análisis. Para la bioautografía, la solución con actividad biológica fue separada por cromatografía de capa fina en una matriz de gel de sílica de

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las Actinobacterias aisladas.

Suelo	ACT	Halo de inhibición (mm)		
		<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
S1	1	- / -	11.53 ± 0.57	- / -
S2	4	- / -	- / -	16.76 ± 0.46
	10	- / -	13.83 ± 0.25	13.01 ± 1.24
	12	- / -	8.64 ± 0.37	9.32 ± 0.54
	13	- / -	16.16 ± 0.71	20.09 ± 0.70
S3	15	- / -	12.04 ± 0.45	- / -
S5	23	- / -	16.04 ± 0.51	14.27 ± 0.37
	24	11.73 ± 0.60	- / -	- / -
S6	29	11.01 ± 0.35	- / -	- / -
	30	- / -	10.73 ± 0.39	- / -
	32	- / -	9.70 ± 0.52	9.03 ± 0.76
S8	46	- / -	12.68 ± 0.87	- / -
	48	- / -	12.18 ± 0.25	13.86 ± 0.21
	49	- / -	8.35 ± 0.73	11.90 ± 0.47
	51	- / -	10.78 ± 0.68	- / -
	52	- / -	10.29 ±	11.05 ± 0.93
SCM	55	- / -	9.46 ± 0.58	- / -
	56	- / -	24.03 ± 0.88	15.60 ± 0.66
	58	17.94 ± 0.35	17.17 ± 0.44	16.80 ± 0.26
	59	- / -	8.73 ± 0.60	- / -
	61	20.60 ± 0.72	- / -	- / -
	Kan*	12.31 ± 0.17	9.95 ± 0.10	11.70 ± 0.13

* Kanamicina 5 µg de antibiótico en disco de papel filtro de 0.6 mm de diámetro

10 X 10 cm (Sigma-Aldrich® No. Z193291), mediante dos condiciones: butanol:ácido acético:agua (6:4:1) y diclorometano:acetato de etilo (20:80). Al terminar la cromatografía, la placa se colocó en una campana de extracción para eliminar el exceso del solvente y posteriormente depositarla dentro de una placa Petri con agar agua como base. Enseguida se agregó sobre la superficie de la placa cromatográfica una mezcla de 5 ml de agar al 0.6 % + 1 ml de células de *P. carotovorum* (1 X 10⁶ UFC/ml), preparadas como se describió previamente. Después de la solidificación de la mezcla, la placa Petri se mantuvo por 24 horas a 37 °C. La actividad biológica de los metabolitos secundarios producidos por la cepa analizada, se determinó agregando 4 ml de una solución al 0.5 % (p/v) de 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich® No. T8877) a la placa Petri e incubándola por 2 horas a 37

°C. La zona de inhibición del crecimiento del microorganismo se detectó por la formación de una zona no coloreada en el sitio donde se ubican los metabolitos secundarios con actividad inhibitoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 9 muestras de suelo de rizósfera de las cuales se lograron aislar en total 75 cepas de actinobacterias, de las cuales la mayor parte se aislaron en el medio de cultivo ISP2 con 56 cepas, seguido de los medios de cultivo AIA e ISP3 con 12 y 8, respectivamente (Tabla 1). Seis meses después de que se mantuvieron preservadas las actinobacterias aisladas, cada una fue sembrada en medio IPS2 con la finalidad de determinar su viabilidad; sólo 58 aislados se lograron recuperar y con estas se realizó el resto del estudio. La diversidad de todas las colonias aisladas se realizó mediante la observación de los

caracteres morfológicos en el medio de cultivo ISP2 de una manera sencilla en la mayoría de los aislados. Sin embargo, en algunos casos se analizaron otros caracteres fenotípicos de las colonias como son la forma, borde, superficie, presencia de pigmentos excretados al medio de cultivo y otros rasgos con los cuales se pudo diferenciar entre aislados con características muy similares (Figura 3).

La actividad antimicrobiana de las actinobacterias es un rasgo distintivo del grupo y parte importante para determinar su potencial como productores de nuevos metabolitos secundarios con actividad biológica, es evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos. Un mayor número de las actinobacterias aisladas mostró actividad inhibitoria contra las bacterias *P. carotovorum* y *B.*

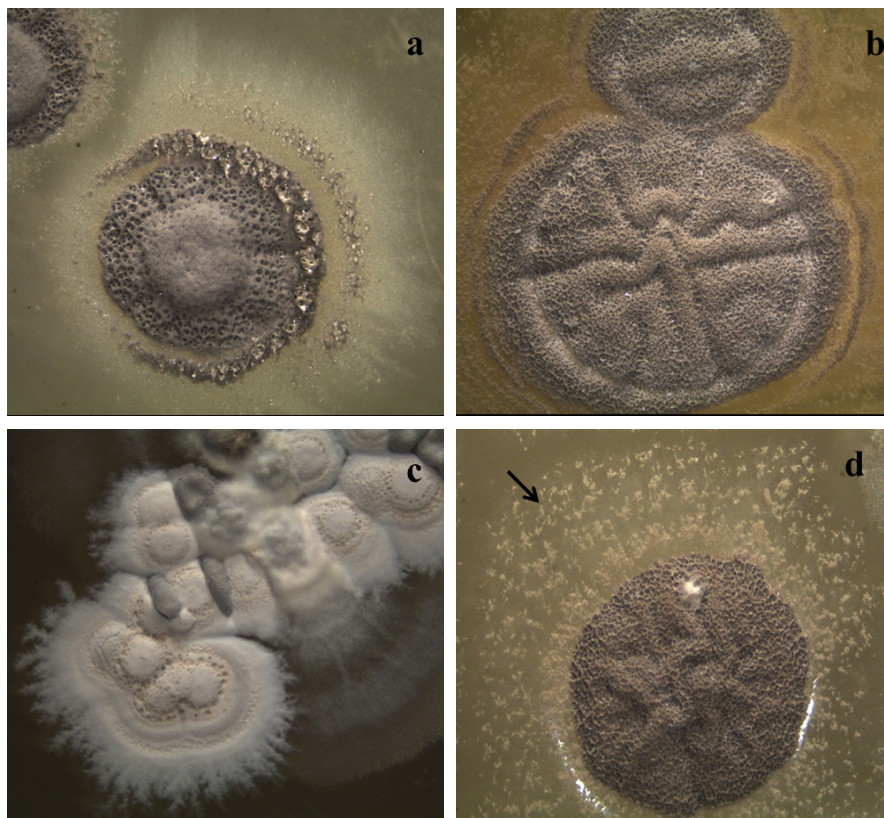


Figura 3. Diferencias morfológicas de Actinobacterias. a) Colonia crateriforme, superficie acuminada y borde ondulado con anillos concéntricos, micelio aéreo y esporas de color gris; b) Colonia rugosa con superficie umbilicada y borde ondulado con anillos concéntricos, micelio aéreo con esporas de color gris; c) Colonia rizoide con superficie convexa y anillos concéntricos, borde filamentosos y esporas entre color blanco y azul claro; d) Colonia crateriforme con superficie papilada, anillos concéntricos de micelio muy fragmentado (→), micelio aéreo con esporas de color gris oscuro.

pumilus que contra *P. syringae*. Los aislados ACT-13, 23, 56 y 58, y ACT-4, 13, 56 y 58 inhibieron más activamente a las dos primeras bacterias, mientras que ACT-24, 29, 58 y 61 lo fueron para la segunda (Tabla 2). Es importante notar que solamente un aislado (ACT-58) inhibió el crecimiento de las tres bacterias patógenas (Figura 4). Para confirmar que la actividad inhibitoria obtenida se debe a la excreción de metabolitos secundarios, se realizó un experimento de bioautografía con los metabolitos producidos por la cepa ACT-56. En la Fig. 5 se muestra

la actividad antibacteriana contra *P. carotovorum* de los metabolitos secundarios, que se observa como áreas o zonas claras sobre la placa de cromatografía que se distinguen de las zonas en rojo que se asocian a la reducción enzimática del TTC para la formación de formazán, asociado a la viabilidad celular (Moussa, Tayel, Al-Hassan, Farouk, 2013). Con estos resultados es evidente que la inhibición del crecimiento bacteriano si está asociada a los metabolitos secundarios producidos por ACT-56, y que quedan confirmados al utilizar dos sistemas de solventes de

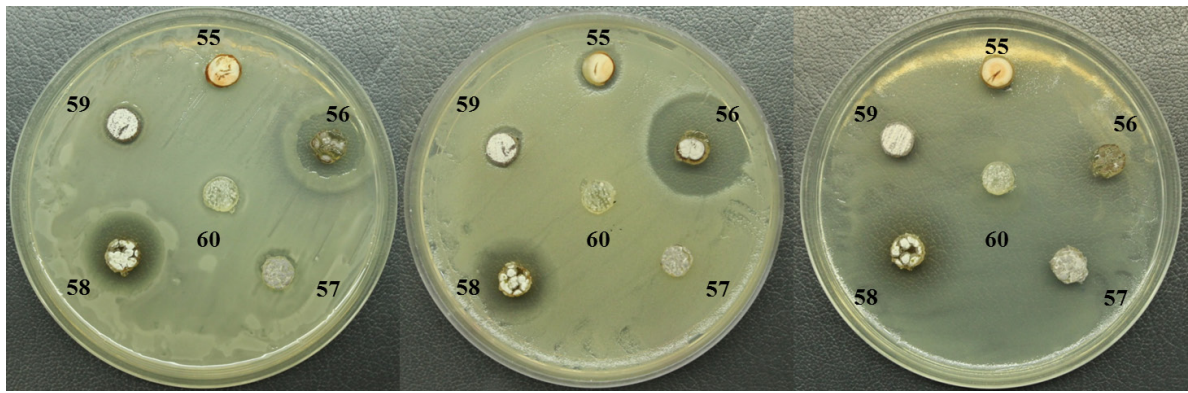


Figura 4. Actividad antibacteriana de diferentes cepas de actinobacterias (ACT) contra: a) *Pectobacterium carotovorum*, b) *Bacillus pumilus*; c) *Pseudomonas syringae* de izquierda a derecha.

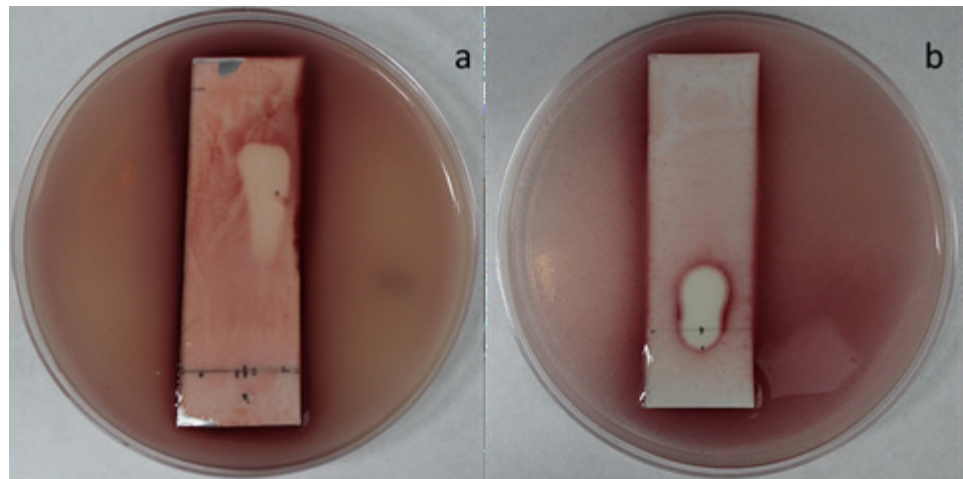


Figura 5. Bioautografía con los metabolitos producidos por la cepa ACT-56 contra *Pectobacterium carotovorum*. Cromatografía en capa fina usando el sistema de solventes a) butanol:ácido acético:agua (6:4:1) y b) diclorometano:acetato de etilo (20:80).

diferente polaridad para la separación cromatográfica de los metabolitos (Fig. 5a y 5b).

En cuanto a la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos por las actinobacterias, con los experimentos de confrontación se detectaron 24 cepas con actividad antagonista (Fig. 6). Trece aislados inhibieron el crecimiento de tres o más hongos patógenos con porcentajes por arriba del 25 %; los aislados ACT-4, 9, 12, 16, 25, 29 y 46 inhibieron el crecimiento de cinco de los seis hongos de prueba (Tabla 3). Evidencia de estudios previos muestran que especies del género *Streptomyces* presentan la capacidad de antagonizar el crecimiento de diversos hongos patógenos de plantas de los géneros *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* y *Alternaria* (Evangelista-Martínez, 2014a; Evangelista-Martínez, 2014b).

La producción de compuestos bioactivos en las actinobacterias es un proceso ligado a su metabolismo secundario, que ha sido estudiado con mayor profundidad en especies del género *Streptomyces*. Este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la diferenciación morfológica, en el cual la síntesis de los metabolitos se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria, por lo que muestran elementos comunes de regulación génica (Liu, 2013). Dentro del amplio y heterogéneo abanico de metabolitos secundarios producidos por el género son muchos los que tienen aplicaciones industriales, destacando los antibióticos por sus extensas aplicaciones clínicas contra bacterias y hongos patógenos. La naturaleza química de los compuestos producidos y su aplicación en diversos campos de la medicina ha sido ampliamente discutida (Evangelista-Martínez y Moreno-Enríquez, 2007). El mejor ejemplo

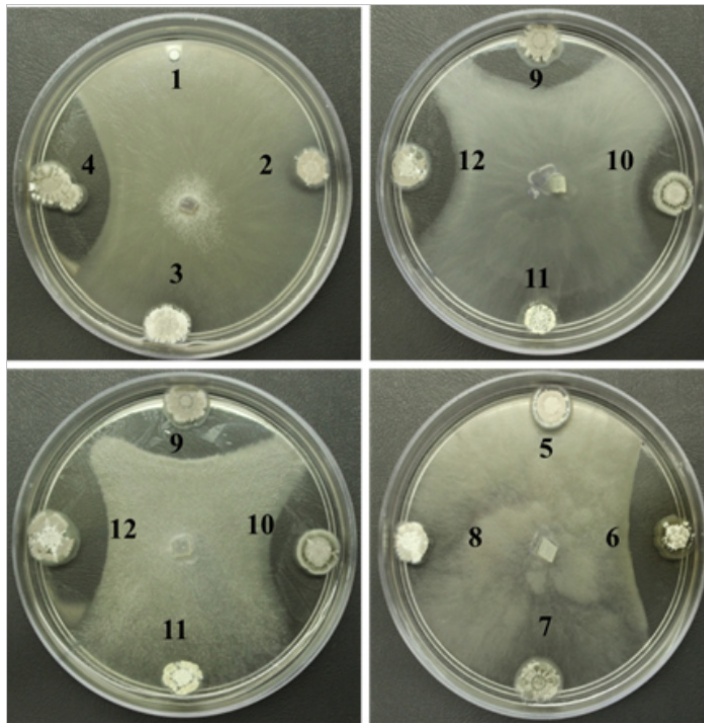


Figura 6. Actividad antagonista de diferentes cepas de actinobacterias (ACT) contra: a, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; b, *Fusarium solani*; c, *Fusarium* sp. CDBB:1172; d, *Phytophthora capsici*.

Tabla 3. Efecto antagonista de Actinobacterias contra hongos patógenos de plantas

Suelo	ACT	Porcentaje de inhibición					
		<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Fusarium</i> sp. CDBB:1172	<i>F. solani</i>	<i>Fusarium</i> sp. P-44
S2	4	-	30.5 ± 1.7	27.6 ± 2.7	51.2 ± 1.4	38.7 ± 1.5	52.3 ± 0.9
	6	41.0 ± 1.6	-	-	-	35.8 ± 2.3	-
	7	-	-	-	56.6 ± 3.0	43.3 ± 2.8	53.1 ± 3.8
	9	-	25.4 ± 2.4	34.2 ± 2.6	48.2 ± 1.6	43.6 ± 2.1	46.6 ± 1.9
	10	-	-	28.5 ± 0.5	46.8 ± 0.5	41.6 ± 1.8	51.0 ± 2.8
	12	-	24.5 ± 1.8	35.6 ± 1.6	48.6 ± 3.3	46.7 ± 1.3	49.3 ± 1.1
S3	13	-	-	36.3 ± 1.8	47.9 ± 0.9	42.3 ± 3.0	45.8 ± 1.9
	16	-	26.5 ± 2.0	28.4 ± 2.4	42.1 ± 3.1	46.5 ± 2.1	45.7 ± 1.5
S4	17	37.1 ± 1.8	-	-	33.1 ± 1.2	-	-
	20	-	-	-	50.2 ± 1.3	37.1 ± 1.0	34.7 ± 1.4
S5	23	34.5 ± 2.4	-	-	-	-	-
	24	33.0 ± 1.4	-	-	-	-	-
S6	25	48.0 ± 1.7	36.3 ± 1.8	-	38.1 ± 3.2	35.3 ± 2.7	36.3 ± 1.7
	29	35.1 ± 1.0	24.4 ± 2.0	22.9 ± 1.7	29.9 ± 2.4	29.9 ± 1.6	34.8 ± 2.6
S7	38	-	-	37.3 ± 3.3	-	-	59.8 ± 2.6
S8	45	-	-	-	38.1 ± 2.4	-	25.7 ± 3.0
	46	35.5 ± 1.0	-	27.4 ± 2.1	57.0 ± 2.3	35.7 ± 1.9	50.5 ± 2.5
	47	-	-	-	37.6 ± 2.8	-	-
	49	-	-	28.3 ± 2.1	46.5 ± 0.8	44.0 ± 2.0	49.7 ± 0.8
	50	-	-	-	-	-	37.0 ± 2.5
SF	54	33.1 ± 1.2	-	-	34.0 ± 2.7	35.8 ± 2.7	-
	55	37.3 ± 2.2	-	-	-	-	-
	57	20.7 ± 2.2	-	-	-	23.6 ± 1.6	-
	58	27.9 ± 2.8	-	-	-	22.7 ± 2.8	-

de la expectativa económica de estos compuestos nos lo dan los policétidos, un grupo de compuestos que pertenecen a una de las clases más relevantes de productos naturales, que una vez que fueron formuladas como drogas han superado las ganancias por arriba de los 55 billones de dólares en ventas al año (Demain y Sánchez, 2009).

Los actinomicetos juegan un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica de origen vegetal y animal, y por tanto en la biodisponibilidad de los nutrientes al ambiente. Esta actividad la llevan a cabo mediante la producción de un gran número de enzimas hidrolíticas extracelulares del tipo proteasas, nucleasas, lipasas, fosfolipasas, amilasas, quitinasas, lignina-hidrolasas, celulasas, pectinasas, entre muchas otras.

La determinación de la actividad enzimática extracelular de quitinasa, celulasa y xilanasa de las actinobacterias aisladas se llevó a cabo mediante ensayos en placas Petri con medio de cultivo complementado con los respectivos sustratos. De las actinobacterias aisladas, 24 presentaron la capacidad de expresar las tres actividades enzimáticas. El Índice Enzimático (IE) como un indicador del potencial productor de las enzimas por parte de los aislados mostró un

valor mayor a 2, lo cual indica un muy buen nivel de actividad enzimática extracelular (Fig. 7). De las tres actividades enzimáticas evaluadas las que sobresalen por presentar un IE mayor a 4.0 fueron la de quitinasa (ACT-4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 17, 25, 46 y 53), seguida de la actividad de xilanasa (ACT-6, 7, 12, 13, 15, 17 y 46). La actividad de celulasa extracelular con un IE mayor a 4 sólo se observó en cuatro cepas (ACT-6, 12, 13 y 17). Lo más sobresaliente de estos resultados es que cuatro actinobacterias expresaron las tres actividades enzimáticas con un IE mayor a 4.0 (ACT-10, 12, 13 y 17). Estos resultados demuestran el potencial que tienen estas bacterias de expresar extracelularmente enzimas hidrolíticas que pueden tener aplicaciones importantes para diversas industrias. Por ejemplo, una enzima hidrolítica que puede ayudar a reducir el sabor amargo del jugo de toronja es la naringinasa que se había reportado su existencia en hongos y algunas bacterias, pero que se detectó la actividad enzimática por primera vez en estreptomicetos (Caraveo, Medina, Rodríguez-Buenfil, Montalvo-Romero, Evangelista-Martínez, 2014). El mayor número de estudios sobre enzimas extracelulares lo encabezan las especies del género *Streptomyces*, principalmente porque a las enzimas quitinolíticas se les ha atribuido un papel

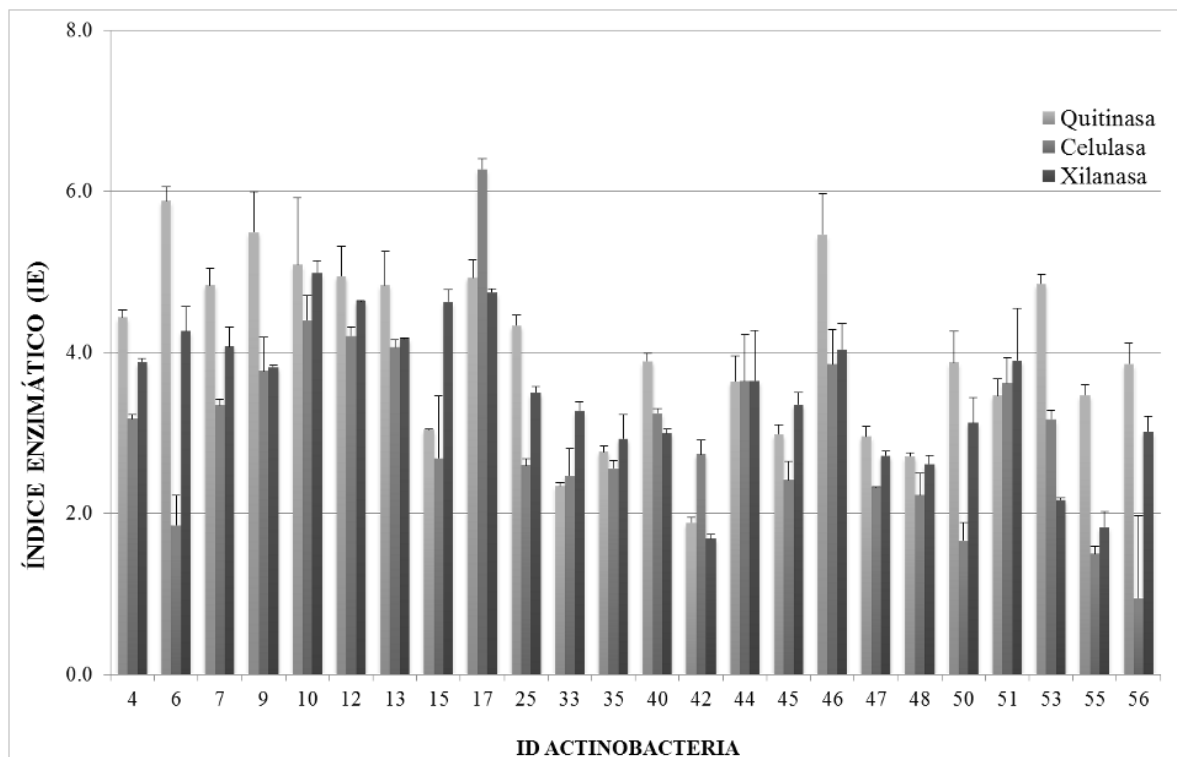


Figura 7. Índice Enzimático (IE) para las enzimas quitinasa, celulasa y xilanasa de las Actinobacterias aisladas.

importante en el control de hongos patógenos (Joo, 2005; Brzezinska, Jankiewicz, Burkowska, Walczak, 2014). Estas enzimas hidrolíticas también tienen posibles aplicaciones, tanto en la investigación básica como en cuestiones aplicadas; por ejemplo, estas enzimas pueden ser usadas para la generación de protoplastos de hongos para estudios de Biología Celular o pueden incluirse en preparaciones de gotas que se usan en oftalmología (Dahiya, Tewari, Hoondal, 2006).

Conclusiones

Los suelos a partir de los que se aislaron las cepas de actinobacterias, nativas de suelos de México, se localizan en campos de cultivo de chile serrano en Aguascalientes México, los cuales de manera recurrente han presentado problemas de infestaciones con especies de hongos patógenos, principalmente de la especie *Phytophthora capsici*. Las características morfológicas de las actinobacterias fue el principal rasgo fenotípico empleado para la selección de los diferentes aislados. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los diferentes aislados fue el principal rasgo usado para esta caracterización inicial de las distintas cepas aisladas, algunas mostraron un espectro de acción más amplio sobre los microorganismos patógenos. Por ejemplo, ACT-61 resultó ser una cepa que solamente inhibió el crecimiento del patógeno *Pseudomonas syringae* con un excelente efecto sobre la formación del halo inhibitorio. Esta cepa pudiera ser un excelente candidato para buscar su uso en el control de esta bacteria patógena que presenta diversos mecanismos de patogenicidad que causan daños severos en los cultivos de frijol. En cuanto al antagonismo contra el crecimiento de los hongos, la cepa ACT-29 mostró una actividad antagonista contra todos los hongos evaluados. Estos resultados muestran cepas con muy buenas condiciones para poder ser empleadas, ya sea de manera individual o bien, ser usados en combinación para la elaboración de una formulación que ayude al control de enfermedades que afectan cultivos como jitomate, frijol y maíz.

El resultado mostrado con la bioautografía fue muy importante porque mostró que en buena medida la actividad inhibitoria puede ser atribuida a la producción de metabolitos con actividad

antimicrobiana, mismos que pudieran ser empleados para el desarrollo de nuevos productos.

La prolífica producción enzimática extracelular en todas las cepas analizadas también fue muy importante, de manera que se puede sugerir un papel secundario, pero no menos importante en los procesos de inhibición del crecimiento microbiano. Desde otro punto de vista, la detección de cepas productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares amplía el potencial biotecnológico de estas cepas, toda vez que su producción puede ser importante para su uso en la rama de los alimentos, salud y remediación de la contaminación.

Agradecimientos

Al Fondo Mixto del Gobierno del Estado de Aguascalientes-CONACYT por su apoyo al proyecto "AGS-2011-C02-181930. Al Dr. Juan Hernández Ávila del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por su apoyo en el uso del microscopio electrónico de barrido.

Bibliografía

- Basilio, A., González, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A., Geniloud, O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 95. 814 - 823.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Antibiotics*. Vol. 58: 1 - 26.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., Burkowska, A., Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology*. Vol. 68. 71 - 81.
- Caraveo, L., Medina, H., Rodríguez-Buenfil, I., Montalvo-Romero, C., Evangelista-Martínez, Z. (2014). A simple plate-assay for screening extracellular naringinase produced by streptomycetes. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 102. 8 - 11.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 3. S83 - S94.

- Cheah, Y., Lee, L., Chieng, C., Wong, V. (2015). Isolation, identification and screening of actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the antarctic) for antimicrobial metabolites. *Polish Polar Research*. Vol. 36. 67 - 78.
- CLSI. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 71. 773 - 782.
- Demain, A.L., Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. Vol. 62. 5 - 16.
- Dewanjeea, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharyaa, N., Khanraa, R., Duaa, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Vol. 5. 75 - 84.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014a). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as a potential biological control agent against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 30. 1639 - 1647.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014b). Isolation of soil actinomycete species from a mesophyll mountain forest and their potential to antagonize fungal pathogens. *British Microbiology Research Journal*. Vol. 4. 272 - 281.
- Evangelista-Martínez, Z., Moreno-Enríquez, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología*. Vol. 11. 37 - 50.
- García-Bernal, M., Campa-Córdova, A. I., Saucedo, P. E., Casanova-Gonzalez, M., Medina-Marrero, R., Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary World*. Vol. 8. 170 - 176.
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., Raja, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 3. 426 - 435.
- Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H. A., Hamed, J., Yakhchali, B. (2013). Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. Vol. 13. 223 - 236.
- Hoang, K. C., Lee, C. Y., Tseng, M. C., W. S. (2007). Polyester-degrading actinomycetes isolated from the Touchien River of Taiwan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 23. 201 - 205.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Joo, J. G. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*. Vol. 27. 1483 - 1486.
- Kasana. R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*. Vol. 57. 503 - 507.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Edited by Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang. India: InTech. Chapter 3. 59 - 86.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., Chen, C., Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. Vol. 517. 455 - 459.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 77. 112 - 143.
- Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., Farouk, A. (2013). Tetrazolium/Formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan

- antimicrobial activity. *Journal of Mycology*. Vol. 2013. Article ID 753692.
- Schöller, C. E. G., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S., Wilkins, K. (2002). Volatile metabolites from actinomycetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. 2615 – 2621.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Bacteriology*. Vol. 16, 313 - 340.
- Singh, L. S., Sharma, H., Talukdar, N. C. (2014). Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. *BMC Microbiology*. Vol. 14. ID 278.
- Srivibool, R., Sukchotiratana, M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soil: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. Vol. 23, 493 - 499.
- Takahashi, Y., Omura, S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of General and Applied Microbiology*. Vol. 49. 141 – 154.
- Tiwari, K., Gupta, R. K. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 39. 256 – 294.
- Van Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C. T. T., Otoguro, M., Hang, D. T., Miyadoh, S., Luong, D. T., Ando, K. (2011). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of Antibiotics*. Vol. 64, 599–606.