

AISLAMIENTO Y BÚSQUEDA DE ACTINOBACTERIAS DEL SUELO PRODUCTORAS DE ENZIMAS EXTRACELULARES Y COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

ISOLATION AND SCREENING OF SOIL ACTINOBACTERIA PRODUCERS OF EXTRACELLULAR ENZYMES AND COMPOUNDS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY.

Héctor Manuel Medina Cuevas y Zahaed Evangelista Martínez^{1*}

Fecha de recepción 14 de octubre del 2010

Fecha de aceptación 10 de diciembre del 2010

RESUMEN

Las actinobacterias son un grupo de bacterias trascendente en la ecología del suelo porque llevan a cabo la función de reciclar la materia orgánica acumulada. Asimismo, son microorganismos importantes por la capacidad de producir una amplia gama de enzimas extracelulares y una gran variedad de metabolitos secundarios. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar actinobacterias de muestras de suelo de la Reserva de la Biósfera Los Petenes y probar su capacidad para producir compuestos con actividad antimicrobiana y producción de algunas enzimas extracelulares. De tres muestras de suelo tomadas del Centro de Investigación y Vida Silvestre Hampolol se aislaron 59 cepas de actinobacterias, de las cuales se caracterizaron 20. La mayoría de ellas presentaron actividad enzimática extracelular en placa del tipo proteasa y en orden descendente otras cepas presentaron actividad de arparaginasa, lipasa y naringinasa. De las 20 cepas probadas, 18 de ellas presentaron actividad contra bacterias y hongos patógenos. Estos resultados sugieren que los actinomicetos aislados pueden ser un recurso genético que debe

ser aprovechado industrialmente; asimismo el estudio ha generado nuevo conocimiento sobre la existencia de estos microorganismos en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

PALABRAS CLAVE: Actinobacterias, los petenes, actividad antimicrobiana, enzimas extracelulares .

ABSTRACT

The Actinobacteria are a group of important bacteria for the soil ecology because they carried out the function of recycling the organic compounds. Moreover, they are important microorganisms by the ability of produce a broad spectrum of extracellular enzymes and secondary metabolites. The goals of this project were isolate and characterize Actinobacteria from the soil of Los Petenes Biosphere Reserve and evaluate the production of antimicrobial compounds and extracellular enzymes. From three soil samples of the Centro de Investigación y Vida Silvestre-Hampolol fifty nine Actinobacteria strains were isolated, of

¹ Dr. en C. Investigador CIATEJ, AC Unidad Sureste. Calle 30 No. 151 X 7 y 7A. Col. García Ginerés. Mérida, Yucatán. C.P. 97070. México. Tel. 999-9202671

*Autor para correspondencia: zevangelista@ciatej.net.mx

which 20 were studied in a detail. Most of them exhibited extracellular protease activity in plate followed by asparaginase, lipase and naringinase activity. Eighteen strains had activity against pathogenic bacteria and fungi. These preliminary results suggest that the isolated actinobacteria could be a genetic resource susceptible of industrial exploitation, furthermore the present project had been generated new knowledge about the existence of this group of micro-organisms and new species in the area of Los Petenes Reserve.

KEY WORDS: Actinobacteria, los petenes, antimicrobial activity, extracellular enzymes.

INTRODUCCIÓN

La ecología microbiana se enfoca al estudio de la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas en los ambientes naturales y ambientes creados por el hombre. Desde hace algunos años se sabe que la mayoría de especies microbianas no crecen en el laboratorio, por lo que los estudios sobre la biodiversidad y biogeografía de los microorganismos de distintos ambientes ofrecen un gran potencial para descubrir nuevos productos naturales (Clark, 1996).

Las actinobacterias son un grupo importante de bacterias saprófitas y de crecimiento filamentoso que son capaces de producir una amplia variedad de enzimas extracelulares (León, 2007) y metabolitos secundarios de interés comercial e industrial (Berdy, 2005). Se ha evaluado que producen compuestos de uso biotecnológico como son

antibióticos, enzimas industriales (Bentley, 1997), agentes antitumorales (Cragg, 2005) y agentes inmunosupresores (Mann, 2001). De todos los metabolitos secundarios obtenidos de microorganismos, quizá los más importantes han sido aplicados en la salud humana, principalmente como agentes antibióticos (Nanjwade *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar actinobacterias de suelos de la Reserva de la Biosfera los Petenes, Campeche.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Se tomaron 3 muestras compuestas de suelo dentro del área del Centro de Investigación y Vida Silvestre Hampolol, que se localiza dentro de la zona de la Reserva de la Biosfera Los Petenes. Cada una de las muestras analizadas se conformó a partir de 5 muestras de suelo tomadas en un diámetro de aproximadamente 5 metros. Estas muestras se homogenizaron y almacenaron en bolsas estériles hasta su posterior análisis en el laboratorio del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Unidad Sureste.

AISLAMIENTO

10 gr de cada muestra se disolvieron en 90 ml de agua destilada estéril y se prepararon diluciones seriales que se inocularon en placas de agar ISP2, HVA (agar de ácidos húmicos-vitaminas) y agar AIA suplementados con Anfotericina B ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y ácido nalidíxico ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), incubándolas a 29°C por 3-4 semanas. Cada una de las cepas obtenidas fue subcultivada por al menos 3

resiembras consecutivas en el medio ISP2 hasta obtener cultivos puros. Las cepas puras obtenidas que formaban esporas fueron puestas a producir las en medio ISP2, pero aquellas que no formaron esporas se crecieron en medio líquido ISP1 para obtener micelio vegetativo. Todas las cepas se preservaron en glicerol al 20% a -20° C.

Evaluación de la actividad enzimática

A las cepas aisladas se les determinó en placa Petri actividad enzimática extracelular de lipasa, asparaginasa, naringinasa y proteasa. Estas pruebas se realizaron en placas de medio ISP9 complementadas con la fuente de carbono correspondiente a cada actividad enzimática, aceite de oliva, L-asparagina, naringina y gelatina, respectivamente.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las cepas aisladas se hizo confrontando en placa Petri cada una contra las bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y los hongos *Fusarium sp.*, *Helminthosporium sp.* y *Candida albicans*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron 59 actinomicetos en los diferentes medios de cultivo empleados, de los cuales sólo 20 han sido caracterizados por su morfología, por la capacidad de utilizar diversos azúcares, por aspectos fisiológicos como la producción de melanina y degradación de fuentes de carbono más complejas producto de la producción de enzimas

extracelulares, y finalmente por su actividad antimicrobiana.

De las 20 cepas evaluadas por su actividad enzimática, se observó que todas produjeron algún tipo de enzima extracelular tal como sus hábitos lo sugieren. El 95 % de las cepas expresaron proteasas, el 60 % asparaginasa, un 30 % naringinasa, y un 15 % de las cepas produjeron lipasas (fig. 1). En el caso de la actividad proteolítica se observa halos claros del colorante utilizado alrededor de las cepas evaluadas como evidencia de que presentó actividad. En el caso de la actividad de asparaginasa la actividad enzimática se evidenció por la formación de un halo rojo formado alrededor de las colonias. La actividad lipolítica mostró halos fluorescentes de color naranja en aquellas cepas que presentaron la actividad de lipasa extracelular. Es importante señalar que algunas cepas expresaron más de dos actividades enzimáticas. Estos resultados son relevantes desde el punto de vista industrial, porque son enzimas que podrían ser utilizadas en la industria de los alimentos, farmacéutica, detergentes, panadería y papelería (León, 2007).

En lo que respecta a la producción de compuestos bioactivos que tuvieron actividad inhibitoria, se encontró que un gran número de las cepas aisladas presentaron actividad antimicrobiana en mayor o menor grado contra todas las cepas probadas (cuadro 1); algunas fueron específicas sobre un grupo de patógenos, pero otras presentaron una mayor cobertura de acción (ver figura 2), inhibiendo tanto a bacterias gram positivas como gram negativas. En este aspecto, desde hace algunos años se está en la búsqueda de organismos que produzcan

un compuesto que tenga la capacidad de actuar contra bacterias resistentes a anti-bióticos (Ceylan *et al.*, 2008).

Respecto a los hongos *Fusarium* y *Helminthosporium* es importante mencionar que un gran número de cepas produjeron algún compuesto bioactivo con la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos (Fig. 3). Los resultados obtenidos muestran que las cepas ACT15, ACT16 y ACT17 inhiben el crecimiento de ambos hongos. Lo interesante de estos resultados es que sugiere que algunas cepas pudieran producir más de un

compuesto con actividad antimicrobiana (Shiomi *et al.*, 1995). Este comportamiento ha sido ampliamente documentado, por ejemplo actualmente existe una expansión en el uso de actinobacterias como agentes de control biológico (González-Franco y Robles, 2009)

Estos resultados son interesantes si se considera que se requieren compuestos novedosos que actúen sobre las cepas patógenas que han desarrollado resistencia a los antibióticos usados en la actualidad, trátense de bacterias u hongos.

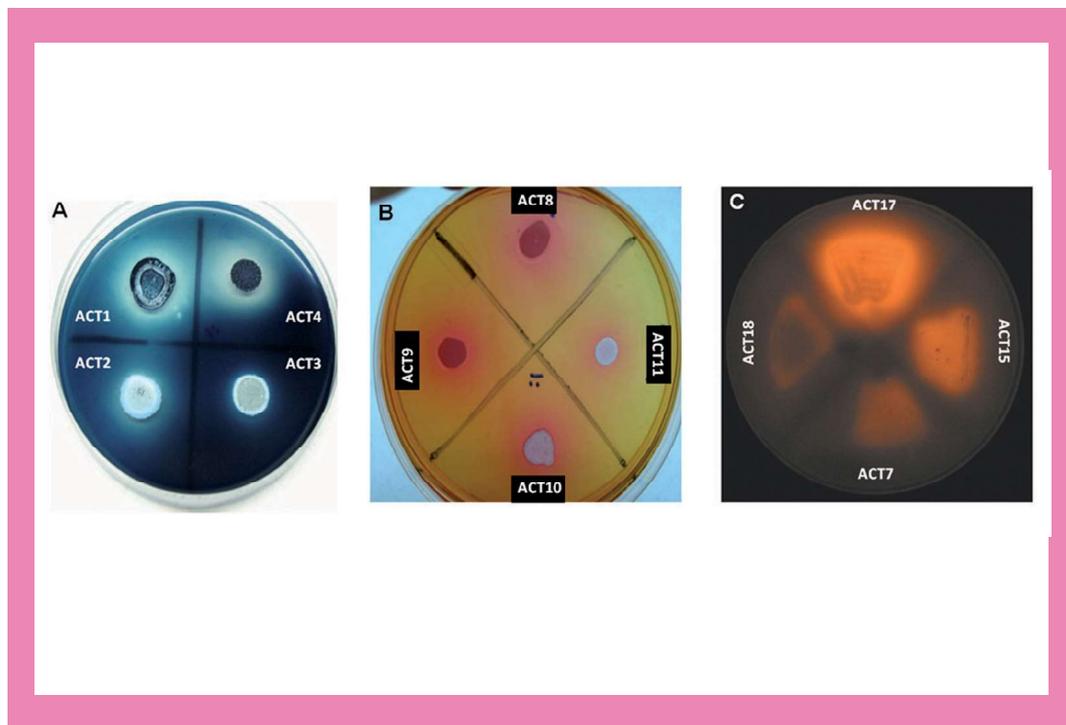


Figura 1. Actividad enzimática extracelular de algunas cepas de actinomicetos. A) Proteasa en agar ISP9+gelatina, halos claros de proteólisis. B) Asparaginasa en agar ISP9+L-asn+rojo fenol; halo rojo. C) Lipasa en agar ISP9+aceite de oliva+rodamina B, halos fluorescentes bajo luz UV.

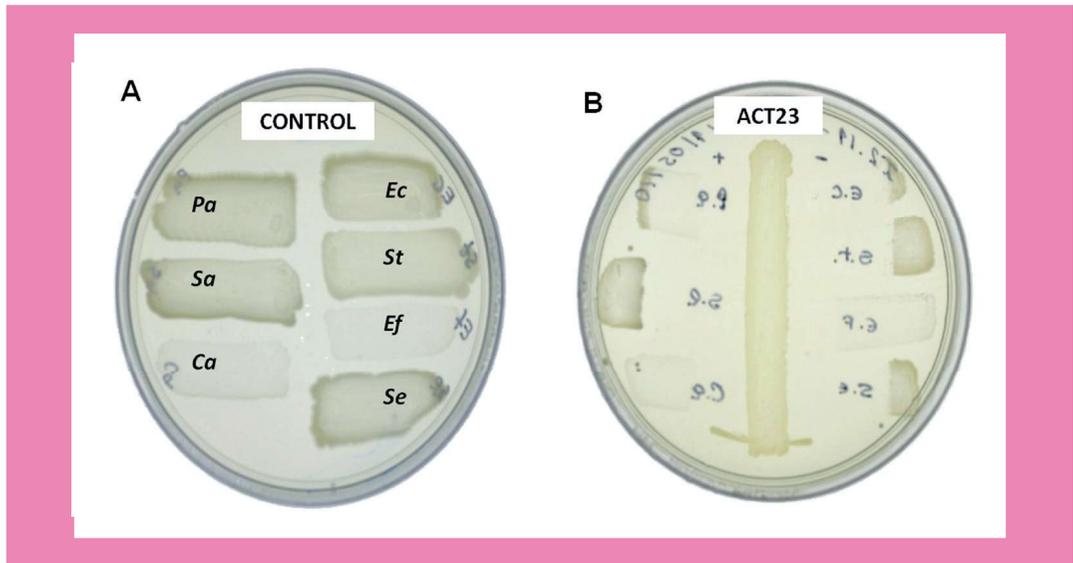


Figura 2. Actividad antibacteriana de algunas cepas de actinomicetos. A) Control bacterias patógenas; ver abreviaturas en cuadro 1. B) Act. Antibacteriana cepa ACT23, se observa inhibición de crecimiento; la posición de las bacterias patógenas corresponde al control.

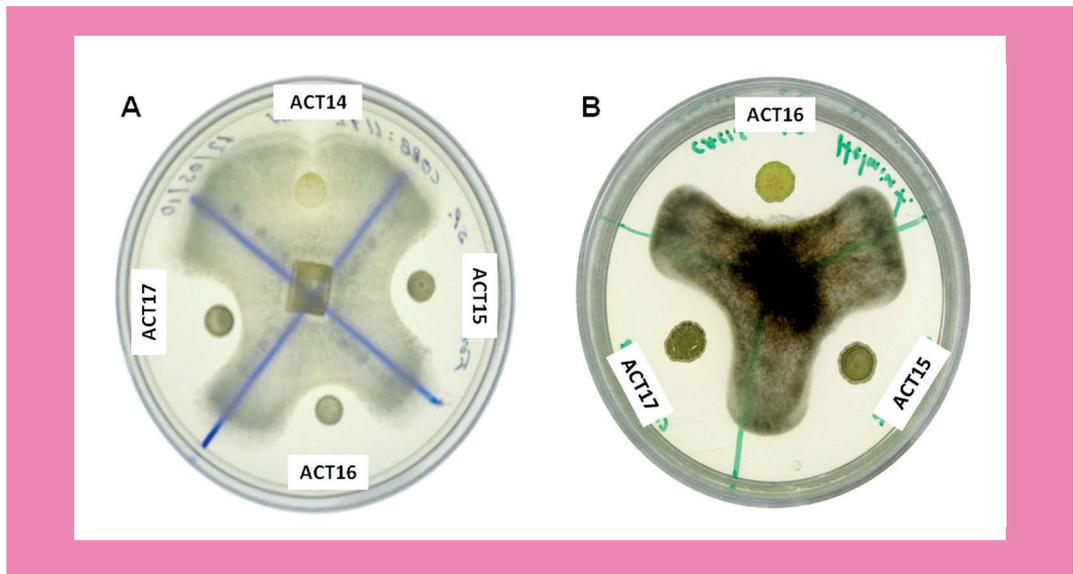


Figura 3. Actividad antifúngica de algunas cepas de actinomicetos. A) Actividad de cepa ACT14, ACT15, ACT16 y ACT17 contra *Fusarium* sp. B) Actividad de las cepas ACT15, ACT16 y ACT17 contra *Helminthosporium* sp. Halos inhibitorios se observan en ACT15, ACT16 y ACT17 para ambos casos.

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de los actinomicetos aislados de la Reserva de la Biosfera los Petenes, Campeche.

PATÓGENOS*	** Actividad Antimicrobiana de los Actinomicetos Aislados (ACT)																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	23			
Gram -	<i>Ec</i>	-	-	+	+++	-	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-	+++			
	<i>Se</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+++			
	<i>St</i>	-	-	-	++	-	+++	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+++			
Gram +	<i>Ef</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++			
	<i>Sa</i>	-	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-	+++		
	<i>Pa</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+++		
Hongos	<i>Fs</i>	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	-	+++		
	<i>Ca</i>	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+++			

* *Ec*, *Escherichia coli* ATCC-11775; *Se*, *Salmonella enteritidis* ATCC-33090; *St*, *Salmonella typhimurium* ATCC-14028; *Ef*, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212; *Sa*, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853; *Fs*, *Fusarium sp.* CDBB:1172; *Ca*, *Candida albicans*.

** Criterio de evaluación de actividad antimicrobiana

(-) Actividad nula

(+) Actividad baja (1-2 mm)

(+ +) Actividad media (3-6 mm)

(+++)Actividad alta (> a 6 mm)

CONCLUSIONES

Los actinomicetos aislados del suelo de la Reserva de la Biosfera Los Petenes y los que aún restan por caracterizarse, son un recurso natural que puede ser aprovechado industrialmente, pero se requieren estudios más exhaustivos para ello.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto recibe apoyo del Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Campeche No. 96874. Participan: Dra. Ingrid Rodríguez Buenfil (CIATEJ-Unidad Sureste) y Dr. Carlos Montalvo Romero (UNACAR).

BIBLIOGRAFÍA

Nanjwade, B.K., Chandrashekhara, S., Goudanavar, P.S., Shamarez, A.M., Manvi, F.V. 2010. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9(3): 231-236

Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-26.

Bentley, R. 1997. Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs. *Perspectives in Biology and medicine*. 40: 364-394.

Clark, A.M. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceut. Res.* 13: 1133-1141.

Ceylan, O., G. Okmen, A. Ugur. 2008. Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsian Journal of BioSciences*. 2: 73-82.

González-Franco, A., L. Robles. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua*. 2(3): 64-73.

León, M., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D.L., Patiño, L. and Soto, R. 2007. Actinomicetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*. 14 (2):259-270.

Mann, J. 2001. Natural products as immunosuppressive agents. *Natutal Product Reports*. 18: 417-430.

Shiomi, K., Arai, N., Shinose, M., Takahashi, Y., Yoshida, H., Iwabuchi, J., Tanaka, Y. and Omura, S. 1995. New antibiotics phthoxazolins B, C and D produced by Streptomyces sp. KO-7888. *J. Antibiotics*. 48:714-719.