

EFFECTO RIZOSFÉRICO DE *Parmelia* sp y *Solanum lixioides* SOBRE ACTINOMICETOS Y ENSAYOS DE ANTIBIOSIS *in vitro*

Rhizospheric effect of *Parmelia* sp and *Solanum lixioides* on actinomycetes and their *in vitro* antimicrobial activity

Hernando Valencia Zapata, Henry Cruz Clavijo, Pedro Berrio y Lyda Zárate

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia,
Apartado Aéreo 14490, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

La presencia de actinomicetos en muestras de suelo alrededor de raíces y rizoídes de *Parmelia* sp y de *Solanum lixioides* fue investigado. Se evaluó el efecto rizosférico del líquen *Parmelia* sp sobre poblaciones de actinomicetos con un $R/S = 2.5$, mientras el radio R/S resultante en *S. lixioides* fue <1 . En los ensayos de antibiosis los mejores resultados se obtuvieron al modificar el medio de cultivo, o medio mínimo de Hopwood (1967), con relación a medios estándar. Se determinó el espectro de actividad antibiótica de 9 aislamientos, sobre organismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y Gram negativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los aislamientos A-2, A-4, A-5 y A-6 presentaron un amplio espectro de actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*. A-11, presentó una antibiosis selectiva y en grado alto sobre *P. aeruginosa*.

Palabras claves: Actinomicetos. Antibiosis. *Parmelia* sp. Efecto rizosférico.

ABSTRACT

The occurrence of actinomycetes from rhizospheric soils of *Parmelia* sp and *Solanum lixioides* was investigated. The rhizospheric effect from *Parmelia* sp (Lichen) upon actinomycetes isolates was evaluated and was ($R/S = 2.5$), while by the solanaceae the resultant ratio R/S was <1 . For the antibiosis assays the better results were obtained by modifying the culture medium

(Hopwood minimun medium, 1967). The antimicrobial activity from nine isolates against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* was determined. A-2, A-4, A-5 and A-6 isolates showed a broad spectrum of antimicrobial activity, while A-11 showed a selective antimicrobial activity against *P. aeruginosa*.

Keywords: Actinomycetes. Antibiosis. *Parmelia* sp. Rhizospheric effect.

INTRODUCCIÓN

En aislamientos preliminares de actinomicetos, a partir de diversas plantas y líquenes, realizados en el enclave xerofítico de La Herrera se encontró una cantidad mayor de hongos a partir de muestras rizosféricas de la planta solanáceae, mientras que del suelo asociado a líquenes predominaba las colonias de actinomicetos. Lo anterior nos llevó a formular la hipótesis sobre una posible estimulación rizosférica sobre los actinomicetos por parte de la planta no vascular o líquen.

El suelo es un medio polifásico y presenta una colección de microambientes, de éstos, dos hábitats son de particular importancia: la superficie de las raíces y los agregados del suelo (Skinner, 1976). La rizósfera, o volumen de suelo alrededor y bajo la influencia de la raíz (término acuñado por Hiltner en 1904) representa gran significancia por crear una zona de estimulación, mediante la liberación de materiales orgánicos (células y exudados), sobre las poblaciones microbianas generando cambios cualitativos y cuantitativos, que influyen sobre el crecimiento de las plantas. En el caso de bacterias puede incrementarse hasta 30 veces el índice rizosférico, el cual está dado por la relación: $R/S = (\text{Número de microorganismos en el suelo rizosférico. g}^{-1} \text{ suelo rizosférico} / \text{Número de microorganismos g}^{-1} \text{ suelo control})$.

En plantas vasculares, su crecimiento y desarrollo está controlado notoriamente por el ambiente del suelo alrededor de la raíz, un ambiente que la misma planta ayuda a crear y donde la actividad microbiana constituye una gran fuerza de influencia (Curl & Truelove, 1986). En plantas no vasculares como los líquenes, éstos acumulan diversos metabolitos secundarios en su talo, que más adelante, mediante procesos de descomposición y liberación de nutrientes forman igualmente una zona de estimulación para el crecimiento de microorganismos, en algunos casos altamente selectivos que han sido poco estudiados. También algunos líquenes producen sustancias antimicrobianas.

Los actinomicetos constituyen un grupo de bacterias Gram positivas morfológicamente muy diversas, que presentan un contenido inusualmente alto de G+C. El hábito filamentosos ramificado y la apariencia de las colonias de actinomicetos inicialmente permitió considerarlos como hongos. Fisiológicamente son muy diversos, tanto por la producción de enzimas extracelulares, como por los miles de productos metabólicos que sintetizan y excretan.

Este grupo de microorganismos son ampliamente conocidos por la producción de antibióticos, los cuales pueden inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, virus y protozoarios. En el suelo juegan un papel importante al regular otras poblaciones de organismos. Desphande *et al.*, 1980. Hopwood & Shelman, 1990, en una revisión amplia sobre la producción de metabolitos secundarios, enumeran una gran variedad de sustancias biológicamente activas, tales como antiinflamatorios, hipoglicemiantes, antivirales, antihelminthos, insecticidas, herbicidas, bactericidas, fungicidas y enzimas, entre otras. Esto ha suscitado gran interés en aplicaciones en Medicina humana y veterinaria, Agronomía y Biotecnología. Con relación al efecto rizosférico se ha reportado un incremento o estimulación sobre poblaciones de actinomicetos, alrededor de las raíces de varias plantas (Rouatt *et al.*, 1960. Waksman, 1961; Kuester, 1976; Bolton *et al.*, 1995), pero no a partir de líquenes.

En el presente trabajo se realizaron aislamientos de actinomicetos de suelos rizosféricos (alrededor de raíces y rizoides) de *S. lixioides* y *Parmelia* sp. y de suelos control y se determinó el índice rizosférico R/S. Se evaluaron las condiciones o requerimientos para ensayos de antibiosis *in vitro*, con los aislamientos de los actinomicetos obtenidos y una caracterización en cuanto a su actividad antimicrobiana sobre algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE SUELO

El sitio de muestreo, localizado en la región de La Herrera, Municipio de Mosquera-Cundinamarca, presenta vegetación xerofítica y suelo tipo Typic Haplustalf (Guevara, 1986), caracterizados por poseer un horizonte enriquecido en arcilla y en algunos sitios bandas de carbonatos de calcio (CaCO_3) con pH 7.2. Allí se tomaron muestras de suelo rizosférico provenientes del lugar de cultivo de *S. lixioides* (Solanaceae), y *Parmelia* sp.

(Líquén). Aproximadamente 100 g de suelo por muestra, integrada por cinco submuestras se recogieron y transportaron en bolsas de polietileno para su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

MICROORGANISMOS TESTIGO

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Las cepas *P. aeruginosa* 9 y *B. subtilis* 3503 fueron cedidas por el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Los Andes; *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

ASLAMIENTO PRIMARIO Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE LOS ACTINOMICETOS

A partir de suspensión-dilución de suelo se sembró en superficie, por triplicado, alícuotas de 0,1 ml de diluciones 10^{-3} 10^{-4} y 10^{-5} sobre Agar Extracto de Avena, Agar nutritivo y Agar papa dextrosa, tanto de cada uno de los suelos rizosféricos, como de su respectivo suelo control o libre de raíces. Para la diluciones se determinó previamente el porcentaje de humedad de cada muestra a la centésima de gramo, y se pesó el equivalente a 1 g de peso seco, con el fin de estimar el número de unidades formadoras de colonia (UFC)/g en base a peso seco de suelo, tanto rizosférico como de los respectivos suelos control.

Los cultivos se observaron diariamente y al cabo de 8-14 días, los actinomicetos se evidenciaron por la aparición de halos de inhibición en el medio de cultivo frente a otras bacterias y hongos provenientes de la misma muestra de suelo. También se reconocieron por el aspecto de la colonia, y olor a tierra húmeda característicos de ellos. (Williams & Wellington, 1896; Schlegel, 1992).

Posteriormente se aislaron en cultivo puro varios actinomicetos, mediante siembra en estría en placas y en tubos en diferentes medios, como Agar Extracto de Avena (AEA), Glucosa-Asparagina Agar (GAA) y Glicerol Asparagina Agar (GliAA), incubados a $18 \pm 5^\circ\text{C}$, de acuerdo a las técnicas descritas por Waksman, 1961; Williams *et al.*, 1989.

Cada cultivo de los actinomicetos se observó microscópicamente, mediante coloración acidorresistente de Kinyoun y de Gram modificada para actinomicetos. Así mismo, la colonia se caracterizó en cuanto a tamaño, color, pigmentos difusibles al medio, aspecto, y descripción del micelio aéreo.

FACTORES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS DE ANTIBIOSIS

Para evaluar los ensayos de antibiosis se tuvieron en cuenta los siguientes factores: medios de cultivo, tiempo de crecimiento de los microorganismos testigo, concentración o densidad del inóculo, tiempo y temperatura de la fase de difusión del antibiótico y espesor de agar en la placa.

Composición de los medios de cultivo

Los ensayos se realizaron con los siguientes medios de cultivo preparados por componentes:

Agar Extracto de Avena (AEA): ojuelas de avena 30 g, agar 16 g

Agar Antibiótico No. 2 (AA No.2 Difco en Merck, 1997): extracto de carne 1.5 g, extracto de levadura 3 g, peptona de carne 6 g, agar 16 g.

Agar Antibiótico No.4 (AA No.4 Difco): extracto de carne 1.5 g, extracto de levadura 3 g, peptona de carne 6 g, glucosa 10 g, medio mínimo para *Streptomyces* según Hopwood (1967) (MMH): glucosa 10 g, asparagina 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003 g, agar 15 g.

Tiempo y temperatura de crecimiento de los actinomicetos

El crecimiento de los actinomicetos es relativamente lento, para su desarrollo y madurez, se pueden requerir de 12 a 14 días; se trabajó con el tiempo mayor (14 días) y temperatura de $18 \pm 5^\circ C$.

Concentración del inóculo

Las bacterias Gram negativas y Gram positivas se tomaron de subcultivos de las cepas testigo crecidos en caldo nutritivo por 48 horas a $20^\circ C$, se sembró en cajas con 25 ml de medio, una asada en estría perpendicular, con asa calibrada de 20 ml, de cada microorganismo testigo, frente al actinomiceto a ensayar.

Tiempo y temperatura de la fase de difusión del antibiótico

Se trabajó a temperatura ambiente ($18 \pm 5^\circ C$), para evitar problemas por deshidratación, debido a que los ensayos de antibiosis requieren de un tiempo prolongado, 21 días para las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Con base en varios ensayos preliminares se logró establecer las condiciones para la estandarización de las pruebas de antibiosis.

Los actinomicetos se inocularon en siembra densa o confluyente ocupando 1/3 de la placa del medio de cultivo, (previamente modificado para el crecimiento de los microorganismos y producción del antibiótico). Se dejaron en incubación 21 días a 18°C. Luego se procedió a sembrar los microorganismos testigo (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*), en estría perpendicular desde el borde opuesto hasta tocar el borde del actinomicete (Figura 1). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas, de acuerdo al procedimiento descrito por Waksman, 1961.

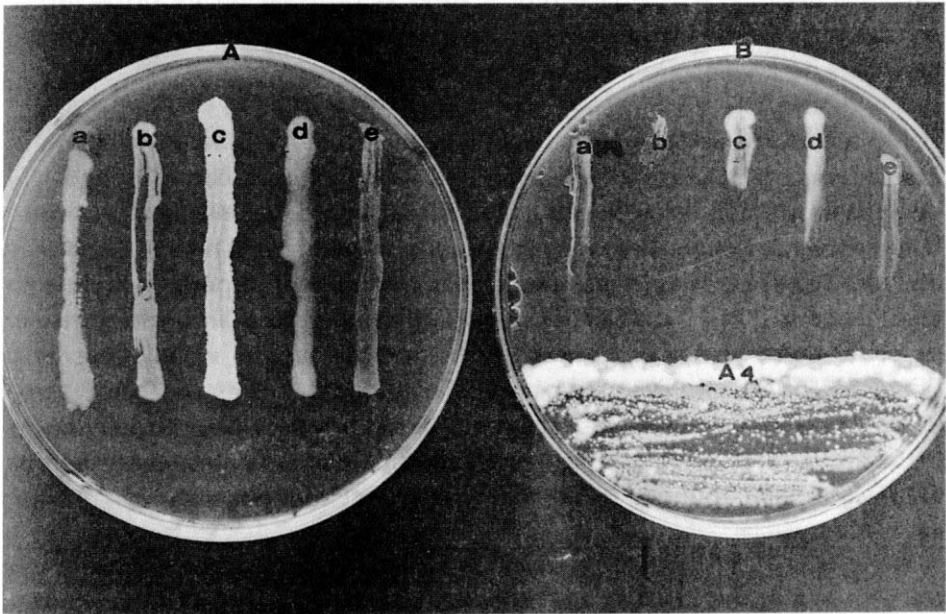


Figura 1. Placa de antibiosis *in vitro* del aislamiento del actinomiceto A: placa control. B: A-4. Ambas placas fueron tratadas con: a. *Staphylococcus aureus*. b. *Escherichia coli*. c. *Bacillus subtilis*. d. *Klebsiella pneumoniae*. e. *Pseudomonas aeruginosa*.

El efecto antimicrobiano se evaluó como: (i) inactivo (no presentaron halo de inhibición) o activo en grado B (bajo) con halos de inhibición < de 11 mm; M (medio) con halo de inhibición de 12 - 20 mm y A (alto) con formación de halos de inhibición > 21 mm.

Recíprocamente bacterias testigo resistentes son aquellas para las cuales el antimicrobiano resultó inactivo y bacterias sensibles en las que la inhibición se registró en grado medio a alto. Se realizaron tres replicaciones de los ensayos de antibiosis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ASLAMIENTO PRIMARIO Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ACTINOMICETOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el aislamiento primario de los actinomicetos en placas de AEA. a partir de diluciones de suelo rizosférico de *S. lixioides* y *Parmelia* sp. las muestras de la solanacea presentaron un alto número de hongos, en especial mucorales (*Mucor* sp y *Rhizopus* sp) de micelio alto y crecimiento rápido, que cubrían las cajas de petri en 2 a 3 días, dificultando la observación de otros microorganismos. Notoriamente se registraron pocos actinomicetos y si estaban presentes no evidenciaron actividad antibiótica.

Por lo anterior se seleccionaron las placas con un número bajo o ninguno de hongos mucorales y que presentaron halos de inhibición contra hongos y/o bacterias. Esta condición se obtuvo en placas con diluciones de suelo rizosférico provenientes de *Parmelia* sp., en donde se encontró el mayor número de actinomicetos, apreciables por desarrollar colonias con aspecto pulverulento a partir de los 10-12 días de incubación a temperatura ambiente y el olor típico a tierra removida, por la liberación del lípido volátil geosmina. El tamaño de las colonias osciló entre 0,5-4,0 mm de diámetro y presentaron color de reverso generalmente diferente al del anverso. Microscópicamente los actinomicetos presentaron filamentos ramificados (sin espirales del tipo *Streptomyces*) con abundantes esporas y reacción Gram positiva.

		Unidades formadoras de colonia en suelo g ⁻¹		
		Rizósférico	Control	R/S
<i>Parmelia</i> sp	Actinomicetos	23 x 10 ⁴	9 x 10 ⁴	2.5
	Bacterias	145 x 10 ⁴	24 x 10 ⁴	2.8
<i>Solanum lixioides</i>	Actinomicetos	5 x 10 ⁴	20 x 10 ⁴	<1
	Bacterias	160 x 10 ⁴	35 x 10 ⁴	4.5

Tabla 1. Estimación del número de actinomicetos y bacterias (excluyendo actinomicetos) de suelos rizosféricos (R) y suelo control (S) y la relación R/S, de muestras del líquen *Parmelia* sp y *S. lixioides* del ecosistema xerofítico de la Región de La Herrera (Cundinamarca-Colombia).

ÍNDICE RIZOSFÉRICO (R/S)

La estimación cuantitativa de bacterias en general y bacterias actinomicetales, así como los valores de la relación R/S se indica en la Tabla 1. El índice rizosférico en el suelo asociado al líquen *Parmelia* sp resultó 2.5 veces mayor,

con respecto al suelo control o libre de la influencia de sus rizini, así (23×10^4 g⁻¹ peso seco de suelo rizosférico / 9×10^4 g⁻¹ peso seco de suelo control). Se evidenció así un efecto rizosférico de estas pequeñas plantas no vasculares sobre la población de actinomicetos con relación a la solanácea (*S. lixioides*, R/S < 1), en el que predominaron los hongos mucorales y pocos actinomicetos. Varias hongos saprofitos, en especial zygomycetes son estimulados por la rizósfera (Richards, 1987), como en el caso de *S. lixioides*, mientras en el líquen la mayor presencia de actinomicetos productores de antibióticos redujo las poblaciones de éstos hongos. Se sabe que la rizósfera es quizás una de las regiones del suelo más compleja en términos de poblaciones y dinámica de comunidades, y por lo tanto en interacciones ecológicas.

Al respecto otros autores reportan que las variaciones de las poblaciones de actinomicetos, además de factores abióticos del suelo son afectadas por la presencia de raíces de plantas y en especial por los exudados de éstas. En este caso esta dado por condiciones del suelo alrededor de los líquenes, como por ejemplo la producción de ácidos liquénicos.

ASLAMIENTO DE ACTINOMICETOS Y ENSAYOS DE ANTIBIOSIS

De quince colonias inicialmente aisladas, se obtuvieron once cultivos. El poder antibiótico relativamente alto registrado facilitó la obtención de los 11 aislamientos en cultivo puro. Estos presentaron endo y exopigmentos en algunos casos, los que pueden variar de acuerdo al medio en que se cultiven.

Los diferentes medios ensayados GAA, GliAA, AEA y MMH *Streptomyces* (según Hopwood, 1967), no resultaron idóneos para el crecimiento de los microorganismos testigo, debido al deficiente desarrollo de las colonias, o si éstas crecían no se presentaba antibiosis, probablemente por no ocurrir la síntesis del antibiótico.

Se realizaron varias pruebas para cada uno de los aislamientos purificados contra los microorganismos testigo y a las condiciones previamente establecidas, con los medios de cultivo escogidos: AEA y MMH. Además de de los ensayos anteriores se encontró que el medio más adecuado fue el MMH por favorecer el crecimiento de los actinomicetos y el de los microorganismos testigo. Este medio contiene el menor número de compuestos orgánicos, algunos elementos traza, asparagina como única fuente de nitrógeno y presentó el menor grado de contaminación. En cuanto a los elementos traza juegan un papel básico en procesos del metabolismo bacteriano (Cochrane, 1961). No obstante, con en el crecimiento de los diferentes

microorganismos se presentaron varias dificultades a medida que se realizaron los ensayos de antibiosis, así:

a. El crecimiento de los microorganismos testigo no resultó ser lo suficientemente denso para diferenciar en forma notable una posible antibiosis, lo cual se obvió con la adición de 5% de Agar Nutritivo a MMH.

b. Contaminación por hongos ambientales principalmente *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. Esta se controló con la adición de ciclohexamida (antibiótico fungicida) 100 mg/ml, utilizado en estos casos (Williams et al., 1989).

c. Al inocular los microorganismos testigo, no se presentaba antibiosis. Se realizó entonces varios ensayos inoculando a intervalos de 3, 6, 9 y 12 días, a partir de 14 días de haber sido sembrados los actinomicetos. Lo anterior podría deberse a:

1. No había producción del antibiótico, por falta de algún factor de crecimiento (aminoácidos, vitaminas o purinas) o algún cofactor o si se producía se encontraba por debajo de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

2. Se presentaba algún tipo de inhibición del antibiótico para que éste no ejerciera su efecto inhibitor. Al respecto se ha reportado en pruebas de estudios de sensibilidad comparativa, que en el medio de soya tríptica se inhibe la acción de la neomicina y terramicina, por falta de algún factor esencial para la biosíntesis del antibiótico.

Finalmente la adición de extracto del suelo estéril (10 ml/l) al medio de cultivo con las modificaciones previas realizadas, para enriquecerlo (Waksman, 1961, Seiler, 1986 y Lechevalier & Lechevalier, 1986), permitió obtener los resultados de antibiosis.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ANTIBIOSIS

El efecto de la actividad antimicrobiana producida por los actinomicetos sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas se indican en la Tabla 2. Los aislamientos de actinomicetos A-2, A-4, A-5 y A-6 presentaron el efecto del antimicrobiano en grado medio a alto sobre *E. coli*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*. Mientras, A-7 y A-11 presentaron actividad antimicrobiana media y alta respectivamente, sobre *S. aureus*, el mayor grado de susceptibilidad a los actinomicetos probados lo presentó *B. subtilis* y *P. aeruginosa* solo resultó inhibida por dos aislamientos (A-7 y A-11).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A-1	i	i	M	M	i
A-2	i	M	A	M	i
A-3	i	M	A	A	i
A-4	B	M	M	M	i
A-5	i	M	A	A	i
A-6	i	M	A	A	i
A-7	M	M	A	i	M
A-8	i	i	M	i	i
A-11	i	i	B	i	A

Tabla 2. Evaluación del efecto del antimicrobiano proveniente de aislamientos de actinomicetos de suelos rizosféricos de *Parmelia sp* sobre algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas realizada en ensayos de antibiosis *in vitro* por difusión. Antimicrobiano inactivo: (i) no se forma halo de inhibición; antimicrobiano activo en grado: bajo (B), halo de inhibición < 11 mm; medio (M), halo de inhibición 12-20 mm; alto (A), halo de inhibición > 21 mm.

En el aislamiento A-4 se registró un espectro amplio de actividad antimicrobiana sobre cuatro bacterias (*S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*). Notoriamente, el aislamiento A-11 presentó un espectro de actividad antibiótica muy reducido, pero específico y en grado alto sobre *P. aeruginosa*; este resultado es interesante dado que *P. aeruginosa* es inhibida por pocos antibióticos (Madigan *et al.*, 1997). Así mismo A-8, ejerció una actividad antimicrobiana solo sobre *B. subtilis*, aunque en grado medio (Tabla 2).

La actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* se ejerció en grado bajo y medio por los aislamientos A-4 y A-7 respectivamente, en *P. aeruginosa* en grado medio y alto por A-7 y A-11 y en *E. coli* sólo en grado medio por A-2, A-3, A-4, A-5, A-6 y A-7. Por otra parte en *B. subtilis* y *K. pneumoniae* se registró antibiosis en grado alto por los actinomicetos A-3, A-5 y A-6. Los actinomicetos A-9 y A-10 no indicados en la Tabla 2, no presentaron actividad antibiótica sobre ningún testigo.

Adicionalmente, se indican en la Tabla 3 los resultados de algunas pruebas bioquímicas realizadas en forma preliminar. De la información consignada se observa que los actinomicetos que asimilaron un carbohidrato en particular, presentaron en general un metabolismo oxidativo, como en el caso del glicerol (polialcohol) que fue utilizado por el 100% de los actinomicetos, mientras la mitad asimilaron la glucosa y menos del 20% la arabinosa. La lactosa y xylosa fueron utilizados únicamente por el actinomiceto A-2 y la galactosa no fue oxidada por ningún aislamiento.

Prueba	Aislamiento										
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11
O/F Arabinosa	O	F a	-	-	-	F a	F a	-	O	-	-
O/F Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F Glicerol	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
O/F Glucosa	O	F	F	O	F	O	O	O	O	F	F a
O/F Lactosa	-	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F Xilosa	-	F a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Indol	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Utilización de citrato	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados de algunas pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos de actinomicetos. Metabolismo: (O) oxidativo, (F) fermentativo, (a) con producción de gas, (+) prueba positiva, (-) prueba negativa

En una investigación reciente de caracterización bioquímica de actinomicetos de rizósfera del líquen *Parmelia* sp realizada en el Laboratorio de Microbiología del Suelo se determinaron los siguientes géneros: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* y *Kibdelosporangium*, *Streptosporangium* (Angarita & Ariza, 1988; Franco, 1999). Ninguno de los aislamientos presentó esporas móviles, por lo cual no pertenecen al género *Actinoplanes*.

Las observaciones microscópicas (Figura 2) y datos bioquímicos preliminares relacionan a los aislamientos obtenidos con el grupo nocardioformes propuesto por Goodfellow & Minikin, 1977 (No incluye a *Streptomyces*). Es necesario proseguir con la caracterización, morfológica, bioquímica y pruebas moleculares, de los microorganismos en cuestión, dada la importante actividad antimicrobiana encontrada.

CONCLUSIONES

Se determinó un efecto rizosférico importante del líquen *Parmelia* sp sobre poblaciones de actinomicetos, comparado con el obtenido a partir de muestras de suelos a partir de rizósfera de *S. lxioides*, ($R/S = 2.5$ y < 1 respectivamente) en muestras de suelos xerofíticos de la región de La Herrera, Cundinamarca.

Se aislaron y purificaron 11 actinomicetos de la muestra de suelo rizosférico de *Parmelia* sp., de los cuales 9 presentaron actividad antimicrobiana sobre algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En los ensayos de antibiosis *in vitro* con los microorganismos aislados, éstos evidenciaron una actividad antimicrobiana mediante la modificación del medio de cultivo, en especial suplementando factores de crecimiento aportados por el extracto de suelo.

Los actinomicetos probados presentaron un espectro amplio de actividad antimicrobiana, (A-2, A-4, A-5 y A-6 sobre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*), a selectivo (A-8 sobre *Bacillus subtilis* y A-11 sobre *Pseudomonas aeruginosa*) indicando variación y actividad antibiótica importante sobre los microorganismos probados.



Figura 2. Fotomicrografía del micelio aéreo de actinomiceto tipo nocardioforme. Coloración de Gram. 1600 X.

AGRADECIMIENTOS

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

BIBLIOGRAFÍA

ANGARITA, A. P. & ARIZA, E. C. 1988. Aislamiento y caracterización taxonómica de actinomicetos nocardioformes productores de sustancias antimicrobianas de amplio espectro provenientes de suelo asociado a *Parmelia* sp. Tesis de Bacteriología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá.

- BOLTON, H., FREDRICKSON, J. & ELLIOTT, L. 1995. Microbial ecology of the rhizosphere. En: Metting, F. Jr. (de) Soil microbial Ecology. Marcel Dekker, Inc. New York.
- COCHRANE, V. W. 1961. Physiology of actinomycetes Ann. Rev. Microbiol. 15: 126.
- CURL, E. A. & TRUELOVE, B. 1986. The rhizosphere. Advanced series in agricultural sciences 15. Springer-Verlag. Berlin.
- DESHPANDE, B., AMBEDKAE, S. & SHEWALE, J. G. 1980 Biologically active secondary metabolites from Streptomyces. Enzyme Microbiol. Technol. 10: 455-73.
- FRANCO, M. 1999. Aislamiento, caracterización y evaluación de actinomicetos inhibidores de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Microbiología, Universidad Nacional de Colombia
- GOODFELLOW, M. & MINNIKIN, D. E. 1977. Nocardioform bacteria. Ann. Rev. of Microbiol. 45: 355-64.
- GUEVARA, J. H. 1986. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá, Colombia.
- HOPWOOD, D. A. 1967. Genetic analysis and genome structure in Streptomyces coelicolor. Bacteriol. Rev. 31: 373-403.
- _____ & SHERMAN, D. H. 1990. Molecular genetics of polyketides. Ann. Rev. Genet. 24: 37-66.
- KUESTER, E. 1976. Ecology and predominance of soil Streptomyces. En: T. Arai (ed). Actinomycetes the boundary organisms. Tokio.
- LECHEVALIER, H. A. & LECHEVALIER, M. P. 1986. Introduction to the order Actinomycetales; En: The Prokaryotes a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. II. Springer-Verlang. New York.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. & PARKER, J. 1997. Brock biology of microorganisms. Eighth Edition. PrenticeHall. New Jersey.

- MERCK. 1997. Microbiology Manual. Darmstadt.
- RICHARDS, B. 1987. Microbiology of the rhizosphere. Longman. New York.
- ROUATT, J. W., KATZNELSON, H. & PAYNE, T. M. 1960. Statistical evaluation of the rhizosphere effect. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 24: 271-73.
- SCHLEGEL, H. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Seventh Edition. Thieme. Verlag. Stuttgart.
- SKINNER, F. A. 1976. Methodology in soil examination. En: Skinner, F. A. & Carr, J. G. (eds) Microbiology in agriculture, fisheries and food. Society of applied bacteriology symposium series No 4. Academic Press. New York.
- WAKSMAN, A. S. 1961. The Actinomycetes. Williams & Wilkins Baltimore.
- WILLIAMS, S. T. & WELLINGTON, E. 1986. Introduction to the order Actinomycetales; En: The Prokaryotes a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. II. Springer-Verlag. New York.
- _____, SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. (eds). 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.4. Williams and Wilkins Baltimore.