

ESTUDIO PRELIMINAR DE ANTIBIOSIS IN VITRO POR ACTINOMYCETES TIPO NOCARDIOFORMS

*Orlando González Albarracín**
*Leonor Muñoz de Correal**
*Hernando Valencia Zapata***

RESUMEN

Se asilaron dos actinomicetes tipo *Nocardioforms* de suelos rizosféricos de *Sporobolus lasiophyllus* (Gramineae) y *Solanum lycioides* (Solanaceae) de la región xerofítica de la Herrera Cundinamarca. Se determinó su actividad antimicrobiana *in vitro* contra seis cepas testigo de interés médico. En la evaluación ambos microorganismos resultaron eficientes únicamente contra *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

Rhizospheric soils from two places of natural vegetation (*Sporobolus lasiophyllus* and *Solanum lycioides*) were collected in the xerophytic zone of "La Herrera". Microorganisms with antimicrobial activity were detected. Two Actinomycetes of the Nocardioform type were isolated. Assays for antimicrobial activity against six references microorganisms, pathogen and/or potentially pathogens for human beings, were carried out. These actinomycetes only showed antibiotic activity against *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCION

La gran complejidad fisicoquímica del suelo se

correlaciona con el hecho de ser el habitat con mayor diversidad de microorganismos, donde tienen lugar todas las interacciones microbianas posibles, positivas, neutras y negativas. Como factores de competencia algunos microorganismos producen antibióticos, en especial los Actinomicetes. Estos últimos son bacterias multicelulares, con capacidad de crecimiento filamentosos y pueden diferenciarse al responder a señales específicas del medio, en esporas, acompañado éste último proceso con la producción de antibióticos. No obstante su relevancia por la producción de éste tipo de metabolitos secundarios, hoy en día se les investiga intensamente por la producción de otros químicos, tales como herbicidas, agentes antiparasitarios, alcaloides, enzimas, inhibidores de enzimas e inmunomodificadores, como bien reportan Dephande y otros (1) en su extensa revisión.

Con respecto a los antibióticos, éstos pueden ser producidos en la naturaleza por organismos muy diversos (plantas, invertebrados, además de microorganismos), aunque los de uso clínico se restringen básicamente a los derivados de los géneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium* y *Cephalosporium*.

El antibiótico se caracteriza por ser una sustancia química producida o derivada (por semisíntesis) de organismos, capaz de inhibir el

* Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia Apartado Aéreo 14490. Santafé de Bogotá.

** Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Apartado Aéreo 23227. Santafé de Bogotá.

crecimiento, a muy baja concentración, de otros organismos y ser lo suficientemente no tóxica. (2, 3, 4)

La mayoría de los antibióticos han sido extraídos de los Actinomicetes (1) y un 70% de ellos se derivan de diferentes especies de *Streptomyces*. Del género *Nocardia*, si bien algunas especies son patógenas (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*), también se encuentran especies que producen sustancias antimicrobianas (2).

En éste trabajo se estudió el efecto de antibiosis *in vitro* producido por dos bacterias actinomicetales tipo nocardioforme sobre algunas bacterias y hongos patógenos o potencialmente patógenos del hombre.

En cuanto a la clasificación de los Actinomicetes los trabajos clásicos de Waksman (3) y mas recientemente Lechavelier & Lechavelier (6) para clasificar género y especie tienen en cuenta otros aspectos como: propiedades químicas de la pared, tipo de micelio, tipo y disposición de las esporas, formación de esclerocios, esporangios o sinema, formación de esporas flageladas, metabolismo fermentativo vs oxidativo y características fisiológicas.

Con base en propiedades de biología molecular Goodfellow (5) en Buchanan & Gibbons (8a Edición del Manual Bergey de Bacteriología Determinativa) proponen una clasificación supragenérica al analizar el secuenciamiento de oligonucleótidos de la fracción 16s ribosomal (16s rRNA).

Se proponen diez grupos supragenéricos: Actinobacteria, Actinoplanetes, Maduromycetes, Micropolisporas, Esporangios multiloculares, Nocardioformes, Nocardioides, Streptomicetes, Termomonoesporas y otros géneros. En este trabajo se sigue este criterio. En la

Figura 1 se aprecia el hábito de crecimiento de un Nocardioforme y un Streptomicete.

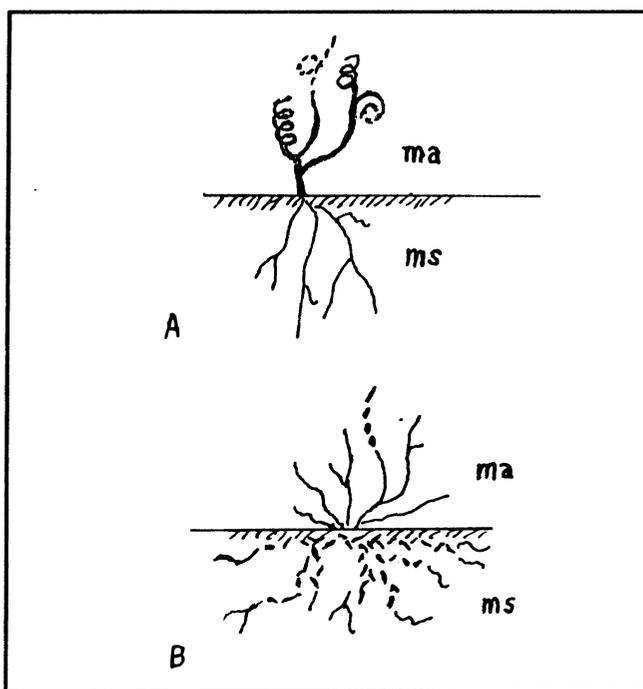


Figura 1. Hábito de crecimiento de A: *Streptomyces* tipo Sporoactinomicetes. B: Actinomicete tipo Nocardioforme. En *Streptomyces* las esporas del micelio aéreo (ma) normalmente no están presentes en el micelio de sustrato (ms).

MATERIALES Y METODOS

Sitio. La región xerofítica de La Herrera presenta una humedad relativa del 40 al 70%, una precipitación media anual de 300 a 700 mm y una temperatura promedio de 14°C. La vegetación predominante es de matorral montano micronanófilo y pastizales. Los suelos presentan un horizonte de acumulación de arcillas, de alta saturación, bien drenados y lixiviación de carbonatos típico de regiones muy secas con suelos alfisoles (Typic Haplustalfs).

Las características texturales y pH de los horizontes de un estudio general de suelos (7) se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas suelo Typic Haplustalf

HORIZONTE	PROFUNDIDAD (cm)	TEXTURA+	GRANULOMETRIA++			pH
			A	L	AR	
E	0-22	F	40	38	22	5.2
2Bt1	22-39	Ar	30	26	44	0.9
2Bt2	39-79	Ar	36	22	42	8.0
3C	79+	F-Ar	44	22	34	7.7

+F = franco, Ar = arenoso ++ A = arcilla, L = limo, Ar = arena (en %)

Toma de muestras. Se recogieron dos muestras integradas de suelo rizosférico cada una constituida por cinco submuestras tomadas al azar en el sitio de pastizal de *Sporobolus lasiophyllus* y en el matorral micronanófilo de *Solanum licyoides*. Las muestras se transportaron dentro de bolsas de polietileno para su procesamiento en el laboratorio en un tiempo no mayor a 48 H.

Detección de microorganismos con actividad antimicrobiana. El efecto de antibiosis *in vitro* se puede apreciar macroscópicamente por el halo de inhibición que se crea alrededor de una colonia en la cual no confluye el crecimiento de un microorganismo cercano en la placa de cultivo. Se emplearan tres métodos así:

- Warcup o método de siembra en fondo de partículas de suelo (unos 10 mg).
- Siembra en fondo de diluciones de suelo (10⁻¹ a 10⁻⁶).
- Siembra directa de partículas de suelo sobre placas con microorganismos testigos (3, 8).

Las pruebas de antibiosis se hicieron en los siguientes medios de cultivo: agar nutritivo (AN), agar Sabouraud (AS), agar extracto de avena (AEA), agar dextrosa de papa (ADP), agar glicerol extracto de levadura (AGEL), agar glucosa asparagina (AGA) y agar Czpeck (ACz).

Se sembraron cinco cajas de cada medio incubándose a 25°C para observación diaria.

Aislamiento de los actinomicetes. Se escogieron las placas con halos de inhibición mas claros y definidos para seleccionar los microorganismos con actividad antimicrobiana que fueron aislados y purificados por el método de siembra en estría a partir de diluciones seriadas (9). Los cultivos puros obtenidos se depositaron en los ceparios de Farmacia y Biología.

Determinación de la actividad antimicrobiana. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los microorganismos actinomicetes aislados por los métodos de estrías cruzadas y de implantación (6) contra los siguientes testigos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphi* (bacterias gramnegativas) *Staphylococcus aureus* (bacteria grampositiva), *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* (hongos, levadura y dermatofito respectivamente). Las cepas fueron suministradas por el Instituto Colombiano de Seguros Sociales (ISS).

RESULTADOS Y DISCUSION

Característicamente se aislaron dos actinomicetes tipo Nocardioforme, en suelos Alfisoles (Typic Haplustalf, que contienen un horizonte con carbonato de calcio), mientras en

la Sabana de Bogotá, con suelos más ácidos Andosoles (Typic Dystrandept) predominan especies del género **Streptomyces** de acuerdo a muestreos anteriores (no reportados). Dekemaïd & Duran (10) reportan una alta eficiencia para el aislamiento de **Nocardia** del suelo en medios con sales. Por otra parte Küester (11) registra una frecuencia alta (mayor del 60%) de aislamientos de **Streptomyces** en suelos con pH entre 4.7 y 5.2. Estos datos se relacionan con los resultados obtenidos en cuanto a los factores de salinidad y pH.

En cuanto a los métodos de aislamiento realizados para la detección de antibiosis, produjo mejores resultados el de siembra en profundidad de las diluciones seriadas de las muestras del suelo. En todos los medios se observó crecimiento de los microorganismos en estudio, pero solo en las cajas con agar extracto de avena, agar nutritivo y agar dextrosa de papa se presentaron fenómenos de antagonismo microbiano los cuales se hicieron mas notorios a partir del tercer día de incubación. En AN y ADP, los halos de inhibición fueron difusos, mientras en AEA se observan en mayor número como círculos nítidos y transparentes. En el medio con extracto de avena fue posible apreciar varios tipos de antibiosis entre microorganismos: hongo vs hongo, bacteria vs bacteria, bacteria vs hongo y

hongo vs bacteria. El número de actinomycetes aislados fue mayor en las muestras de suelo rizosférico de la gramínea con respecto a la solanácea. (Tabla 2) éstos resultados concuerdan con Küester, 1976 (11) quien ha reportado una alta frecuencia de actinomycetes productores de antibióticos en pastizales.

De las antibiosis detectadas en este ensayo se escogieron dos colonias de actinomycetes, comunes en ambas muestras de suelo. Los actinomycetes se clasificaron preliminarmente a nivel supragenérico, ambos pertenecientes al grupo Nocardioforme, de acuerdo al criterio de Goodfellow, 1988 (5). Estos microorganismos se denominaron "Actinio 1" y "Actinio 2". Al determinar la actividad antimicrobiana con respecto a los testigos, ambos actinomycetes mostraron ser efectivos solo contra **Staphylococcus aureus** (grampositivo), pero no contra las bacterias gramnegativas ni los hongos utilizados (Tabla 3).

Es de gran interés el dato reportado en la literatura sobre la Ristocetina, antibiótico aislado de **Nocardia lurida** efectivo contra bacterias grampositivas y algunas especies de **Mycobacterium**, aunque es de uso restringido por su alta toxicidad (3).

Tabla 2. Estimación del número de actinomycetes aislados de suelos rizosféricos de gramínea y solanácea de la Región xerofítica de La Herrera Cundinamarca.

SITIO	Actinomycetes
(Suelo rizosférico)	(u.f.c./g de suelo+)
PASTIZAL	
Sporobolus lasiophyllus	12.3 x 10 ⁴
MATORRAL MICRONANOFILO	
Solanum lycioides	10.1 x 10 ⁴
+ Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo peso seco.	

Tabla 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los actinomycetes tipo Nocardioforme aislados

	Testigos					
	Bacterias			Hongos		
	S. aureus	E. coli	P. auriginosa	S. typhi	C. albicans	T. mentagrophytes
Actinio 1 +	-	-	-	-	-	-
Actinio 2 +/-	-	-	-	-	-	-
+ = Inhibición total del testigo						
+/- = Inhibición parcial del testigo						
- = No presenta inhibición						

En el presente trabajo se logró aislar dos actinomycetes tipo nocardioforme a partir de suelos rizosféricos de la gramínea **Esporobolus lasiophyllus** y la solanácea **Solanum lyciodes**. Ambos microorganismos presentaron actividad antibiótica contra **Staphylococcus aureus**.

BIBLIOGRAFIA

1. B.S. Desphande, S.S. Ambadkar & J.G. Shewale. Biologically active secondary metabolites from **Streptomyces** Enzyme Microb. Technol. **10**:455 (1988)
2. H.P. Willet. Acción de los agentes quimioterapéuticos. En: W. Joklik, H. Willet & D. Amos (Eds) Zinssez Microbiología. Edit. Médica Panamericana. 17a. Edición. Buenos Aires. (1983).
3. S.A. Waksman, Microbial antagonisms and antibiotic substances. The Common Wealth Fund. New York. 3-18, 38, 152-154. (1974).
4. T.D. Brock & M.T. Medigan. Biology of Microorganisms. 6a. Edición. Prentice Hall. New Jersey. (1991).
5. M.Goofeloww. The Actinomycetes I. En: R.E. & N.E. Gibbons (Eds). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. Edición. The Williams and Wilkins. Baltimore. (1988).
6. H.A. Lechavalier & M.P. Lechavalier. Introduction to the order Actinomycetales. En: M.P. Starr, H. Schlegel (Eds). The Prokariotes. A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer Verlag. Berlin. (1986).
7. IGAC. Estudio general y detallado de los suelos de los Municipios de Cota, Funza, Mosquera y parte de Madrid. IGAC. Bogotá. 158, 193, 396, 483. (1977).
8. D.D. Dingra & J.B. Sinclair. Basic Plant Pathology Methods. CHC Press. Inc. Florida, 255-258. (1989).
9. S.A. Waskman. The Actinomycetes. The Ronald Press Co. New York. (1986).
10. A.V. A.V. Dekomeid & E.L. Duran. The efficiency of $IMNH_4Cl$ and $2MNaCl$ for the isolation of pathogenic Nocardia from soil. Mycopathology. **108** (2):117 (1990).
11. E. Küester, Ecology and Predominance of soil Streptomycetes. En: Azai (Ed). Actinomycetes, the boundary organisms. Symposium, Tokio. (1976).