

CARACTERIZACION GENERICA Y CAPACIDAD ANTIBIOTICA
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE DIFERENTES SUSTRATOS DE
UNA ZONA DEL MUNICIPIO DE PASTO

ANA CRISTINA PANTOJA
FABIOLA ANDREA ROMO RAMIREZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN MICROBIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO

2001

CARACTERIZACION GENERICA Y CAPACIDAD ANTIBIOTICA
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE DIFERENTES SUSTRATOS DE
UNA ZONA DEL MUNICIPIO DE PASTO

ANA CRISTINA PANTOJA

FABIOLA ANDREA ROMO RAMIREZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al titulo de Biólogo con énfasis
en Microbiología

Asesor:

BENJAMIN SAÑUDO SOTELO., I.A.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CON ENFASIS EN MICROBIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO

2001

"Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado
son responsabilidad de sus autores"

Artículo 1° del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966,
Emanado del Honorable Consejo Directivo de la
Universidad de Nariño.

DEDICO A:

DIOS: Fuente de inspiración y sabiduría.

MI MADRE: Por su amor, paciencia y confianza plena.

MIS HERMANOS: Por el consejo, cariño y apoyo, para hacer de mi camino un fácil andar.

MI NOVIO: Por brindarme su amor, comprensión y apoyo incondicional en la culminación de uno de mis ideales.

MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS: Que contribuyeron a que esta idea sea una realidad.

ANA CRISTINA PANTOJA

Este trabajo de tesis está especialmente dedicado, con todo mi agradecimiento, por su apoyo y confianza a:

Mi Padre, Roberto Romo.

Mi Madre, Aydee Ramírez.

Mis Tías, Laura Romo y Alicia Romo.

Mi Abuelita, Angélica Ramírez.

Mi Hermano, Oskar Romo.

Y a todas las personas que estuvieron a mi lado.

FABIOLA ANDREA ROMO RAMIREZ

NOTA DE ACEPTACION

ALVARO PAZOS MONCAYO
Presidente del jurado

LUIS ALFREDO MOLINA VALERO
Jurado

BENJAMIN SAÑUDO SOTELO
Presidente

San Juan de Pasto, Septiembre de 2001

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a:

Benjamin Sañudo Sotelo, Ingeniero agrónomo y profesor de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño.

Alvaro Pazos, Bacteriólogo y profesor de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de Nariño.

Pablo Fernández, Licenciado en Biología y especialista en Microbiología.

Luis Alfredo Molina Valero, I.A., M. Sc. Profesor Titular Fitopatología. FACIA. Universidad de Nariño.

Walter Vallejo, licenciado en sociales y especialista en ecología, encargado del laboratorio dos de Microbiología de la Universidad de Nariño.

Guido Villota, Biólogo con énfasis en Microbiología industrial, encargado del laboratorio cuatro de Microbiología de la Universidad de Nariño.

Oskar Roberto Romo, Maestro en Artes Plásticas. Universidad de Nariño.

Edith Mariela Burbano, Bióloga con énfasis en Microbiología industrial.

Maria Fernanda Arteaga, Bacterióloga de la Universidad de los Andes Bogotá D.C.

A todas las personas que de una u otra forma ayudaron al desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
3. ANTECEDENTES	4
4. MARCO TEORICO	7
4.1 GENERALIDADES	7
4.1.1 Definición	7
4.1.2 Posición sistemática de los actinomicetos	8
4.1.3 Características culturales de la colonia	10
4.1.3.1 Aspecto de la colonia	10
4.1.3.2 Color de la colonia	11
4.1.3.3 Olor de la colonia	11
4.1.3.4 Crecimiento de la colonia en medio sólido y líquido	12
4.1.4 Características morfológicas	13
4.1.4.1 Reproducción de actinomicetos	14
4.1.5 Características ecológicas	15
4.1.5.1 Hábitat de actinomicetos	15
4.1.5.2 Rango de pH	16
4.1.5.3 Rango de Temperatura	16

4.1.5.4 Aislamiento	16
4.1.5.5 Métodos para preservar actinomicetos	17
4.1.6 Importancia de los actinomicetos	18
4.1.6.1 Aspecto clínico	19
4.2 CARACTERISTICAS TAXONÓMICAS	19
4.2.1 Cuadro filogenético	20
4.2.2 Suborden Streptomycineae	21
4.2.3 Suborden Corinebacterineae	22
4.3 ANTIBIÓTICOS	24
4.3.1 Definición	24
4.3.1.1 Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción	24
4.3.1.2 Clasificación de antibióticos según su espectro de actividad	25
4.3.2 Resistencia a los antibióticos	25
4.3.3 Métodos de obtención de antibióticos	26
4.3.3.1 De fuente naturales	26
4.3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos antibióticos de actinomicetos	27
4.3.4.1 Método de diluciones seriadas en agar	27
4.3.4.2 Método de cilindro en placa	27
4.3.4.3 Método de disco	28
4.3.5 Factores que afectan la determinación de sustancias antimicrobianas	28
4.3.6 Antibióticos producidos por los actinomicetos	29
4.3.6.1 Clasificación de las sustancias antibióticas de actinomicetos	31
4.3.6.2 Principales antibióticos producidos por actinomicetos	32

4.4 DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS TESTIGOS	34
4.4.1 Bacterias testigo	34
4.4.1.1 <u>Escherichia coli</u>	34
4.4.1.2 <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	34
4.4.1.3 <u>Staphylococcus aureus</u>	35
4.4.1.4 <u>Bacillus subtilis</u>	35
4.4.2 Hongos dermatofitos testigo	35
4.4.2.1 <u>Trichophytum sp</u>	36
4.4.2.2 <u>Microsporum sp</u>	36
5. METODOLOGIA	37
5.1 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS	37
5.2 PURIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS	39
5.3 CARACTERIZACIÓN PARCIAL	40
5.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	40
5.5 DESCARTE PRELIMINAR	40
5.5.1 Velocidad de crecimiento	41
5.5.2 Fermentación en dos temperaturas	41
5.6 PRUEBAS DE ANTIBIÓISIS	41
5.6.1 Método de siembra central	42
5.6.1.1 Siembra central para bacterias	42
5.6.1.2 Siembra central para hongos	43
5.6.2 Método de siembra en cruz	43
5.6.2.1 Siembra en cruz para bacterias	43
5.6.3 Método de cultivo simultáneo	43

5.6.3.1 Cultivo simultáneo para bacterias	44
5.6.3.2 Cultivo simultáneo para hongos	44
5.6.4 Siembra en medio líquido	44
5.6.4.1 Siembra en medio líquido de bacterias	44
5.6.4.2 Siembra en medio líquido de hongos	44
5.7 PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO	45
5.8 ANTAGONISMO IN VITRO	45
5.8.1 Pruebas con sensidiscos	45
5.8.1.1 Antagonismo sobre bacterias	46
5.8.1.2 Antagonismo sobre hongos	46
6. RESULTADOS Y DISCUSION	47
6.1 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS	47
6.1.1 Análisis de sustratos	47
6.1.2 Análisis de medios de cultivo	50
6.1.3 Interacción sustratos por medios de cultivo	53
6.2 CARACTERIZACIÓN PARCIAL	56
6.2.1 Características culturales y clasificación	56
6.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	75
6.3.1 Géneros identificados	75
6.3.1.1 Género <u>Streptomyces</u>	75
6.3.1.2 Género <u>Nocardia</u>	78
6.4 DESCARTE PRELIMINAR	79
6.4.1 Velocidad de crecimiento	79
6.4.2 Fermentación en dos temperaturas	79

6.5 PRUEBAS DE ANTIBIOSIS	79
6.5.1 Método siembra central	79
6.5.1.1 Siembra central para bacterias	79
6.5.1.2 Siembra central para hongos	81
6.5.2 Método de siembra en cruz	82
6.5.2.1 Siembra en cruz para bacterias	82
6.5.3 Cultivo simultáneo	83
6.5.3.1 Cultivo simultáneo para bacterias	83
6.5.3.2 Cultivo simultáneo para hongos	83
6.5.4 Siembra en medio líquido	84
6.5.4.1 Siembra en medio líquido para bacterias	84
6.5.4.2 Siembra en medio líquido para hongos	85
6.6 ANTAGONISMO CON SENSIDISCOS	85
6.6.1 Antagonismo sobre bacterias	87
6.6.1.1 <u>Bacillus subtilis</u>	87
6.6.1.2 <u>Escherichia coli</u>	87
6.6.1.3 <u>Staphylococcus aureus</u>	90
6.6.1.4 <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	92
6.6.2 Antagonismo sobre hongos	96
6.6.2.1 <u>Trichophytum sp</u>	96
6.6.2.2 <u>Microsporum sp</u>	99
7. CONCLUSIONES	103
8. RECOMENDACIONES	105

9. BIBLIOGRAFIA	106
ANEXOS	112

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparación de los promedios de colonias de actinomicetos por gramo obtenidos en diez sustratos. Prueba de Tukey	48
Tabla 2. Comparación de los promedios de colonias de actinomicetos por gramo obtenidos en siete medios de cultivo. Prueba de Tukey.	51
Tabla 3. Análisis de varianza para número de colonias de actinomicetos por gramo a partir de diez sustratos y siete medios de cultivo.	53
Tabla 4. Número Promedio de colonias de actinomicetos por gramo a partir de diez sustratos y siete medios de cultivo.	54
Tabla 5. Análisis de varianza para halos de inhibición de crecimiento de microorganismos de interés clínico.	86
Tabla 6. Comparación de los promedios de inhibición en mm del crecimiento de <u>Bacillus subtilis</u> .	87
Tabla 7. Comparación de los promedios de inhibición en mm del crecimiento de <u>Staphylococcus aureus</u> .	92
Tabla 8. Comparación de los promedios de inhibición en mm del crecimiento de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> .	94
Tabla 9. Comparación de los promedios de inhibición en mm del crecimiento de <u>Trichophyllum sp.</u>	96

Tabla 10.	Comparación de los promedios de inhibición en mm del crecimiento de <u>Microsporum sp.</u>	99
Tabla 11.	Cepas con capacidad inhibitoria sobre bacterias y hongos	102

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Características macroscópicas y clasificación de actinomicetos	56
Cuadro 2. Siembra central para bacterias	81
Cuadro 3. Siembra central para hongos	81
Cuadro 4. Siembra en cruz para bacterias	82
Cuadro 5. Cultivo simultáneo para bacterias	83
Cuadro 6. Cultivo simultáneo para hongos	83
Cuadro 7. Cultivo en medio líquido para bacterias	84
Cuadro 8. Cultivo en medio líquido para hongos	85

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Promedio de actinomicetos por gramo de suelo a partir de diez sustratos	49
Gráfica 2. Promedio de actinomicetos por gramo de suelo a partir de siete medios de cultivo	52
Gráfica 3. Promedio de halos de inhibición para <u>B. subtilis</u>	88
Gráfica 4. Promedio de halos de inhibición para <u>E. coli</u>	91
Gráfica 5. Promedio de halos de inhibición para <u>S. aureus</u>	93
Gráfica 6. Promedio de halos de inhibición para <u>Ps. aeruginosa</u>	95
Gráfica 7. Promedio de halos de inhibición para <u>Trichophytum sp</u>	97
Gráfica 8. Promedio de halos de inhibición para <u>Microsporum sp</u>	100

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Composición medios de cultivo	113
Anexo B. Preparación de extracto de suelo	117
Anexo C. Preparación de la solución de oligoelementos	118
Anexo D. Principales antibióticos obtenidos a partir de actinomicetos	119

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografía 1. Cepas puras de actinomicetos aislados de diferentes sustratos.	57
Fotografía 2. Características macroscópicas de las mejores cepas de actinomicetos productores de antibióticos.	60
Fotografía 3. Características microscópicas de los filamentos de los géneros <u>Nocardia</u> y <u>Streptomyces</u> .	76
Fotografía 4. Caldos para producción de sustancias antibióticas de cepas de actinomicetos.	80
Fotografía 5. Valoración de antibióticos por método de disco de papel para bacterias.	89
Fotografía 6. Valoración de antibióticos por método de disco de papel para hongos.	98

RESUMEN

El trabajo se realizó desde Noviembre de 1999 a Junio del 2001, se muestrearon 10 sustratos del sector de Mapachico.

El objetivo general de esta investigación fue aislar y caracterizar genéricamente actinomicetos del suelo y probar su efecto sobre bacterias patógenas y hongos dermatofitos, además de determinar el mejor medio de cultivo para su aislamiento.

A partir de los diferentes sustratos se logró aislar colonias de actinomicetos de las cuales se purificaron 89 cepas diferentes que se identificaron como pertenecientes a los géneros Streptomyces y Nocardia.

Para su caracterización parcial se tomaron en cuenta características macroscópicas como aspecto, borde y color de la colonia y microscópicas como la apariencia filamentosa y su coloración con la tinción de Gram según el Manual de Bergey's 1989.

Para reducir el número de cepas y facilitar los procedimientos posteriores fue necesario realizar un descarte preliminar mediante dos factores:

- Velocidad de crecimiento donde se seleccionaron 66 cepas.

- Fermentación en dos temperaturas, obteniendo como resultado 38 cepas con crecimiento filamentosos en medio líquido tanto en temperatura ambiente como en incubadora.

Para la prueba de antibiosis in vitro se trabajó con las 38 cepas seleccionadas, utilizando diversos procedimientos, para los microorganismos testigos, como:

- Método de siembra central
- Método de siembra en cruz
- Cultivo simultáneo
- Prueba en medio líquido

Con las cepas que presentaron actividad inhibitoria se realizó la fermentación para la obtención del antibiótico y proceder así a su valoración con sensibilizados.

Mediante el análisis estadístico (ANDEVA y la Prueba de Significancia de Tukey) se logró determinar lo siguiente:

- El mejor medio de cultivo para el aislamiento de actinomicetos es el agar almidón amoniacal que tiene almidón como fuente de energía y amoniacal como fuente de nitrógeno.

- En cuanto a su actividad inhibitoria se determinó finalmente dos cepas con reacción positiva frente a Escherichia coli, 4 cepas frente a Staphylococcus aureus, 5 cepas frente a Pseudomonas aeruginosa y ocho frente a Bacillus subtilis.

- Se logró determinar, también, que trece cepas de actinomicetos presentaban actividad inhibitoria determinada frente a dos géneros de hongos dermatofitos Microsporum sp y Trichophytum sp con diferente grado de actividad.

SUMMARY

The research was done from November 1999 to Jun 2001. Soil samples were collected from Mapachico area.

The general objective of this research was to isolate and to characterize soil actinomycetes and to value its effect over clinic- interest bacterium and dermatophytes fungus, further, determined the best isolation medium.

Four hundred twenty three isolates were obtained from soil sample and 89 different strains from those were purified and identified as Streptomyces and Nocardia.

The strains were characterized partially by microscopic (aspect, border and colony colour) and microscopic features, such as filamentous appearance and Gram staining according to Bergey's Manual.

In order to reduce strain number and facilitate posterior procedures some strains were discarded by two factors:

- Growth velocity 66 strains were selected by this method.
- 38 strains were obtained by two- temperature fermentation. The strains showed filamentous growth in liquid medium.

38 selected strains were used in antibiosis assay which was carried out by different procedure for each standard microorganism.

- Culture method.
- Culture cross method.
- Simultaneous culture.
- Liquid- medium assay.

The strains that showed inhibitory activity were employed to produce antibiotics by fermentation and thus followed with measurements by sensidisc.

By statistical analysis (ANOVA, Tukey significance test) was determined following.

- The best medium for isolating actinomycetes was ammoniac starch agar, which has starch as sole carbon source and ammoniac as sole nitrogen source.
- What concern inhibitory activity determined finally two positive strains in relation to E. coli, four ones S. aureus and five ones Ps. aeruginosa and eight ones in relation to B. subtilis.
- It was possible to determine that 13 actinomycetes strains showed specific inhibitory activity in relation to two dermatophytic fungus genus, Microsporum sp and Trichophyton sp which has different.

GLOSARIO

ACTINOMICETO. Grupo intermedio entre las bacterias y los hongos verdaderos, son microorganismos gram (+), algunos ácido resistente y la mayoría aerobios. Forman filamentos finos ramificados que pueden persistir o fragmentarse.

AEROBIO. Un microorganismo capaz de usar Oxígeno en la respiración

ANAEROBIO. Un organismo que no puede usar oxígeno en la respiración.

ANTAGONISMO. Que tiene una acción opuesta a otro microorganismo.

ANTIBIOGRAMA. Indican la sensibilidad de los organismos aislados clínicamente a los antibióticos de uso actual.

ANTIBIÓTICO. Sustancias químicas producidas principalmente por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos.

BACTERIA. Un grupo de procariotes filogenéticamente relacionados y distinto del grupo Archaea.

CRECIMIENTO. Un incremento en el número de células.

DERMALOFITO. Hongos que atacan a la piel, el cuero cabelludo, cabello y uñas, produciendo diferentes síntomas, tanto en el hombre como en los animales y son preocupación de la ciencia médica.

ESTÉRIL. Ausencia de todos los organismos vivos y de virus.

EUCARIOTA. Una célula que posee núcleo encerrado en una membrana nuclear y normalmente otros orgánulos.

FERMENTACIÓN. Catabolismo anaerobio en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación del sustrato.

GÉNERO NOCARDIA. Bacterias que desarrollan un micelio fugaz que se fragmenta con facilidad a bacilos y diamantes cocoides. Gram (+) a gram variables. Aerobio.

GÉNERO STREPTOMYCES. Bacterias que desarrollan un micelio permanente, Gram positivas y de apariencia polvosa debida a la esporulación.

GÉNERO. Colección de las diferentes especies que comparten una o más propiedades principales.

GRAM NEGATIVA. Un tipo de célula procariota cuya pared contiene relativamente poca cantidad de peptidoglicano, pero que contiene una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y otras macromoléculas complejas.

GRAM POSITIVAS. Un tipo de célula procariota cuya pared está compuesta básicamente por peptidoglicano y carece de la membrana externa.

HONGOS. Microorganismos eucarióticos no fotosintéticos que poseen paredes celulares rígidas.

INHIBICIÓN. La reducción del crecimiento microbiano a causa de una disminución del número de organismos presentes o de alteraciones en el entorno microbiano.

MESÓFILO. Un organismo que crece a temperaturas entre 20 y 45°C.

METABOLISMO PRIMARIO. Un metabolismo excretado durante la fase de crecimiento.

METABOLISMO SECUNDARIO. Un metabolismo excretado al final de la fase primaria de crecimiento o en la fase estacionaria.

METABOLISMO. Todas las reacciones bioquímicas de una célula.

MICROAERÓFILO. Un organismo aeróbico que puede crecer solamente cuando la tensión de oxígeno es inferior a la del aire.

MICROBIOLOGÍA. Estudio de los microorganismos, estudia células vivas y como funcionan.

MICROORGANISMO. Un organismo microscópico constituido por una sólo célula o agrupación de células, incluyendo los virus.

PEPTIDOGLICANO. Es una molécula polisacárida formada por la repartición de unidades alternativas de acetilglucosamina y ácido acetilmurámico, que forman capas adyacentes que se unen a través de puentes peptídicos.

PROCARIOTA. Una célula que carece de verdadero núcleo.

PSICRÓFILO. Un organismo con temperatura óptima de crecimiento de 15°C o inferior y una máxima inferior a 20°C.

RESISTENCIA AL ANTIBIÓTICO. La capacidad adquirida por un microorganismo para crecer en presencia de un antibiótico frente al cual el microorganismo es eventualmente sensible.

RESISTENCIA. Defensa de los microorganismos al ataque de un antibiótico.

RIZOSFERA. La región inmediatamente adyacente a las raíces de la planta.

TAXONOMÍA. Ciencia que estudia la clasificación, identificación y nomenclatura de los organismos.

TÉCNICA ASÉPTICA. Métodos para mantener estériles los medios de cultivo y otros objetos estériles libres de contaminación microbiana durante las manipulaciones.

TERMÓFILO. Un organismo cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 45 y 80°C.

**CARACTERIZACION GENERICA Y CAPACIDAD ANTIBIOTICA
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE DIFERENTES SUSTRATOS DE UNA
ZONA DEL MUNICIPIO DE PASTO ***

Por

ANA CRISTINA PANTOJA

FABIOLA ANDREA ROMO RAMIREZ

1. INTRODUCCION

Las sustancias antimicrobianas en general y los antibióticos en particular, son compuestos químicos biosintetizados por ciertos hongos, bacterias y en su gran mayoría por actinomicetos, para la lucha contra infecciones en el hombre y los animales ocasionados por los microorganismos, los cuales en algunas oportunidades desarrollan respuestas de resistencia a la aplicación de estas sustancias.

En las últimas décadas se han realizado investigaciones que han llevado al descubrimiento de varios centenares de nuevos compuestos químicos en el campo de los antibióticos.

Algunos de ellos son de gran utilidad y su empleo ha traído notables beneficios a la medicina, a la agricultura y a la actividad pecuaria¹

¹ Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de Biólogo con énfasis en Microbiología, bajo la presidencia del Doctor Benjamín Sañudo Sotelo I.A. MSc.

Por ello, el estudio de los actinomicetos es de suma importancia, por la gran variedad de antibióticos que de ellos se han logrado obtener, en su mayoría con especial significado terapéutico.

Con el fin de continuar con estos estudios, surgió la idea de realizar la presente investigación, para determinar la variedad de actinomicetos a partir de diversos sustratos edáficos obtenidos en una zona del municipio de Pasto.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en una investigación cuyo objetivo general fue caracterizar genéricamente y evaluar la capacidad antibiótica de actinomicetos aislados de diferentes sustratos. Para estos fue necesario probar y evaluar distintos medios de cultivo, logrando estandarizar el más eficaz para su aislamiento. Los actinomicetos purificados se clasificaron a nivel de género, probando su capacidad antibiótica frente a bacterias y hongos de interés clínico, así mismo, se estableció una colección básica que proporcionará información esencial para facilitar posteriores trabajos de tipo industrial.

En el departamento de Nariño es el primer trabajo realizado en el aspecto de aislamiento y caracterización de actinomicetos a partir del suelo, presentándose dificultad en cuanto a información, manipulación y preservación de estos microorganismos. Las pruebas estadísticas utilizadas para la interpretación de resultados fueron el análisis de varianza y la prueba de significancia de Tukey.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéricamente y evaluar la capacidad antibiótica de actinomicetos aislados de diferentes sustratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Evaluar siete medios de cultivo y estandarizar el más eficaz para el aislamiento de actinomicetos del suelo.

2.2.2 Identificar a nivel de género los actinomicetos aislados a partir de diferentes sustratos.

2.2.3 Determinar la producción de antibióticos y probar la capacidad inhibitoria frente a bacterias y hongos de interés clínico.

3. ANTECEDENTES

La humanidad se ha visto afectada por numerosas enfermedades de carácter infeccioso a lo largo de la historia y la búsqueda de medios de defensa contra las mismas ha constituido un trabajo permanente en el campo de la medicina humana y veterinaria.

En un principio solo se aplicaban normas higiénicas de acuerdo con el sentido común; más tarde aparecieron otros mecanismos más precisos, como la vacunación, para dar finalmente paso al uso de diversas sustancias químicas empleadas en forma directa contra los agentes patógenos.

En el siglo XVI, Paracelsus recomienda el antimonio en el tratamiento de numerosas enfermedades y el mercurio en tratamientos de sífilis. La identificación de las bacterias por medio del microscopio a finales del siglo XIX, permitió a Paul Ehrlich iniciar la búsqueda de nuevas sustancias químicas antibacterianas, sentando bases científicas e introduciendo el término quimioterapia (Cruz, 1993).

Hacia 1913, Waksman inicia el estudio de distintos tipos de microorganismos que se encuentran en el suelo en distintos estratos de profundidad y los cultivo en medios especiales, bajo condiciones adecuadas. Encontró muy pocos patógenos, lo cual era extraño si se tiene en cuenta que a través de los excrementos de los animales muertos estos

microorganismos llegan al suelo. Se pensó entonces que eran incapaces de vivir allí o eran destruidos por otros microorganismos (Franco, 1999).

En 1917, Greig Smith confirmó que los actinomicetos del suelo eran capaces de realizar fenómenos de antagonismo, inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos (Escobar, 1998).

En 1923, Dubos, colaborador de Waksman aisló un bacilo del suelo que destruía la cápsula que rodea los neumococos haciéndolos vulnerables. En 1939, aisló la Tirotricina a partir de microorganismos del suelo, dando inicio a una línea de investigación para constituirse como un gran aporte a la ciencia en especial a la lucha contra agentes causantes de algunas enfermedades (Cercos, 1957).

Posteriormente, en 1942, se logró obtener la Estreptomicina a partir de un actinomiceto, la cual presentó excelentes resultados contra muchos microorganismos Gram negativos.

Desde 1945, han sido aislados y caracterizados miles de antibióticos producidos por hongos, actinomicetos o bacterias. Sin embargo, el descubrimiento de la penicilina, despertó un gran interés por la búsqueda de nuevos microorganismos del suelo productores de sustancias con propiedades antibióticas.

Las primeras investigaciones sobre la actividad antibiótica de los actinomicetos, empieza en 1980. Gasparini observó que un microorganismo, Streptothrix foersteri, crecía sobre cultivos de bacterias y hongos, causando su muerte y la lisis de sus paredes celulares. Este

parece ser el primer experimento que puso de manifiesto el marcado efecto antagónico de los actinomicetos (Cercos, 1957).

4. MARCO TEORICO

4.1 GENERALIDADES

4.1.1 Definición. Los actinomicetos aparentemente forman, un grupo intermedio entre las bacterias y los hongos verdaderos. Ellos se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, algunos ácido resistentes y la mayoría aerobios, aunque existen especies anaerobias y microaerofílicas; forman filamentos finos ramificados que pueden persistir o fragmentarse en elementos cocoides o bacilares. Generalmente son inmóviles en su parte vegetativa; sin embargo, se conocen algunas formas de motilidad (Brook, 1998; Andrews, 1973; Waksman, 1952; Davis, 1968).

El grupo está constituido por organismos mesófilos con una temperatura óptima para las formas saprófitas de 25°C y para los parásitos de 37°C, reportándose además algunas especies termófilas. Pueden desarrollarse en una atmósfera que contenga 10% de CO₂ y en medios alcalinos (Bryan, 1976; Davis, 1968).

Constituyen un gran número de especies, algunas ubicadas en géneros conocidos y otras en cambio sin identificar completamente (Franco, 1999; Prescott, 1999).

La composición de la pared celular varía mucho según los grupos, y tienen una importancia taxonómica considerable. Cabe distinguir cuatro tipos principales de pared celular según la composición y estructura del peptidoglicano (Prescott, 1999).

Los actinomicetos tienen una especial importancia práctica. Son fundamentalmente habitantes del suelo y allí están ampliamente distribuidos. Pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos y son cruciales en la degradación de la materia orgánica (Nayena, 1991).

Estos microorganismos producen la mayor parte de los antibióticos naturales de importancia clínica. Aunque la mayoría de los actinomicetos son organismos de vida libre, algunos son patógenos para los seres humanos, ciertos animales y algunas plantas (Prescott, 1999; Brock, 1998).

4.1.2 Posición sistemática de los actinomicetos. La posición sistemática de los actinomicetos es aún dudosa en el sistema de clasificación microbiológica. Los bacteriólogos los ubican dentro de los Schizomycetes (bacterias), pero si se admite que pertenecen a los hongos, su puesto está dentro de los Deuteromycetes (Bayona, 1999; Davis, 1968; Andrews, 1973; Waksman, 1952).

Algunos bacteriólogos han relacionado este grupo con las bacterias debido a diferentes propiedades:

- Ellos son procarióticos (ausencia de membrana nuclear).

- ❑ La morfología y tamaño de las hifas y conidias de los actinomicetos son similares estructuralmente a las encontrados en bacterias.
- ❑ Sus paredes celulares contienen ácido murámico y ácido diaminopimérico, (lisina) en algunas especies, los cuales son componentes característicos de las paredes bacterianas, en contraste con la pared celular fúngica que contiene quitina y glucanos.
- ❑ Los actinomicetos reaccionan a la tinción de Gram al igual que las bacterias.
- ❑ Presentan intolerancia a las condiciones ácidas.
- ❑ Se han observado que algunas especies patógenas para el hombre son anaerobias, diferenciándose notablemente de los hongos verdaderos ya que estos requieren oxígeno para crecer.
- ❑ Su crecimiento es inhibido por penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas y otras drogas antimicrobianas, las cuales son inocuas para los hongos.
- ❑ Las esporas que producen ciertos actinomicetos son idénticas a las que presentan las bacterias (Nayena, 1991; Kwapinski, 1972; Andrews, 1973; Waksman, 1952; Davis, 1968).

A pesar de su ubicación dentro de las bacterias, su relación con los hongos puede observarse en las siguientes propiedades:

- ❑ Forma un micelio ramificado característico al de los hongos.
- ❑ Se reproduce por medio de esporas, artrosporas, microconidias.
- ❑ Presenta un micelio aéreo, en el extremo de cada filamento se desarrollan cadenas de esporas asexuales llamadas conidias, que son estructuras correspondientes a los hongos.

- El crecimiento en cultivo líquido no se aprecia como enturbamiento, que si se observa en las bacterias.
- El crecimiento no es exponencial como el de las bacterias (Nayena, 1991; Andrews, 1973; Waksman, 1952; Davis, 1968).

4.1.3. Características culturales de la colonia

4.1.3.1. Generalidades de la colonia. Las colonias de los actinomicetos están formadas por filamentos finos de 0.5 a 1.2 micras de diámetro, con ramificaciones que se fragmentan para producir esporas, pero otras en cambio permanecen enteras (Holt, 1989).

Los actinomicetos presentan una fragmentación de hifas que se rompen en bastones y cocos y además llegan a ser colonias desmenuzables y quebradizas. En las cepas de ciertos géneros la colonia llega a estar cubierta con micelio aéreo libre, o por hifas erectas cubiertas de una capa hidrofóbica, estas hifas son inicialmente blancas, pero luego adquieren una gama de coloración, cuando se ha iniciado la formación de esporas y las colonias se tornan pulverulentas o aterciopeladas con un aspecto seco, que se adhieren en el medio exhibiendo con frecuencia pliegues radiales. En este momento es cuando realmente pueden ser distinguidas de colonias de bacterias comunes (Cross, 1989; Bryan, 1976).

La densidad y consistencia de la colonia, dependerán de la composición del medio y del tipo de actinomiceto. Sin embargo, para una misma especie, su morfología puede cambiar, de acuerdo con el medio de cultivo; por ejemplo colonias café, brillantes y duras, de una especie de Streptomyces que se encuentra sobre agar nutritivo, pueden ser

transformadas en colonias amarillas brillantes, con un micelio blanco pulverulento y con espirales de artrosporas, cuando el microorganismo es subcultivado en medios más adecuados (Cross, 1989; Rodríguez, 1998; Holt, 1989)

4.1.3.2. Color de la colonia. Los actinomicetos producen una amplia variedad de pigmentos responsables del color del micelio vegetativo y aéreo. El color difundido por los pigmentos puede ser también formado al extenderse produciendo uno o más antibióticos (Holt, 1989).

Según Bergey's 1989, los actinomicetos presentan cerca de siete series de colores: azul, gris, verde, rojo, violeta, blanco y amarillo. Subsecuentemente, las series se extiende para acomodar colores adicionales (Holt, 1989).

El color de las masas de esporas es un criterio ventajoso, pero su determinación puede presentar algunos problemas. De esta manera, el color puede ser influenciado por factores semejantes como el medio, temperatura, pH, régimen de crecimiento, edad del cultivo y en algunos casos de la iluminación (Holt, 1989).

4.1.3.3. Olor de la colonia. Es característico el olor a tierra húmeda de las colonias, dado por la geosmina (Trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol) y metil isoborneol, compuestos volátiles comunes de los estreptomicetos que se producen como metabolitos secundarios, subsecuentes al crecimiento de la hifas (Schlegel,1992)

4.1.3.4. Crecimiento de la colonia en medio sólido y líquido. El medio debe contener los nutrientes necesarios para el crecimiento y el desarrollo de la cepa productora de la sustancia antibiótica, lo mismo que el principio fermentescible (Aguirre, 1992; Espinosa, 1978)

Los actinomiceto utilizan como fuente de carbono, a los ácidos orgánicos, lípidos, proteínas y polisacáridos, tales como celulosa, almidón y quitina obteniendo energía para su crecimiento (Holt,1989)

Pueden crecer bien en medios líquidos y sólidos, en cultivos en profundidad se requiere una adecuada aireación y agitación. El crecimiento en medio líquido se observa como una suspensión de colonias discretas y fragmentos de micelio y en medio de cultivo sólido las colonias al diferenciarse desarrollan una apariencia micelial (Schlegel,1992; cruz,1993)

Muchos actinomicetos crecen sobre medios comúnmente utilizados en laboratorio, como agar bacteriológico, y agar soya tripticasa (A.S.T.), pero para lograr la diferenciación y desarrollo de esporas características y de pigmentos, tiene que desarrollarse en medios de cultivos preparados magistralmente en el laboratorio, ya que muchos de estos medios no son obtenidos de proveedores comerciales (Cross, 1989).

Algunos actinomicetos anaerobios presentan requerimientos nutritivos diferentes, como también son hábiles para atacar y descomponer ciertos nutrientes. Dependiendo de ello, los medios de cultivo deben tener ciertas características que los hagan fermentecibles. Para las

formas del suelo, se obtienen buenos resultados con los medios Sapek-Dor y otros similares principalmente inorgánicos (González, 1990).

4.1.4. Características morfológicas. Los actinomicetos muestran un notable orden de formas macroscópicas semejantes, como pigmentación de esporas, micelio de sustrato y exopigmentos difusibles, al mismo tiempo con la morfología de las colonias y textura del micelio aéreo. Estas características morfológicas han sido ampliamente usadas en la clasificación e identificación, sin embargo la morfología es considerada como demasiado variable para tomarse como un carácter taxonómico (Holt, 1989; Brock, 1998; Prescott, 1999).

Estos organismos muestran también, un notable orden de formas microscópicas donde se hace necesario la utilización de herramientas como el microscopio que nos permitan visualizar y determinar otros rasgos morfológicos de los actinomicetos, como:

- a) **Micelio:** en los actinomicetos estas estructuras pueden ser estables o fugaz, puede fragmentarse, presentándose adherido al medio como "micelio sustrato" y en la superficie se aprecia como micelio aéreo. Esta estructura puede romperse intercaladamente en vesículas que contienen o no esporas.

- b) **Conidios:** son esporas producidas por hifas especializadas, que no se encuentran intercaladas como en clamidosporas o encerradas como en las esporangiosporas. La forma de los conidios en los actinomicetos es variable, estos

pueden ser sencillos termoestables, sencillos no termoestables, conidias pares, cadenas cortas o cadenas largas de conidias.

c) **Esporangios:** bolsas que contienen esporas que pueden estar sobre hifas aéreas o sobre micelio de sustrato.

d) **Otras estructuras:** muchos actinomicetos forman estructuras inusuales como "Esporangios multiloculares", otros en cambio forman estructuras espirales en la hifa aérea (Holt, 1989; Prescott, 1999).

4.1.4.1. Reproducción de actinomicetos. Los actinomicetos no tienen diferenciación aparente de sexo y no se observa una evidencia del fenómeno sexual, tal como se ve en los mohos (Cruz, 1995).

La reproducción de una spora o de fragmentos de micelio se desarrollan en forma de hifas que penetran en el agar y en hifas que se ramifican repetitivamente llegando a estar ligadas unas con otras sobre la superficie del agar, hasta formar una colonia dura y correosa (Cruz, 1995)

Las esporas asexuales formadas en el micelio aéreo, se desarrollan por tabiques en la punta de los filamentos, en general en respuesta a la privación de nutrientes. La mayoría no son especialmente termoresistentes, pero soportan bien la desecación y por lo tanto tienen un considerable valor adaptativo (Prescott, 1999).

4.1.5 Características ecológicas

4.1.5.1 Hábitats de los actinomicetos. De la rizosfera proviene la gran mayoría de los microorganismos aislados para realizar estudios de antibióticos, determinándose que por gramo de suelo existen de uno a diez millones de actinomicetos. Esta cantidad varía por diversos factores tales como, la naturaleza físico-química, temperatura, pH, cobertura, marcha de las estaciones, etc., existiendo una relación estrecha entre la fertilidad del suelo y la cantidad de microorganismos existentes en él (Cercos, 1957).

El término actinomicetos encierra un amplio número de bacterias cuyos hábitats predominantes son sustratos naturales como suelos, partículas de polvo, aguas y la superficie de plantas en donde juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica animal y vegetal (Bryan, 1996).

Las especies saprófitas terrestres subsisten en el suelo y atacan las sustancias orgánicas presentes como proteínas, almidones y grasas, descomponiéndolas para crear así fuente de carbono y energía, base del mantenimiento junto con compuestos inorgánicos simples (Bryan, 1996).

Los actinomicetos abundan más en suelos secos que en los húmedos así como se desarrollan también en suelos alcalinos, en estas condiciones pueden sobrepasar en número a las bacterias. Como son aerobios su número disminuye con la profundidad (Burbano, 1991).

4.1.5.2 Rango de pH. En general los actinomicetos prefieren un medio ligeramente alcalino para su desarrollo, pero pueden crecer en rangos de 3.5 y 7.5, con un pH óptimo para su desarrollo entre 5.5 y 7.2 (Burbano, 1991).

4.1.5.3 Rango de temperatura. De acuerdo a los rangos de temperatura los actinomicetos pueden ser psicrófilos, mesófilos y algunas especies pueden ser termófilas. La temperatura optima para las especies mesófilas oscila entre 25°C y 35°C. Los actinomicetos termoresistentes se desarrollan entre temperaturas de 50°C y 65°C (Holt, 1957).

4.1.5.4. Aislamiento. Para aislar una población de actinomicetos que sea representativa en un ecosistema en particular, se debe prestar atención al hacer el muestreo. Las muestras deben ser colectadas tan asépticamente como sea posible con ayuda de espátulas estériles, guantes, bolsas plásticas (Freeman, 1989).

Los muestreos deben ser identificados completamente con descripción y fecha. Los aspectos climáticos y estacionales de recolección deben ser considerados como una característica de una población autóctona verdadera que puede ocurrir transitoriamente. En el laboratorio las muestras deben ser examinadas de forma inmediata y almacenadas toda la noche a pantalla, protegiéndolas para minimizar las posibilidades de infestación con otros microorganismos (Cercos, 1957).

El aislamiento no selectivo de actinomicetos del suelo y lodos, deben ser secados en cajas petri estériles en un cuarto a temperatura ambiente por 3- 10 días (dependiendo de la

cantidad de humedad), para ayudar así a reducir la población bacteriana (Cercos, 1957; Aguirre, 1982).

Otro procedimiento de aislamiento mas selectivo que ha sido designado para la inhibición del crecimiento de microorganismos competidores es la adición al medio de sustancias antibióticas tales como ciclohexamida y nistatina en concentraciones cercanas de 50-100 microgramos por litro (Holt, 1989; Sañudo, 1998).

4.1.5.5. Métodos de preservación para los actinomicetos. La transferencia cada dos o cuatro meses en medio agar adecuado, con almacenamiento a 4°C es satisfactorio para la mayoría de cepas de Nocardia. La preservación a largo plazo puede ser lograda por liofilización en leche descremada (Hopwood y Ferguson, 1969).

El almacenamiento por periodos mas cortos puede ser efectuado usando unas capas de aceite mineral estéril, de tal manera que la cepa quede cubierta, almacenandola a 4°C. Los cultivos líquidos pueden ser congelados rápidamente y almacenados a -25°C hasta -70°C en nitrógeno líquido. (Holt, 1989).

Métodos para tiempos de preservación cortos

- ❑ Cultivos inclinados almacenados a 4°C o temperatura ambiente.
- ❑ Suspensiones en agar semisólido en 4°C (Kutzner, 1972).
- ❑ Suspensiones en 10% (v/v) glicerol en -20°C (Wellington y Williams, 1978).

Métodos para tiempos de preservación largos

- ❑ Cultivo inclinado almacenado a -20°C (Tresner et al, 1960).
- ❑ Cultivo de suelo estéril (Pridham et al, 1973).
- ❑ Almacenaje bajo nitrógeno líquido (Pridham y Hesseltine, 1975).

4.1.6 Importancia de los actinomicetos. La importancia de estos organismos en el suelo, no ha sido claramente definida. Sin embargo hay evidencia de que participen en los siguientes procesos:

1. Descomposición en el suelo de compuestos estables de plantas y animales. Los actinomicetos no se incrementan en número al añadir al suelo material rico en carbono, lo que demuestra que no compiten con las bacterias; sin embargo, posteriormente, cuando solo permanecen los compuestos muy estables, son efectivos competidores de bacterias y hongos.
2. Formación de humus. Muchas razas han sido capaces de formar en laboratorio las moléculas aromáticas consideradas como importantes en la fracción húmica del suelo.
3. Transformaciones a altas temperaturas en abonos verdes estiércol y compost.
4. Agentes causantes de ciertas enfermedades en las plantas, animales y en el hombre.
5. Son antagonistas de otros microorganismos por los antibióticos que producen.
6. Los actinomicetos y sus productos pueden ser utilizados en el control de hongos patógenos en los suelos.

7. Desempeñan un papel importante en la fertilidad del suelo (Bayona, 1999; Prescott, 1999)

4.1.6.1. Aspecto clínico. Gran número de especies son patógenas para el hombre, animales y plantas. Entre las especies patógenas para el hombre las más conocidas son:

- Actinomyces bovis, el cual causa actinomicosis caracterizada por la formación de tumores supurativos. Otros como la Nocardia asteroides y especies relacionadas producen unos trastornos locales característicos semejantes a la tuberculosis, llamada Nocardiasis (Jawetz, 1990; Davis, 1989; Quentin, 1991).
- Existen especies que son responsables de enfermedades en las plantas, conocidas con el nombre de roñas cuyo agente causal es Streptomyces scabies (Takeushi, T et al, 1992; González, 1980; Solano, 1976).
- Investigaciones adicionales han determinado que Streptomyces griseus causa infecciones en gatos (Bakerspiger, 1973).

4.2. CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS

Un sistema de clasificación respaldado por la Sociedad de Bacteriólogos Americanos y acogido internacionalmente, fué publicado en el Manual de Bergey's donde se dividen a los actinomicetos en ocho grupos basándose en propiedades como la disposición de conidios, la presencia de esporangios, el tipo de pared celular y los azúcares de extracto celular.

En la segunda edición del Manual de Bergey's se dedica el volumen cuatro, al estudio de estos organismos, clasificando a estas bacterias con alto contenido en guanina y citocina filogenéticamente, empleando los datos de r RNA 16s (Holt, 1989; Prescott,1999).

Las bacterias con alto contenido en G+C del volumen II de la primera edición van a ser combinadas con los actinomicetos para formar una nueva clase, Actinobacteria, con sus subórdenes y familias revisadas (Prescott, 1999).

El sistema de clasificación de actinomicetos abarca un amplio número de microorganismos, por lo que fué necesario hacer énfasis en los géneros productores de antibióticos, de los cuales se realizará una breve descripción.

4.2.1 Cuadro filogenético

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Suborden: Streptomycineae

Familia: Streptomycetaceae

Género: Streptomyces

Suborden: Corinebacterineae

Familia: Nocardiaceae

Género: Nocardia (Holt, 1989)

4.2.2 Suborden Streptomycineae. Este suborden posee solo una familia Streptomycetaceae, y un género Streptomyces.

Familia Streptomycetaceae

Estos microorganismos producen un talo vegetativo y aéreo, los cuales no se fragmentan. Presentan conidios que son originados en esporóforos. Aproximadamente ciento cincuenta especies han sido diferenciadas por colores del micelio, actividad proteolítica (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Género Streptomyces

Es un género enorme que presenta aproximadamente quinientas especies. Los miembros de este género son aerobios estrictos, su pared celular es de tipo I, y forman cadenas de esporas individuales, con una vaina fina y fibrosa. Los conidios de cada cadena a menudo están pigmentados y pueden ser de una textura lisa, peluda o espinosa. Normalmente se encuentran más de tres conidias por cadena (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Las especies de Streptomyces se denominan mediante una mezcla de características morfológicas y fisiológicas, incluyendo las siguientes:

El color de los micelios aéreo y de sustrato, la disposición de las esporas, las características superficiales de la spora, la utilización de carbohidratos, la producción de antibióticos, la

síntesis de melanina, la reducción de nitrato y la hidrólisis de urea y ácido hipúrico (Prescott, 1999; Holt, 1989).

Los Streptomyces son muy importantes, tanto desde el punto de vista ecológico como médico. El hábitat natural de la mayoría de los estreptomicetos es el suelo, donde constituyen entre el 1% y el 20% de la población cultivable (Prescott, 1999; Holt, 1989).

Los estreptomicetos son flexibles desde el punto de vista nutricional y pueden degradar sustancias resistentes como la peptina, lignina, queratina, quitina, látex y compuestos aromáticos (Prescott, 1999; Holt, 1989).

Los estreptomicetos son mejor conocidos por sintetizar una extensa variedad de antibióticos, algunos de los cuales son útiles en medicina y en investigación biológica (Prescott, 1999; Holt, 1989; Kwapinski, 1972).

4.2.3 Suborden Corinebacterineae. Este suborden contiene cinco familias con varios géneros bien conocidos que se incluyen en varias secciones de la primera edición del manual de Bergey's (Holt, 1989).

Familia Nocardiaceae

Esta familia está compuesta por dos géneros, el más importante Nocardia, estas bacterias desarrollan un micelio en el sustrato que se fragmenta con facilidad a bacilos y elementos cocoides. Tienen un alto contenido en G+C, como otros actinomicetos, la mayoría de las especies poseen un peptidoglicano con ácido meso- diaminopimérico y sin puente peptídico

de unión. La pared celular contiene un hidrato de carbono compuesto de arabinosa y galactosa, presenta ácidos micólicos (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Género Nocardia

El término Nocardioforme significa actinomicetos que forman un micelio fugaz que se rompe en elementos bacilares o cocoides. Presentan hifas vegetativas rudimentarias o extensamente ramificadas, casi siempre hay formación de hifas aéreas que son visibles únicamente al microscopio. Forman cadenas largas o cortas de conidias, que pueden encontrarse ocasionalmente sobre las hifas aéreas y más raramente sobre las hifas vegetativas, no forman endosporas, ni esporangios (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Gram positivos a Gram variables, algunas cepas poseen un estado de crecimiento rápido, parcialmente ácido, aerobio, mesofílico, tienen un tipo de metabolismo oxidativo, son catalasa positivos. El género Nocardia es abundante y está ampliamente distribuido en el suelo. Algunas cepas son patógenas oportunistas de hombres y animales (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Los pigmentos celulares pueden ser de un blanco opaco, gris, amarillos, naranjas, rosados, rojos, de color canela. Los pigmentos solubles cuando están presentes son indistinguibles, el micelio aéreo visible a simple vista puede faltar, ser escaso o muy abundante, por tanto las colonias pueden tener una apariencia superficial tersa, o más comúnmente un aspecto aterciopelado (Holt, 1989; Prescott, 1999).

4.3 ANTIBIÓTICOS

4.3.1 Definición. Los antibióticos se los ha definido de muchas maneras; sin embargo, todos los autores coinciden en que son sustancias químicas producidas principalmente por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Los antibióticos difieren entre sí marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, espectro antibacteriano y espectro de acción (Brock, 1998; Cercos, 1957; Prescott, 1999; Walter, 1955).

4.3.1.1 Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción

1. Sustancias que afectan la función de los ribosomas bacterianos, causando inhibición irreversible de la síntesis de proteínas.
2. Sustancias que afectan el metabolismo del ácido nucleico. (Florent, 1985; Hostalex, 1979; Berdy, 1985).
3. Sustancias que inhiben la síntesis de pared celular bacteriana, o activan las enzimas que rompen dicha pared, causando pérdida de la viabilidad y a menudo la lisis celular.
4. Sustancias que actúan directamente sobre la membrana celular, afectando su permeabilidad y produciendo filtración de compuestos celulares (Florent, 1985; Hostalex, 1979; Berdy, 1985).

4.3.1.2 Clasificación de los antibióticos según su espectro de actividad

1. Antibióticos de espectro reducido: actúa solo sobre un único grupo de microorganismos, son valiosos para el control de microorganismos que no responden a otros antibióticos.
2. Antibióticos de espectro intermedio: aquí se incluyen antibióticos que actúan sobre cocos Gram positivos, Enterobacterias y otros aerobios comunes.
3. Antibióticos de amplio espectro: todos los antibióticos que son capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos que se incluyen en este grupo. Su espectro de acción abarca la mayoría de bacterias Gram positivas, Gram negativas y otros microorganismos (Brock, 1998; Prescott; Berdy, 1985).

4.3.2 Resistencia a los antibióticos. Es la capacidad adquirida por un microorganismo para resistir la acción de un antibiótico ante el cual es normalmente susceptible. No todos los antibióticos actúan frente a todos los microorganismos, la resistencia a los antibióticos puede ser una propiedad inherente a un microorganismo o puede ser adquirida.

La resistencia inherente puede darse por:

- a) Carencia de la estructura sobre la cual actúa el antibiótico.
- b) El organismo puede ser impermeable al antibiótico.
- c) El organismo puede ser capaz de alterar el antibiótico, pasándolo a una forma inactiva.
- d) El organismo puede modificar la molécula diana del antibiótico.

- e) Por intercambio genético puede tener lugar la alteración de una vía metabólica que bloquee el agente antimicrobiano.
- f) El organismo puede ser capaz de bombear hacia fuera el antibiótico que va entrando hacia la célula (eflujo) (Brook, 1998).

4.3.3 Métodos de obtención de antibióticos. Existen tres métodos de obtención

4.3.3.1 De fuentes naturales. La mayoría de los antibióticos se obtienen como producto de la fermentación de los microorganismos, ya sea como metabolitos primarios, o metabolitos secundarios. En la fermentación es fundamental tener en cuenta algunas condiciones que deben controlarse para una efectiva manipulación del proceso. Estas variables se miden en forma continua y son principalmente las siguientes: temperatura, pH, velocidad de agitación, cantidad de oxígeno disuelto, adición de nutriente; y en forma discontinua: biomasa, formación de producto, consumo de sustrato ((Brock, 1998; Prescott, 1999; Berdy, 1985).

Existen dos sistemas de fermentación: el sistema abierto o continuo en donde todos los materiales que componen el sistema pueden entrar y salir simultáneamente, lo cual permite que estos continúen en contacto con el medio ambiente (Florent, 1985; Hostalex, 1979; Berdy, 1985).

El sistema cerrado o intermitente en el cual no hay intercambio de materiales. Las técnicas para la realización de los cultivos discontinuos dependen de si el proceso es anaerobio o aerobio. En el proceso aerobio el cultivo puede hacerse en superficie o sumergido. En las

fermentaciones anaerobias los recipientes usados son sellados y se inyecta CO₂ u otro gas inerte en lugar de oxígeno (Florent, 1985; Berdy, 1985).

La obtención de antibióticos de fuentes naturales es uno de los métodos mas empleados para la producción de estas sustancias (Clariodge, 1979).

4.3.4 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos antibióticos de actinomicetos. Existen diferentes métodos encaminados a la determinación a la acción antimicrobiana de sustancias antibióticas entre ellos:

4.3.4.1 Métodos de diluciones seriadas en agar. Este método es rápido y no requiere una muestra estéril de antibiótico permite el uso de varios microorganismos de control simultáneamente y se puede emplear para probar la actividad antimicrobiana de sustancias que no se disuelven en agua. Es uno de los métodos mas empleados para evaluaciones preliminares de material crudo (Frobisher, 1957; Pérez, 1963).

4.3.4.2 Método de cilindro placa. Este método consiste en medir la actividad antimicrobiana de sustancias tales como antibióticos mediante la inhibición de gérmenes sensibles, bien sea por una acción bactericida, bacteriostática o bacteriológica, gracias a la difusión que se presenta a través de un medio de cultivo sólido. Es uno de los métodos mas antiguos y el procedimiento es el comúnmente utilizado para las valoraciones de los antibióticos (Frobisher, 1957; Pérez, 1963).

4.3.4.3 Método de disco. Tiene como fundamento la inhibición del crecimiento de los gérmenes sensibles por antibiótico absorbido en discos de papel, que se difunde a través del medio de cultivo sólido.

Este método es menos exacto que el anteriormente descrito pero es más rápido y económico, se emplea para muchos propósitos, entre ellos:

- Determinación de la actividad de nuevos antibióticos.
- Determinación de la resistencia o sensibilidad de las cepas de los microorganismos a los antibióticos (Frobisher, 1957; Pérez, 1963).

4.3.5 Factores que afectan la producción de sustancias antimicrobianas. Existen varios factores que afectan la determinación de sustancias con actividad antimicrobiana, los cuales deben tenerse en cuenta, entre ellos se pueden mencionar los siguientes:

MEDIO INADECUADO: la composición del medio es factor determinante en la producción de antibiótico, es posible que se forme la sustancia, pero al no estar en condiciones óptimas puede degradarse irreversiblemente, sin que sea posible detectarla en los procesos siguientes.

EL ANTIBIÓTICO NO ES EXCRETADO EN EL MEDIO: hay ocasiones en las cuales el antibiótico no se excreta en el medio de cultivo.

TIEMPO DE FERMENTACION INADECUADA: muchas veces no se puede detectar un antibiótico porque su concentración en el medio es baja, la producción de la sustancia se incrementa al máximo con el tiempo y esta cantidad puede persistir o disminuir con el transcurso del mismo, por esta razón es conveniente:

- Determinar la actividad del medio a intervalos de tiempo, cuando el periodo de incubación es de varios días o semanas.
- Contaminación: la presencia de colonias contaminantes puede incidir en la producción de la sustancia, es posible que estas colonias modifiquen el pH del medio, o que influyan en la elaboración de sustancias extracelulares como enzimas que alteran o destruyen el producto fermentado.
- Cepa de control inadecuada: el uso de cepa de control inadecuada puede dar resultados falsos. No todos los antibióticos son efectivos contra los mismos microorganismos, sino que existe una acción selectiva frente a ellos (Rodríguez, 1998; Cruz, 1995).

4.3.6 Antibióticos producidos por los actinomicetos. El estudio de la producción de antibióticos en el suelo es de gran interés dado que crea enormes problemas cuya solución podría indicarnos cual es el papel representado por los antibióticos en la naturaleza, el que representan dentro del proceso evolutivo y su importancia como regulador de enfermedades o como promotores del crecimiento de bacterias, hongos y plantas superiores (Cercos, 1957).

La distribución de los actinomicetos, así como la producción de los antibióticos por determinadas especies, no es uniforme ni constante; existen ciertas especies que producen

determinados antibióticos, o diversas especies que sintetizan varios antibióticos o una sola especie que libera diferentes principios antimicrobianos (Cercos, 1957).

Waksman, Schatz y Reynolds, citados por Cercos (1957) formularon los siguientes postulados respecto a los antibióticos producidos por los actinomicetos:

- Ciertos cultivos de actinomicetos son muy activos sobre hongos y poseen efectos limitados sobre bacterias.
- Ciertos cultivos son principalmente activos contra ciertos actinomicetos y posee efecto limitado sobre bacterias.
- Gran número de actinomicetos afectan algunos miembros del género *Mycobacterium* en forma notable, pero no actúan sobre bacterias o solo lo hacen en forma limitada.
- Muchos actinomicetos son activos sobre bacterias Gram negativas y *Mycobacterium*, pero no sobre bacterias Gram positivas.
- Diversos actinomicetos son activos, tanto sobre bacterias Gram positivas con las siguientes variaciones:
 - a) Algunos son más activos sobre bacterias Gram positivos.
 - b) Algunos son más activos sobre bacterias Gram negativos.
 - c) Algunos son igualmente activos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
 - d) Ciertos actinomicetos actúan sobre bacteriófagos cuya actividad puede o no extenderse a la bacteria huésped.

- La producción de antibióticos por parte de los actinomicetos esta sujeta a los siguientes factores:
 - a) Género, especie o cepa.
 - b) Medio de cultivo.
 - c) Condiciones del cultivo.

Los géneros de actinomicetos mas activos son: Streptomyces, en segundo lugar Nocardia y en tercer lugar Actinomyces. El género Streptomyces es responsable por la producción de cerca del 70% de los antibióticos utilizados (Cercos, 1957).

4.3.6.1 Clasificación de las sustancias antibióticas de actinomicetos. Waksman y Lechevalier, 1951 clasificaron las sustancias antibióticas de los actinomicetos en dos grupos principales:

1. **GRUPO DE LA STREPTOMICINA:** Estreptomicina y neomicina, compuestos básicos solubles en agua, insolubles en solventes inorgánicos, son activos sobre micobacterias.
2. **GRUPO DE LA CLOROMICETINA:** Acreomicina y terramicina, compuestos neutros o anfotéricos inestables, y solubles en solventes orgánicos, activos sobre rikettsias y virus de tamaño grande.

Al estudiar un actinomiceto productor de antibiótico recién aislado, se lo sitúa dentro de estos dos grupos, al observar su comportamiento en la determinación del espectro antimicrobiano (Cercos, 1957)

4.3.6.2 Principales antibióticos producidos por actinomicetos. Existen actinomicetos que tienen aplicabilidad en la producción de antibióticos que contienen aminoácidos y péptidos. La cicloserina puede ser producida por cultivos de Streptomyces orchidaceus, S. lavendulae, S. garyphalus y S. roseochromogenes; inhibe la síntesis de pared celular, es muy efectiva contra Mycobacterium (Bayona, 1989).

También se han reportado en la producción de antibióticos cromopéptidos, este grupo incluye actinomicinas las cuales son producidas como mezclas de sustancias muy similares por distintas especies de estreptomicetos, especialmente Streptomyces antibioticus y S. chrysomayus (Cruz, 1995; Memorias Primer Congreso Internacional de Microbiología Industrial).

Las actinomicinas son muy tóxicas causando daño al hígado y al riñón, pero son beneficiosas en el tratamiento de tumores. La actinomicina mas importante que se utiliza en la quimioterapia del cáncer es la dactinomicina (actinomicina C1) (Bayona, 1989).

La valinomicina, producido por Streptomyces fulvissimus, no tiene importancia clínica pero encuentra amplio uso en la investigación bioquímica como agente para el desacoplamiento de la defosforilación oxidativa (Bayona, 1989).

Los antibióticos del grupo virginamicina son principalmente efectivos contra bacterias Gram positivas y son utilizadas ampliamente como promotores del crecimiento para aves de corral, cerdos y terneros. Los compuestos mas importantes producidos comercialmente son las minamicinas y las virginamicinas producidas por Streptomyces mitakaensis o S. virginiae (Bayona, 1989).

La clorocardicina es un antibiótico B-lactámico obtenido a partir de Streptomyces sp (Bayona, 1999; Cruz, 1995).

La levendomicina es un nuevo antibiótico aislado de un cultivo de Streptomyces lavendulae (Bayona, 1999; Cruz, 1995).

La trienomicina fue aislada de un cultivo de Streptomyces sp (Bayona, 1999; Cruz, 1995).

La serirubicina y la 1- hidrox-serirubicina: son nuevos antracíclicos aislados de un cultivo de Streptomyces syaenus (Bayona, 1999; Cruz, 1995).

La sohbumicina es igualmente un antibiótico nuevo aislado de un cultivo de Streptomyces sp (Bayona, 1999; Cruz, 1995) (Anexo D).

4.4. DESCRIPCION DE MICROORGANISMOS TESTIGOS

4.4.1 Bacterias testigo.

4.4.1.1 Escherichia coli. La mayoría son bacilos cortos Gram negativos con un tamaño dentro del rango de 1.05 micras por 2.0 a 6.0 micras. Colonias opacas o parcialmente translúcidas y de consistencia homogénea, crecen generalmente en agar nutritivo, presenta abundante crecimiento en medios artificiales, muchas cepas son capsuladas y no esporuladas. Su temperatura optima de crecimiento es de 30°C a 37°C (Freegman, 1989).

Son anaerobios facultativos, presentan un metabolismo respiratorio y fermentativo. En su tratamiento se han empleado con éxito sulfonamidas, ampicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, tetraciclinas y aminoglicosidos (Freegman, 1989).

4.4.1.2 Pseudomonas aeruginosa. Bacilos Gram negativos de aproximadamente 0.6 por 2.0 micras, es un microorganismo extremadamente adaptable que puede utilizar mas de 80 compuestos orgánicos para su crecimiento. Produce un pigmento verde-azuloso (piocianina) que se difunde en el medio. Crece bien entre 30°C y 37°C (Freegman, 1989; Jawetz, 1990).

En su tratamiento suele emplearse ticarcilina, piperacilina, carbenicila ya sea solas o en asociación con aminoglicosidos (Freegman, 1989; Jawetz, 1990).

4.4.1.3 Staphylococcus aureus. Cocos Gram positivos con 1 micra de diámetro aproximadamente, son colonias opacas, circulares producen un pigmento amarillo, crecen abundantemente en medios artificiales y especialmente en medios con infusión cerebro corazón o con sangre de cordero. No son esporulados y generalmente se agrupan en racimos. Temperatura optima de crecimiento 30°C a 37°C (Joklik, 1987; Freegman, 1989; Jawetz, 1990).

Se combatió con penicilina, pero pronto resulto que este microorganismo era uno de los patógenos mas hábiles para desarrollar resistencia a los antibióticos, de allí deriva la importancia de continuar la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana (Freegman, 1989).

4.4.1.4 Bacillus subtilis. Bacilos rectos Gram positivos, presentan motilidad, forman cadenas, son esporulados y aerobios, las células típicas miden 1 micra por 3 a 4 micras, actualmente móviles en los cultivos jóvenes, en medios de agar o gelatina se desarrollan formando una película seca rugosa. Su temperatura optima de crecimiento es de 37°C, pero se obtiene crecimiento entre 12°C y 45°C (Joklik, 1987; Jawetz, 1990).

4.4.2 Hongos dermatofitos testigo. Los hongos dermatofitos atacan a la piel, el cuero cabelludo, el cabello y las uñas, produciendo diferentes síntomas, tanto en el hombre como en los animales y son preocupación de la ciencia medica (Barnett, 1960; Conant, 1972; Jawetz, 1966).

Dichos microorganismos tienen el suelo como hábitat principal de donde se originan las infecciones primarias para luego diseminarse en forma rápida en la naturaleza. Varias especies son cultivables en pelos estériles a los que disuelven en segmentos ya que son capaces de utilizar la queratina contenida en ellos (Barnett, 1960; Conant, 1972; Jawetz, 1966).

Los hongos dermatofitos comprenden dos géneros: Trichophytum sp y Microsporum sp.

4.4.2.1 Trichophytum sp. Presenta un aspecto algodonoso, granular, polvoriento, velloso, liso o cereo. La pigmentación es variada blanca, rosada, roja, púrpura, violeta, anaranjada, amarilla o parda. Por examen microscópico se ve gran número de microconidias en forma de pequeñas estructuras en masa, hialinas, de pared delgada, unicelulares, de 2 a 4 micras, que se originan en grupos o racimos o nacen aisladamente a los lados de las hifas (Barnett, 1960; Conant, 1972; Jawetz, 1966)

4.4.2.2 Microsporum sp. Esta formado por un micelio algodonoso, lanudo, enmarañado o polvoriento cuyo color varía de blanco a matices mas intensos de pardo. Por observación microscópica la pared espinosa de las macroconidias, caracteriza al género. Sus esporas pueden ser pequeñas o grandes, fusiformes u ovales, de pared gruesa o delgada, en los lados de las hifas crecen pequeños microconidias, unicelulares de 3 a 6 micras en masa. Presenta hifas tabicadas, en raqueta, pectinadas, cuerpos nodulares y clamidoconidias (Barnett, 1960; Conant, 1972; Jawetz, 1966).

5. METODOLOGIA

5.1 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS

Se trabajo con diez sustratos de suelos, de jardín, de pradera natural, de suelo agrícola fértil, de suelo agrícola de mediana fertilidad, de suelo agrícola de baja fertilidad, de suelo de zanja, de suelo de bosque natural, de suelo de bosque artificial, de lombricompostos y de residuos orgánicos descompuestos, que fueron tomados en el sector de Mapachico, Municipio de Pasto, a 2710 m.s.n.m..

El muestreo se realizó en cada uno de los sitios, haciendo huecos a una profundidad de 30 cm, tomando la muestra de las paredes en cantidad suficiente para el análisis de laboratorio, aproximadamente 500 gramos de cada sustrato. Los instrumentos utilizados para este procedimiento se lavaron y desinfectaron previamente con alcohol etílico del 96%.

Se prepararon siete medios de cultivo estándar, agar almidón amoniacal, agar asparagina, agar caseina almidón, agar glucosa asparagina, agar sucrosa almidón, agar benedict, agar A.V. (Anexo A, Anexo B y Anexo C). Los medios se esterilizaron y antes de vertirlos en cajas petri estériles se adiciona una solución antibiótica en proporción de 1 ml por cada 100 ml de medio; ésta solución se preparó en un litro de agua destilada estéril agregando 0.5 gramos de nistatina y 0.25 gramos de ciclohexamina.

Para el aislamiento de los microorganismos de las muestras de suelo, se empleó la técnica de los platos de dilución, con cada uno de los sustratos y los diferentes medios de cultivo estándar. Este método fue seleccionado de otros existentes tales como el método de la inoculación directa, el método del agar en placa bacteriana, el método del suelo enriquecido y del agotamiento, porque la técnica de dilución es el método que permite aislar con mayor facilidad los microorganismos con actividad antimicrobiana de las muestras de suelo (Waksamm, 1947; Wolf, 1949; Skinner, 1964; Smith, 1963; Waksman, 1963).

De cada uno de los sustratos utilizados se hicieron diluciones en agua destilada, para ello se prepararon 10 erlenmeyers pequeños con 90ml de agua destilada estéril, se rotularon con cada uno de los sustratos. De forma aséptica y en balanza analítica, se pesaron 10 gr de cada uno de los suelos y se adicionaron a los erlenmeyers con agua destilada estéril obteniendo así la dilución 10^{-1} de la cual se siguieron haciendo diluciones seriadas en tres repeticiones hasta la dilución 10^{-5} en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril (González, 1990; Brook, 1998).

Para el procedimiento de siembra se empleó únicamente las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} por ser las más probables para el aislamiento de actinomicetos según (Waksamm, 1947; Wolf, 1949; Skinner, 1964; Smith, 1963; Waksman, 1963).

De las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de los diez sustratos utilizados, se tomaron alícuotas de 1 ml y se vierten en cajas petri estériles debidamente rotulada a las cuales se agregaron los medios de cultivo a evaluar, a una temperatura de 40°C a 45°C. Las cajas se incubaron a

temperatura ambiente por 15- 30 días, después de los cuales se realizó el conteo de las colonias aisladas.

Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza y a la prueba significativa de Tukey, para determinar cual factor (medio de cultivo y sustrato) tiene un efecto significativo en el crecimiento de los actinomicetos (variable dependiente), mostrando las interacciones significativas entre los factores, seleccionando así estadísticamente el mejor medio de cultivo y el mejor sustrato en el aislamiento de actinomicetos del suelo.

5.2 PURIFICACION DE ACTINOMICETOS

Para purificar las poblaciones de actinomicetos aislados de las muestras, se prepararon tubos de ensayo con el mejor medio de cultivo esterilizado e inclinado, empleando el método de siembra en estrías. Para ello, con un asa de punta estéril, se tomó una pequeña cantidad de cada una de las colonias aisladas y se esparció sobre el medio inclinado, haciendo que las estrías sean cada vez más amplias, para extender mejor el cultivo. Luego se hizo la incubación a 25°C por 10 a 15 días y las cepas purificadas se conservaron a temperatura ambiente (15°C).

Este proceso se repitió para cada colonia, las veces que fue necesario hasta lograr cultivos puros.

5.3 CARACTERIZACION PARCIAL

Las colonias se caracterizaron parcialmente, considerando parámetros macroscópicos, como:

Forma: circular, irregular.

Aspecto: seco, terroide.

Color: blanco, amarillo, café, lila, rosado, curuba, verde.

Borde: entero, filamentosos.

Elevación: elevada, convexa.

Superficie: rugosa, seca pulverulenta. (Verna, 1967; Fobisher, 1957).

5.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de los aislados se trabajó con la tinción de Gram y características morfológicas que aparecen en el manual de Bergey's clasificando así los principales géneros de actinomicetos productores de antibióticos (Toro, 1983).

5.5 DESCARTE PRELIMINAR

De ochenta y nueve cepas aisladas se realiza una clasificación teniendo en cuenta dos factores:

5.5.1 Velocidad de crecimiento. Para este procedimiento se utilizan cajas petri con el mejor medio de cultivo, dividiendo la caja en cuatro cuadrantes. En cada uno de los cuáles, con una asa de transferencia se hace una pequeña estría proporcional al cuadrante de cada una de las cepas de actinomicetos. Se incuba a 28°C por 15 días, realizando control diario examinando la aparición de las colonias de actinomicetos después de seis días, las cuales son pequeñas, redondas, opacas, levantadas, fuertemente adheridas al medio, cubriéndose más tarde por una esporulación densa y un olor a tierra húmeda.

5.5.2 Fermentación en dos temperaturas. De las cepas seleccionadas en el procedimiento anterior, se realizaron fermentaciones en dos temperaturas, con el fin de seleccionar cepas que presenten crecimiento filamentoso en medio líquido.

Para este procedimiento se preparan botellas con 100ml del mejor medio de cultivo sin agar, las cuales se inoculan con una asa de transferencia, cada cepa de actinomiceto. Una repetición se deja a temperatura ambiente y la segunda repetición se incuba a 28°C, durante 30 días con agitación manual diaria de quince minutos (Sañudo, 1998).

Después del periodo de incubación se determina crecimiento filamentoso utilizando tinción de Gram para cada una de las botellas.

5.6 PRUEBAS DE ANTIBIOSIS

Para este procedimiento se trabajó con seis microorganismos testigos, que corresponden a cuatro bacterias (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y

Bacillus subtilis) y dos hongos dermatofitos (Trichophyllum sp y Microsporum sp), obtenidos en el cepario de microbiología de la Universidad de Nariño y en el Hospital Departamental de Pasto.

En la elección de los microorganismos testigos se intento conformar un conjunto de modo tal que permitiera cubrir un espectro amplio para estudiar mejor la actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados de las muestras de suelo.

Estos microorganismos testigos se mantuvieron durante el tiempo de trabajo a 4°C en tubos de agar nutritivo (Bacterias) y APG (Hongos) inclinado, cada vez que fue necesario el empleo de los microorganismos de control se hizo confirmación de pureza por medio de tinciones y observaciones microscópicas.

Para las pruebas de antibiosis fue necesario realizar varios tratamientos preliminares que condujeron a determinar la mejor técnica, descartando cepas con una baja o nula capacidad antibiótica inhibitoria.

5.6.1 Método de la siembra central. Cada actinomiceto se sembró en 3 repeticiones en cajas petri con el medio seleccionado, haciendo una línea central con un asa de transferencia, impregnada del actinomiceto, de tal manera que queden dos espacios en la caja. Se incubó a 28°C por 7 días (Brook, 1998, Sañudo 1998; Escobar 1998).

5.6.1.1 Siembra central para bacterias. Una vez determinado el crecimiento y la esporulación del actinomiceto en la franja central, en cada espacio libre de la caja con un

asa de transferencia mediante estrías se inoculó la bacteria testigo. Se incubó por 24 horas a 37°C y se determinó la inhibición.

5.6.1.2 Siembra central para hongos. Una vez determinado el crecimiento y esporulación del actinomiceto, en cada espacio libre de la caja, se inoculó por punción con una asa de punta cada uno de los hongos dermatofitos. Se incubó a 25°C por 5 días y se determina inhibición.

5.6.2 Método de la siembra en cruz. Cada cepa de actinomiceto se sembró en tres cajas petri, haciendo una cruz, quedando cuatro espacios en la caja. Se incubó a 28°C por 7 días (Sañudo 1998; Escobar 1998).

5.6.2.1 Siembra en cruz para bacterias. Determinado el crecimiento del actinomiceto, con un asa de transferencia se inoculó en cada línea las bacterias testigo, llegando el rayado hasta casi la línea de crecimiento del actinomiceto. Se incubó a 37°C por 24 - 48 horas y se evaluó la inhibición.

5.6.3 Método de cultivo simultáneo. Este método permitió utilizar un mayor número de actinomicetos por caja. En cada caja petri estéril con el mejor medio se siembra cuatro aislados diferentes. La siembra se realizó dividiendo la caja en cuatro cuadrantes en cada uno de los cuales se hizo un rayado de cada actinomiceto con asa de punta. Se incubó a 28°C por 7 días (Sañudo 1998).

5.6.3.1 Cultivo simultáneo para bacterias. Una vez alcanzado un completo crecimiento del actinomiceto se inoculó la bacteria testigo, realizando un rayado con asa de transferencia, en toda la caja evitando hacer contacto con los actinomicetos, se incubó a 37°C por 24 horas, y se determinó la inhibición.

5.6.3.2 Cultivo simultáneo para hongos. Se realizó el mismo procedimiento de las bacterias, después de determinado el crecimiento de los actinomicetos, se inoculó mediante punción central el hongo dermatofito, se incubó a 25°C por 5 días y se determinó la inhibición.

5.6.4 Cultivo en medio líquido. Se prepararon tubos con 10 ml del mejor medio pero sin agar. Se inoculó cada uno de los actinomicetos y se incubó a 28°C por 7 días, hasta observar crecimiento, notado por el cambio de coloración del medio (Sañudo 1998; Escobar 1998).

5.6.4.1 Cultivo en medio líquido para bacterias. Una vez alcanzado el crecimiento del actinomiceto se le inocula la bacteria testigo. Se incuba nuevamente a 37 ° C por 24 a 48 horas, determinando luego la presencia o ausencia de las células bacterianas, mediante la tinción de Gram.

5.6.4.2 Cultivo en medio líquido para hongos. Este procedimiento también se hizo para hongos, una vez determinado el crecimiento, se inoculó a cada muestra el hongo respectivo y se incubó nuevamente a 25°C por 5 días, para determinar crecimiento o inhibición del microorganismo testigo mediante la tinción con lactofenol.

Los procedimientos preliminares utilizados llevan a descartar cepas que presentan una actividad inhibitoria nula o baja. Facilitando el trabajo posterior, utilizando únicamente las cepas con mayor capacidad antagónica.

5.7 PRODUCCION DEL ANTIBIÓTICO

Los mejores actinomicetos productores de antibióticos eficaces contra bacterias y contra hongos dermatofitos, se llevaron a botellas previamente esterilizadas con 100 ml del mejor medio de cultivo sin agar, después de la siembra se incubo a 28°C por 30 días, sometidos a agitación constante, en una plancha de agitación de 120-150 r.p.m. para evitar la formación de filamentos, grumos o esferas.

Después del período de incubación se filtro a través de algodón y papel filtro (estériles). El líquido obtenido se lleva a cajas de petri estériles, donde se introducen discos de papel filtro que se elaboraron colocando de manera sucesiva una sobre otra, 4 hojas de papel filtro, obteniendo sensidiscos semejantes al comercial con un diámetro de 0.5 y un peso de 0.010 gr cada uno. Por 24 horas, se dejan para que se impregnen de antibiótico y se esterilizan en luz ultravioleta por 24 horas.

5.8 ANTAGONISMO IN VITRO

5.8.1 Antagonismo con sensidiscos. Con cada uno de los microorganismos testigos (bacterias y hongos), se trabajo con un diseño irrestrictamente al azar, en el que los tratamientos corresponden a los actinomicetos seleccionados.

5.8.1.1 Antagonismo sobre bacterias. Por actinomiceto y cada bacteria se emplean 3 cajas petri con medio de cultivo, haciendo un rayado denso de la bacteria con escobillón estéril, (tubo N° 3 escala de MacFarland, con una concentración de 9ml por 10^8), colocando luego 5 sensidiscos equidistantemente. Se incuban por 24-48 horas a 37°C y al cabo de este período se determinó el área de inhibición.

Los resultados obtenidos se interpretaron por medio del análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de significancia de Tukey.

5.8.1.2 Antagonismo sobre hongos. Por actinomiceto y cada hongo se emplearon 3 caja petri con el medio de cultivo adecuado haciendo un rayado denso con escobillón estéril tomando una cantidad de esporas del hongo. Se incubó a 25°C por 2-5 días y se determinó halos de inhibición.

Los resultados obtenidos se interpretaran por medio del análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de significancia de Tukey.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS

El diseño empleado para el aislamiento fue irrestrictamente al azar con dos factores, dos errores y tres repeticiones, utilizando 210 unidades experimentales. El factor A corresponde a los sustratos y el factor B a los medios de cultivo.

Las colonias aisladas se multiplican por el factor de dilución y las poblaciones por gramo de sustrato se sometieron al análisis estadístico, obteniendo los siguientes resultados:

6.1.1 Análisis de sustratos. Los actinomicetos están ampliamente distribuidos en una gran variedad de sustratos; se encuentran en la superficie del suelo, así como en los horizontes inferiores (Burbano, 1989;

Prescott, 1999). Por esta razón fue posible hallar representantes de este grupo microbial en todos los sustratos analizados.

La materia orgánica del suelo es sin duda uno de los materiales más complejos que existen en la naturaleza. Todos los residuos de plantas y animales retornan al suelo y son sometidos a la descomposición por los microorganismos donde juegan un papel importante los actinomicetos (Burbano, 1989). Ello sustenta el porque la variabilidad de cepas

encontradas y la heterogeneidad en el número de colonias, de acuerdo con el sustrato utilizado.

TABLA 1

**COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE COLONIAS DE ACTINOMICETOS
POR GRAMO OBTENIDOS EN DIEZ SUSTRATOS. PRUEBA DE TUKEY**

	BOSQUE NAT.	R.O.D	A. BAJA FERTIL	BOSQUE ART.	PRADERA NATURAL	ZANJA	AGRICOLA FERTIL	A. MEDIANA FERTIL.	LOMBRIC OMPUEST	JARDIN
	222.44	204.39	151.85	142.45	128.05	94.95	86.29	47.21	31.84	9.68
9.68	212.76x	194.71x	142.17x	132.77 x	118.37 x	85.27 x	76.61 x	37.53 NS	22.16 NS	
31.84	190.6x	172.55x	120.01x	110.61 x	96.21 x	63.11 NS	54.45 NS	15.31 NS		
47.21	175.23x	157.18x	104.64x	95.24 x	80.84 x	47.74 NS	39.08 NS			
86.29	136.15x	118.1x	65.56NS	56.16 NS	41.76 NS	8.66 NS				
94.95	127.49x	109.44x	56.9NS	47.5 NS	33.1 NS					
128.05	94.39x	76.34x	23.8NS	14.4 NS						
142.45	79.99x	61.94NS	9.4NS							
151.85	70.59x	52.54NS								
204.39	18.05NS									
222.44										

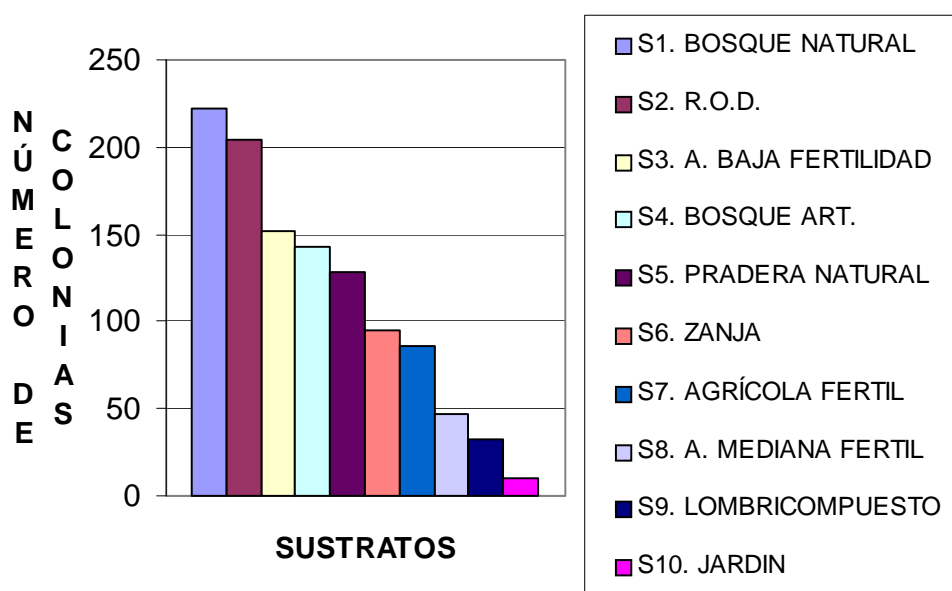
TUKEY 5%= 66.33

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

En la tabla anterior se observan poblaciones promedio que oscilan entre 9.68 y 222.43 colonias por gramo de sustrato, encontrándose las menores en suelo de jardín, lombricompostos y suelo de mediana fertilidad, sin diferencias significativas entre si. En cambio, las mayores poblaciones fueron obtenidas en el bosque natural, con diferencias significativas respecto a los diferentes sustratos utilizados, excepto con residuos orgánicos descompuestos (Gráfica 1). Al respecto, Burbano, (1989) indica que en terrenos vírgenes, los actinomicetos constituyen del 10 al 50% de la comunidad total, por el método de placa.

GRÁFICA No. 1 PROMEDIO DE ACTINOMICETOS POR GRAMO A PARTIR DE 10 SUSTRATOS



De otra parte los actinomicetos son afectados directamente por la presencia de carbono aprovechable y se presentan en cantidades especialmente grandes en terrenos con abundante presencia de materia orgánica. En general los lugares con grandes materiales carbonados y de humus presentan cifras mayores que los hábitats pobres en materia orgánica (Burbano, 1989; Bayona, 1999).

Lo anterior indica que en sustratos donde ha ocurrido una gran mineralización de la materia orgánica, la población decrece, debido a la ausencia de fuentes de energía complejas y a la competencia que sufren por altas poblaciones de hongos y bacterias presentes. En cambio, cuando los sustratos presentan altos contenidos de materia orgánica sin descomponer, en donde hay materiales carbonados complejos de difícil degradación por bacterias y hongos, las poblaciones de actinomicetos se elevan significativamente, debido a su capacidad de biodegradación de sustancias orgánicas de alto peso molecular.

La adición de nutrientes orgánicos tales como derivados proteicos, restos de cultivo y estiércol de animal, aumentan la abundancia de los actinomicetos, por lo que es común que en un suelo fertilizado con estos materiales tenga más actinomicetos que los sitios adyacentes que no están fertilizados (Burbano, 1989; Andrews, 1973; Waksman, 1952; Bayona, 1999).

6.1.2 Análisis de medios de cultivo. Se obtuvo poblaciones de actinomicetos en promedio de 64,12 a 159,55 colonias por gramo de suelo, al analizar siete medios de cultivo, determinándose que agar Benedict fue el medio menos favorable debido posiblemente a la dificultad de los actinomicetos de utilizar eficientemente el glicerol como fuente de energía

y la arginina como fuente de nitrógeno, mostrando diferencias significativas respecto a los demás medios de cultivo (Gráfica 2).

TABLA 2

**COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE COLONIAS DE ACTINOMICETOS
POR GRAMO OBTENIDOS EN SIETE MEDIOS DE CULTIVO. PRUEBA DE
TUKEY**

	AL. AMONICAL	CASEINA ALMIDON	GLUCOSA ASPARAG.	SUCRO SA AL.	A.V.	ASPARAGI NA	BENEDICT
	159.55	125.45	118.7	116.74	107.49	91.36	64.12
64.12	95.43x	61.33x	54.58x	52.62x	43.37x	27.24x	
91.36	68.19x	34.09x	27.34x	25.38 x	16.13x		
107.49	52.06x	17.96x	11.21NS	9.25NS			
116.74	42.81x	8.71NS	1.96NS				
118.7	40.85x	6.75NS					
125.45	34.1x						
159.55							

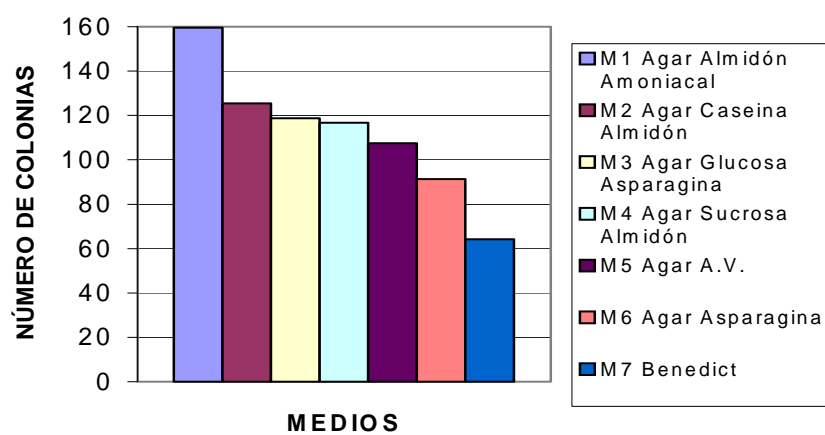
TUKEY 5%= 13.40

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

Al contrario, se pudo determinar que el mejor medio para el aislamiento y la purificación de actinomicetos, fue el agar almidón amoniacal, ya que fue el medio que mejor favoreció el crecimiento de esta población de manera significativa, con respecto a los medios restantes. Este medio contiene almidón, que es la fuente de energía de fácil degradación por los actinomicetos; además posee sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, y contiene compuestos inorgánicos que son importantes en los procesos del metabolismo bacteriano, en nuestro caso de los actinomicetos (Waksman, 1945; Prescott, 1999).

GRÁFICA No. 2 PROMEDIO DE ACTINOMETROS POR GRAMO A PARTIR DE SIETE MEDIOS DE CULTIVO



6.1.3 Interacción sustratos por medios de cultivo. El tamaño de la comunidad depende del tipo de suelo, particularmente, de algunas de las características físicas, del contenido de la materia orgánica y del pH del medio ambiente.

En investigaciones ecológicas realizadas anteriormente es notable que las poblaciones de actinomicetos no parecen afectarse por la composición del medio, lo cual indica que estos microorganismos pueden utilizar una gran variedad de nutrientes orgánicos (Burbano, 1989; Prescott, 1999; Andrews, 1973; Waksman, 1952; Bayona, 1999).

TABLA 3
ANALISIS DE VARIANZA PARA NUMERO DE COLONIAS DE
ACTINOMICETOS POR GRAMO A PARTIR DE DIEZ SUSTRATOS Y SIETE
MEDIOS DE CULTIVO

FV	GL	SC	CM	FC	Ft	
					1%	5%
Sustrato	9	974254.51	108550.50	29.4 ^{XX}	3.46	2.39
Error A	20	73623.5	3681.75			
Medios	6	157435.4	26239.23	21.28 ^{XX}	2.80	2.09
Sustrato x medio	54	874627.59	16196.81	13.14 ^{XX}	1.59	1.39
Error B	120	147937.33	1232.81			

FV factor variable.
GL grados de libertad.
SC suma de cuadrados
CM cuadrados de medios
FC frecuencia calculada.
Ft frecuencia tabulada.

(XX) Diferencias altamente significativas

De acuerdo con el sustrato, puede haber preferencias de los actinomicetos por determinado medio de cultivo, encontrándose en el análisis de varianza (Tabla 3) diferencias altamente significativas respectivamente para sustratos y medios de cultivo, así como para la interacción de los dos factores puesto que la variedad de estos organismos en el suelo es grande y pueden presentarse sucesiones grupales, de acuerdo con las fuentes de energía de los nichos y de las relaciones benéficas o de competencia que se dan con otros grupos microbiales.

TABLA 4
NUMERO PROMEDIO DE COLONIAS DE ACTINOMICETOS POR GRAMO A
PARTIR DE DIEZ SUSTRATOS Y SIETE MEDIOS DE CULTIVO

	ALMIDON AMONIACAL	ASPARAGINA	CASEINA ALMIDON	GLUCOSA ASPARAGINA	SUCROSA ALMIDON	BENEDICT	A.V.	MEDIA DEL SUSTRATO
JARDIN	31.47	1	1	1	16.16	16.16	1	9.68
PRADERA NATURAL	318.45	140.57	1	195.3	1	140.57	99.47	128.05
AGRI. FERTIL	190.40	41.13	89.61	133.75	1	1	147.19	86.30
MEDIANA FERTILIDAD	1	78.87	1	125.29	122.3	1	1	47.21
BAJA FERTILIDAD	153.43	50.34	175.93	198.79	164.97	153.47	166.06	151.85
ZANJA	182.14	62.54	140.57	67	130.7	24.46	57.24	94.95
BOSQUE NATURAL	227.5	174.26	263.95	244.72	211.01	238.56	197.05	222.43
BOSQUE ARTIFICIAL	140.57	268.74	178.36	78.87	64.36	40.57	225.69	142.45
LOMBRICOM PUESTOS	1	17.34	57.46	24.46	97.14	24.46	1	31.84
R.O.D.	349.57	78.87	345.64	117.74	358.75	1	179.16	204.39
MEDIA DEL MEDIO	159.55	91.36	125.45	118.7	116.74	64.12	107.49	

Analizando la Tabla 4, el medio agar almidón amoniacal, permite obtener las mayores poblaciones en los sustratos de: pradera natural y suelo agrícola fértil, con diferencias significativas respecto a los demás medios, debido posiblemente a la mayor prevalencia de

poblaciones Actinomycetales degradadores de fuentes de energía complejas, que aun persisten en dichos sustratos.

Dicho medio también fue eficiente en el suelo de zanja por las mismas razones expuestas, pero no mostró diferencias con el agar Caseína almidón, por tener almidón como única fuente de energía y equilibrio de la fuente nitrogenada. Para el sustrato de bosque artificial el medio de agar Asparagina, permitió las mayores poblaciones, porque en dichos sustratos existen fuentes complejas de energía (glicerol) y de nitrógeno Asparagina, lo cual es común en los bosques y se necesitan de poblaciones específicas de actinomicetos para lograr la degradación.

Para lombricompost y residuos orgánicos descompuestos el mejor medio corresponde a agar sucrosa almidón, debido a que se desarrollan poblaciones de actinomicetos que pueden estar a expensas de fuentes de energía con diferentes grados de complejidad, que es lo que sucede cuando hay descomposición de los residuos orgánicos.

Esta hipótesis también se aplica a la preferencia del agar caseína almidón, por las poblaciones Actinomycetales presentes en el bosque natural en donde los residuos orgánicos siempre se están aportando y por lo tanto su degradación es progresiva.

El medio agar glucosa Asparagina que permite las mayores poblaciones de actinomicetos presentes en los sustratos suelo de mediana fertilidad y suelo de baja fertilidad, porque se deben desarrollar en estos suelos poblaciones de actinomicetos específicas que utilizan como fuente de energía, sustancias simples como la glucosa debido a que la materia

orgánica existente, se encuentra en las últimas etapas de degradación, presentándose una fase de estabilización.

En el suelo de jardín no se encontraron diferencias significativas entre medios, debido posiblemente a la mayor variabilidad de actinomicetos y por lo tanto su capacidad de utilizar distintas fuentes de carbono y energía, como también nitrogenadas (Burbano, 1989).

6.2 CARACTERIZACION PARCIAL

A través de las pruebas realizadas se pudo comprobar que de las colonias de actinomicetos aisladas se purificaron 89 colonias por ser diferentes.

FOTOGRAFÍA 1

CEPAS PURAS DE ACTINOMICETOS AISLADOS





6.2.1 Características culturales y clasificación. En el cuadro 1 se encuentran descritas las características macroscópicas de cada una de las 89 cepas aisladas, incluyendo la clasificación genérica.

PURIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS



CUADRO 1
CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y CLASIFICACION

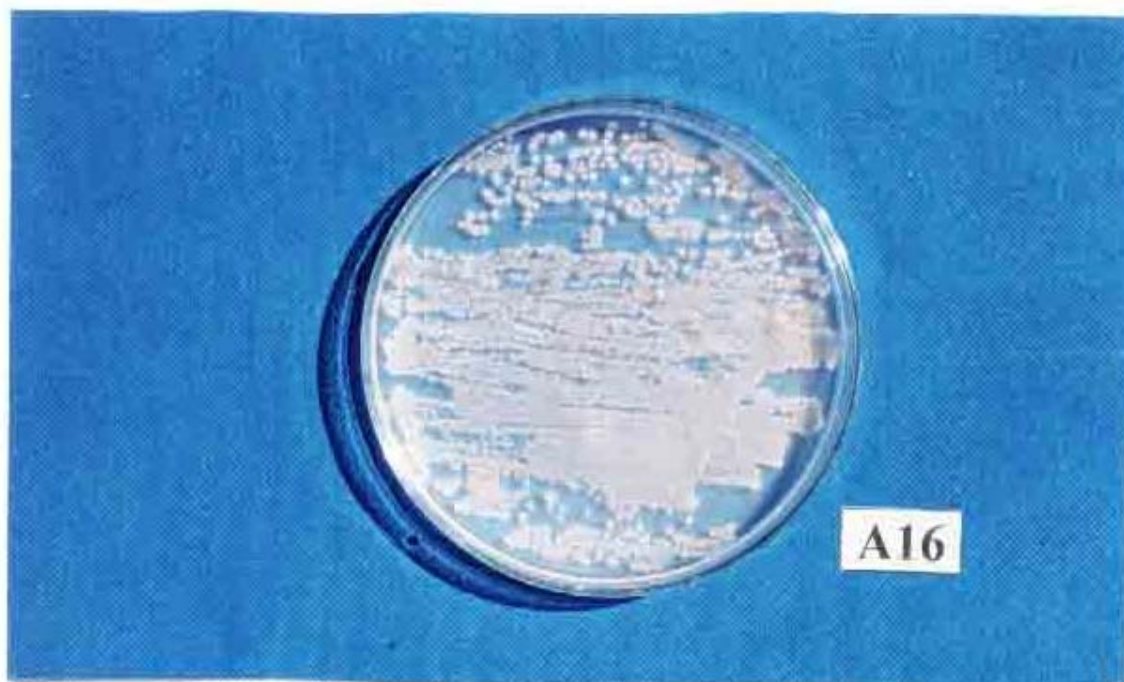
CEPA	COLOR	BORDE	SUPERFICIE	GENERO
A1	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A2	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A3	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A4	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A5	Tomate	Entero	Lisa	<i>Streptomyces</i>
A6	Blanco trasparente	Rizado	Lisa	<i>Nocardia</i>
A7	Café	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A8	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A9	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A10	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A11	Blanco trasparente	Rizado	Lisa	<i>Nocardia</i>
A12	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A13	Blanco trasparente	Rizado	Lisa	<i>Nocardia</i>
A14	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A15	Café claro	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A16	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A17	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A18	Crema	Entero	Lisa	<i>Nocardia</i>
A19	Blanco trasparente	Entero	Lisa	<i>Nocardia</i>
A20	Café	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A21	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A22	Café	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A23	Curuba	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A24	Tomate	Entero	Lisa	<i>Streptomyces</i>
A25	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A26	Amarillo	Entero	Lisa	<i>Nocardia</i>
A27	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A28	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A29	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A30	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A31	Blanco trasparente	Rizado	Lisa	<i>Nocardia</i>
A32	Café oscuro	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A33	Café claro	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A34	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A35	Gris	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A36	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A37	Café	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>

A38	Amarillo	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A39	Gris	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A40	Blanco	Rizado	Lisa	<i>Nocardia</i>
A41	Verde claro	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A42	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A43	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A44	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A45	Rosado	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A46	Rosado	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A47	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A48	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A49	Blanco trasparente	Entero	Lisa	<i>Nocardia</i>

FOTOGRAFÍA 2

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS





**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



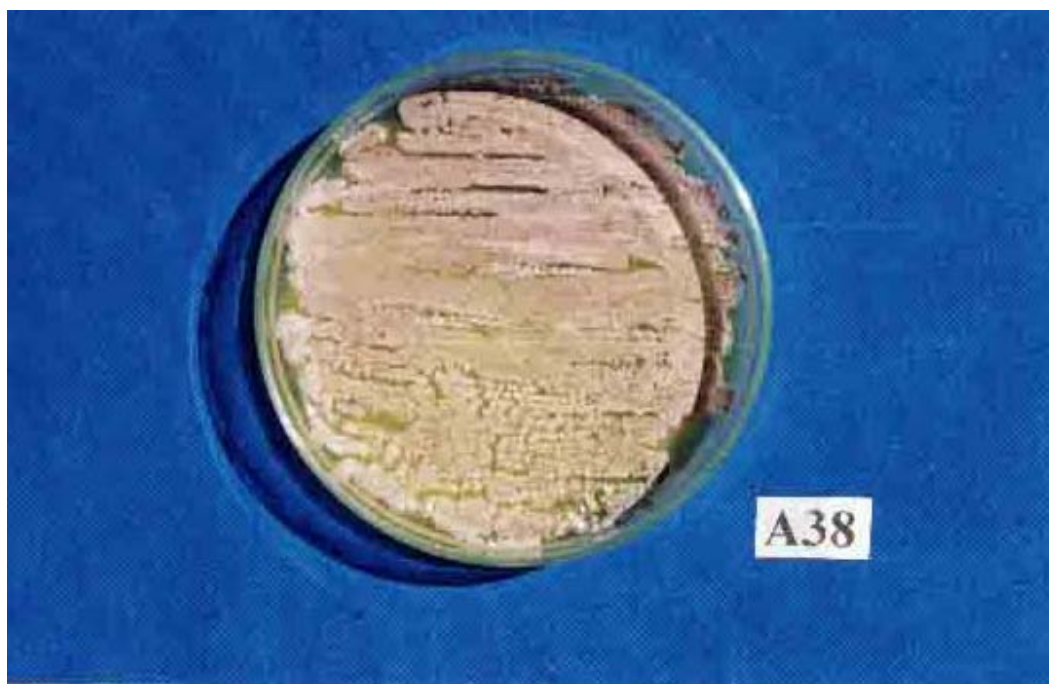
**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS



A50	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A51	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A52	Café	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A53	Tomate	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A54	Tomate	Entero	Lisa	<i>Streptomyces</i>
A55	Café	Rizado	Lisa	<i>Streptomyces</i>
A56	Café	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A57	Amarillo	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A58	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A59	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A60	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A61	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A62	Amarillo	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A63	Blanco	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A64	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A65	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A66	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A67	Gris	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A68	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A69	Gris	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A70	Amarillo	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A71	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A72	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A73	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A74	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A75	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A76	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A77	Gris	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A78	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A79	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A80	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A81	Rosado	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A82	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A83	Café	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A84	Curuba	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A85	Verde	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A86	Amarillo	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A87	Blanco	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A88	Verde	Entero	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>
A89	Gris	Rizado	Seca pulverulenta	<i>Streptomyces</i>

**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



**CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS MEJORES CEPAS DE
ACTINOMICETOS PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS**



6.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

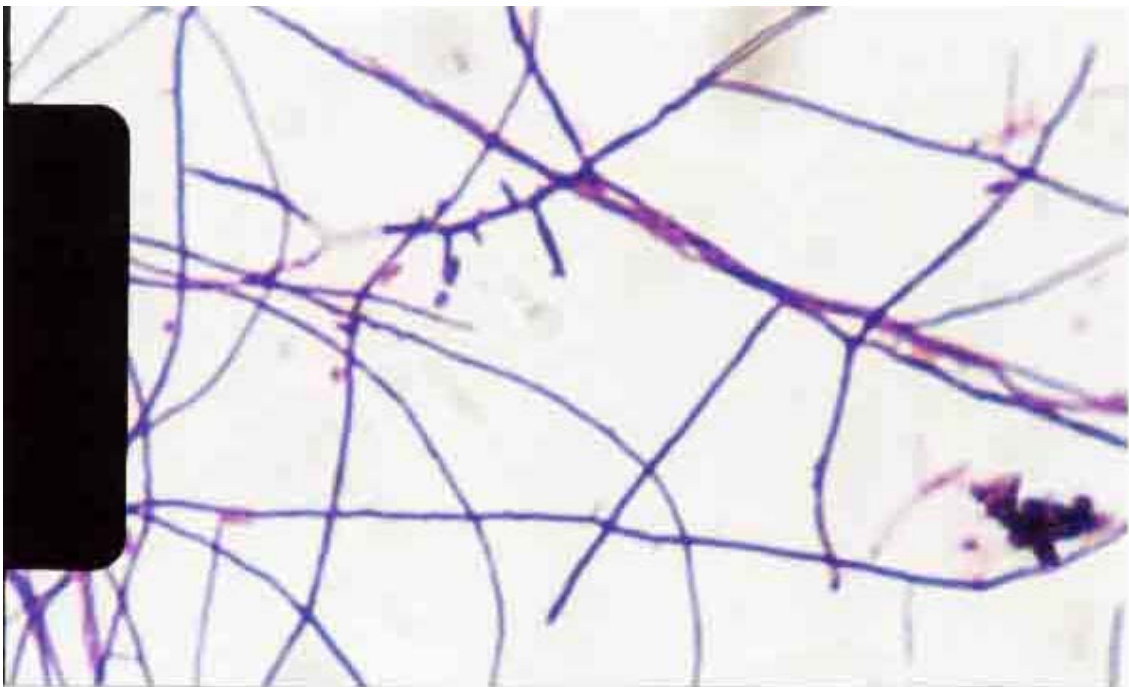
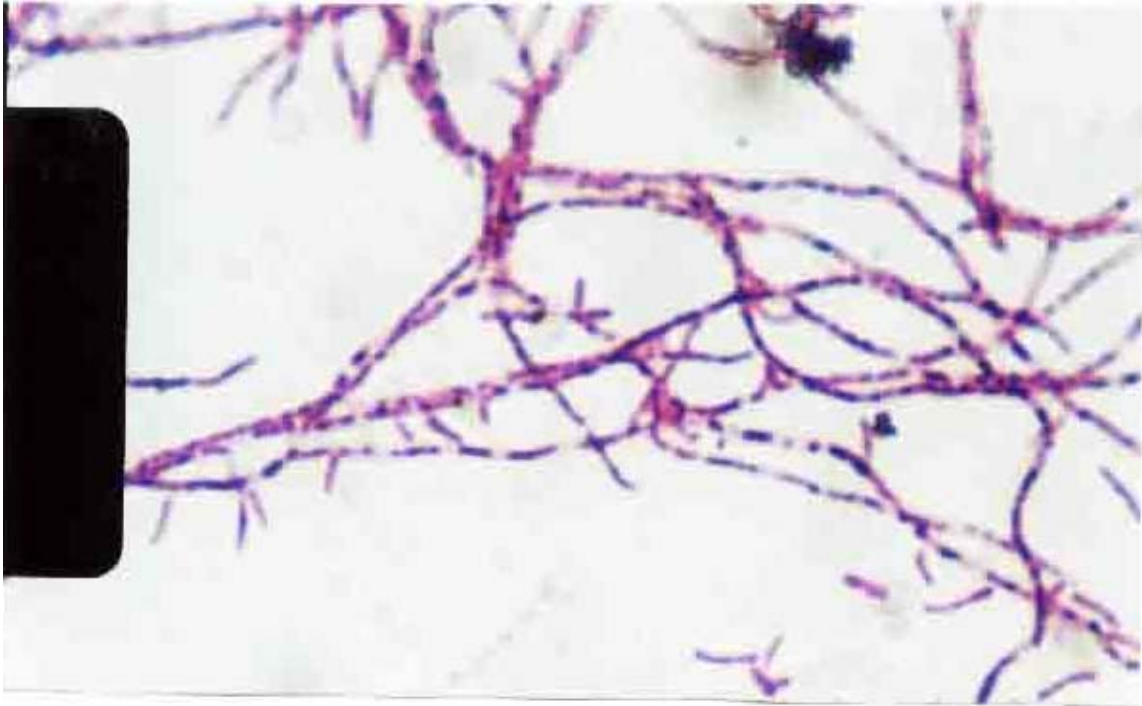
Según Burbano, 1991 en investigaciones realizadas se ha determinado que especies de Streptomyces con frecuencia constituyen del 70% al 90%, de las colonias en los medios de agar. Nocardia es el segundo mas abundante, del 10% al 30% de las colonias de actinomicetos, mientras que especies de Actinomyces se consideran poco comunes.

6.3.1 Géneros identificados. Se determinaron ochenta y nueve colonias de actinomicetos, de las cuales ochenta y uno correspondieron al género Streptomyces y ocho al género Nocardia (Fotografía 3).

6.3.1.1 Género Streptomyces. Este género se identificó por las siguientes características:

- Presentan hifas vegetativas extensamente ramificadas, no septadas
- Fase vegetativa consistente en una matriz entretrejida, apretada y compleja que forma una colonia compacta y enroscada.
- Las conidias se producen por la formación de tabiques en los esporóforos.
- Son microorganismos aerobios.
- Gram positivos.
- Catalasa positiva.
- No son ácido resistentes.

FOTOGRAFÍA 3
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LOS FILAMENTOS DE LOS
GÉNEROS Nocardia Y Streptomyces



Microfotografía 20X Streptomyces

- Presentan micelio permanente (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Todas las cepas de Streptomyces formaron colonias pequeñas, secas, redondas, adheridas fuertemente al sustrato y de apariencia polvosa, debido a la esporulación de todas ellas, las diferencias se dieron en el color y el borde de la colonia, determinándose quince grupos de la siguiente manera:

- Colonia blanca, borde entero (10 aislamientos)
- Colonia blanca, borde rizado (16 aislamientos)
- Colonia amarilla, borde entero (5 aislamientos)
- Colonia amarilla, borde rizado (4 aislamientos)
- Colonia curuba, borde rizado (2 aislamientos)
- Colonia tomate, borde entero (3 aislamientos)
- Colonia tomate, borde rizado (1 aislamiento)
- Colonia rosada, borde entero (2 aislamientos)
- Colonia rosada, borde rizado (6 aislamientos)
- Colonia verde, borde entero (1 aislamiento)
- Colonia verde, borde rizado (13 aislamientos)
- Colonia gris, borde entero (2 aislamientos)
- Colonia gris, borde rizado (5 aislamientos)
- Colonia café, borde entero (2 aislamientos)
- Colonia café, borde rizado (9 aislamientos)

6.3.1.2 Género Nocardia. Este género se identificó por las siguientes características:

- Presentan hifas vegetativas rudimentarias, extensamente ramificadas.
- Crecen sobre la superficie del agar penetrando en él.
- Presenta filamentos ramificados que pueden fragmentarse en elementos cocoides o bacilares, no móviles.
- Ocasionalmente forma cadenas de conidias sobre las hifas aéreas.
- Gram positivos a Gram variables.
- Aerobios.
- Catalasa positiva.
- Ácido resistentes.
- Micelio fugaz (Holt, 1989; Prescott, 1999).

Las cepas de Nocardia fueron pequeñas, opacas, íntimamente ligadas al medio de cultivo con pliegues internos y no esporuladas se distinguen por el color y el borde, de la siguiente manera:

- Color blanco transparente, borde entero (2 aislamientos)
- Color blanco transparente, borde rizado (4 aislamientos)
- Color amarillo, borde entero (1 aislamiento)
- Color crema, borde entero (1 aislamiento)

6.4 DESCARTE PRELIMINAR

6.4.1 Velocidad de crecimiento. De las 89 cepas identificadas se realizó una selección, teniendo en cuenta factores como velocidad de crecimiento y esporulación, descartándose 23 cepas que presentaron un crecimiento lento o muy tenue y se seleccionaron 66 cepas para los procedimientos posteriores.

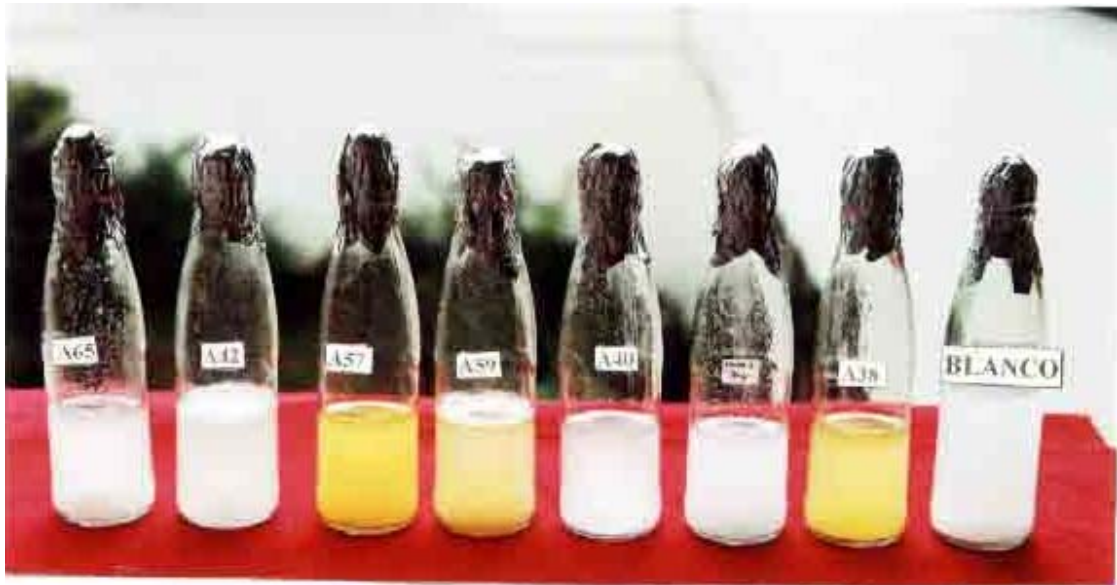
6.4.2 Fermentación en dos temperaturas. De las 66 cepas seleccionadas se realizaron fermentaciones en temperatura ambiente (12°C-15°C) y en temperatura de incubadora (28°C) (Fotografía 4). Se descartaron 28 cepas con crecimiento unicelular, no filamentoso y con bajo crecimiento en medio líquido. Obteniendo como resultado 38 cepas que presentaron crecimiento filamentoso en ambas temperaturas de 12°C y 28°C, las cuales fueron seleccionadas para trabajar en la siguiente etapa del proceso por presentar características óptimas.

6.5 PRUEBAS DE ANTIBIOSIS

6.5.1 Método de siembra central

6.5.1.1 Siembra central para bacterias. En este método de las treinta y ocho cepas seleccionadas se reducen para cada bacteria testigo.

FOTOGRAFÍA 4
CALDOS PARA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBIÓTICAS DE CEPAS
DE ACTINOMICETOS



CUADRO 2
SIEMBRA CENTRAL PARA BACTERIAS

BACTERIA TESTIGO	Nº de cepas con inhibición	Nº de cepas sin inhibición
<u>Escherichia coli</u>	9	29
<u>Bacillus subtilis</u>	23	15
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	13	25
<u>Staphylococcus aureus</u>	10	28

En el Cuadro anterior se indica el descarte de cepas que no inhibieron el crecimiento del microorganismo testigo; esto se determinó porque su crecimiento se prolongó hasta el área ocupada por el actinomiceto. Notando la ausencia de la sustancia inhibitoria o la resistencia del microorganismo testigo a esta sustancia. Por el contrario se seleccionaron aquellas cepas que produjeron una zona de inhibición.

6.5.1.2 Siembra central para hongos. De las treinta y ocho cepas seleccionadas se reducen para cada hongo dermatofito.

CUADRO 3
SIEMBRA CENTRAL PARA HONGOS

HONGO TESTIGO	Nº de cepas con inhibición	Nº de cepas sin inhibición
<u>Microsporum sp</u>	18	20
<u>Trichophytum sp</u>	20	18

En el cuadro anterior se indica el número de cepas seleccionadas por inhibir el crecimiento del hongo, hecho que se determinó por el escaso o nulo crecimiento del microorganismo cerca al actinomiceto, las cepas que no presentaron estas características fueron descartadas.

6.5.2 Método de siembra en cruz

6.5.2.1 Siembra en cruz para bacterias

CUADRO 4
SIEMBRA EN CRUZ PARA BACTERIAS

BACTERIA TESTIGO	Nº de cepas con inhibición
<u>Escherichia coli</u>	6
<u>Bacillus subtilis</u>	9
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	12
<u>Staphylococcus aureus</u>	10

En el Cuadro anterior se indica el número de cepas que presentaron actividad inhibitoria. En este procedimiento la inhibición se determinó como positiva, cuando la bacteria testigo presentó un crecimiento nulo o escaso en el espacio ocupado por el actinomiceto; de esta forma se determinó la presencia de una sustancia producida por el actinomiceto que inhibía parcialmente el crecimiento del microorganismo testigo demostrando su sensibilidad y descartando las cepas que no presentaron inhibición.

6.5.3 Cultivo simultáneo. En esta etapa del proceso se probaron veintinueve cepas de actinomicetos, obteniéndose los siguientes resultados:

6.5.3.1 Cultivo simultáneo para bacterias

CUADRO 5
CULTIVO SIMULTANEO PARA BACTERIAS

BACTERIA TESTIGO	Nº de cepas con inhibición
<u>Escherichia coli</u>	4
<u>Bacillus subtilis</u>	13
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	10
<u>Staphylococcus aureus</u>	10

La capacidad inhibitoria del actinomiceto se determinó por la presencia de halos de inhibición que demostraban la sensibilidad de los microorganismos testigos frente a la sustancia producida por los actinomicetos, las cepas que no presentaron estas zonas inhibitorias fueron descartadas.

6.5.3.2 Cultivo simultáneo para hongos

CUADRO 6
CULTIVO SIMULTANEO PARA HONGOS

HONGO TESTIGO	Nº de cepas con inhibición
<u>Microsporum sp</u>	14
<u>Trichophytum sp</u>	15

La ausencia de crecimiento alrededor del actinomiceto, permitió seleccionar las cepas con una eficiente capacidad inhibitoria frente a los hongos. Las demás cepas fueron descartadas porque el hongo testigo crecía sobre el actinomiceto.

6.5.4 Cultivo en medio líquido. En este ultimo procedimiento preliminar se obtiene el numero total de cepas de actinomicetos con capacidad antagónica eficaz contra los microorganismos testigos.

6.5.4.1 cultivo en medio líquido para bacterias

CUADRO 7

CULTIVO MEDIO LIQUIDO PARA BACTERIAS

BACTERIA TESTIGO	Cepas con capacidad inhibitoria
<u>Escherichia coli</u>	2
<u>Bacillus subtilis</u>	8
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	5
<u>Staphylococcus aureus</u>	4

El cuadro anterior indica el número de cepas que presentan capacidad inhibitoria en esta etapa, la cual se determino al realizar tinción de Gram y de esta forma comprobar, mediante observación microscópica, la ausencia de la bacteria testigo sobre el actinomiceto en el medio liquido, descartando las cepas que no presentaban acción inhibitoria.

6.5.4.2 Cultivo en medio líquido para hongos

CUADRO 8

CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO PARA HONGOS

HONGO TESTIGO	Nº de cepas con inhibición
<u>Microsporum sp</u>	13
<u>Trichophytum sp</u>	13

En el Cuadro anterior se indica el número de cepas que presentaron inhibición. Mediante la tinción con lactofenol se determinó la ausencia del hongo dermatofito en el medio de cultivo líquido, previamente inoculado con el actinomiceto. Descartando las cepas que no presentaron capacidad inhibitoria.

6.6 ANTAGONISMO CON SENSIDISCOS

Muchas especies de Streptomyces aisladas a partir del suelo son capaces de producir antibióticos en grandes cantidades bajo condiciones de laboratorio, aproximadamente tres cuartas partes de los estreptomicetos aislados pueden producir agentes antimicrobianos (Burbano, 1989; Prescott, 1999).

Las sustancias antibióticas producidas por los actinomicetos son capaces de inhibir al menos en cultivo el crecimiento o de eliminar poblaciones de bacterias, levaduras y hongos. El porcentaje de actinomicetos que producen antibióticos varía con el suelo y la estación del año (Burbano, 1989; Prescott, 1999).

TABLA 5
ANALISIS DE VARIANZA PARA HALOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE
MICROORGANISMOS DE INTERES CLINICO POR SENSIDISCOS CON SUSTANCIAS
ANTIBIOTICAS DE ACTINOMICETOS

<u>Escherichia coli</u>						
FV	GL	SC	CM	FC	Ft	
					1%	5%
Tratamiento	1	4.86	4.86	36xx	21.20	7.71
Error	4	0.54	0.135			
<u>Bacillus subtilis</u>						
Tratamiento	7	0.81	0.11	0.55NS	4.28	2.76
Error	14	2.83	0.20			
<u>Staphylococcus aureus</u>						
Tratamiento	3	10.98	3.66	36.6xx	7.59	4.07
Error	8	0.86	0.10			
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>						
Tratamiento	4	20.12	5.03	314.37xx	5.99	3.48
Error	10	0.16	0.016			
<u>Trichophytum sp</u>						
Tratamiento	12	125.49	10.45	7.30xx	2.96	2.15
Error	26	37.42	1.43			
<u>Microsporum sp</u>						
Tratamiento	12	183.71	15.30	12.64xx	2.96	2.15
Error	26	31.55	1.21			

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

En ésta tabla se observa la diferencia estadística entre las cepas de actinomicetos con respecto a cada microorganismo testigo. Determinando si ésta diferencia es o no significativa estadísticamente.

6.6.1 Antagonismo sobre bacterias

6.6.1.1 Bacillus subtilis. En la Tabla 6, del análisis de varianza se encontraron diferencias no significativas entre los actinomicetos evaluados (A75,A88,A33,A22,A60,A19,A37,A40) que tienen la misma capacidad antibiótica, produciendo áreas de inhibición de 6.73 a 7.27 mm (Gráfica 3).

TABLA 6

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE Bacillus subtilis CON SENSIDISCOS LLEVANDO SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS DE OCHO ACTINOMICETOS

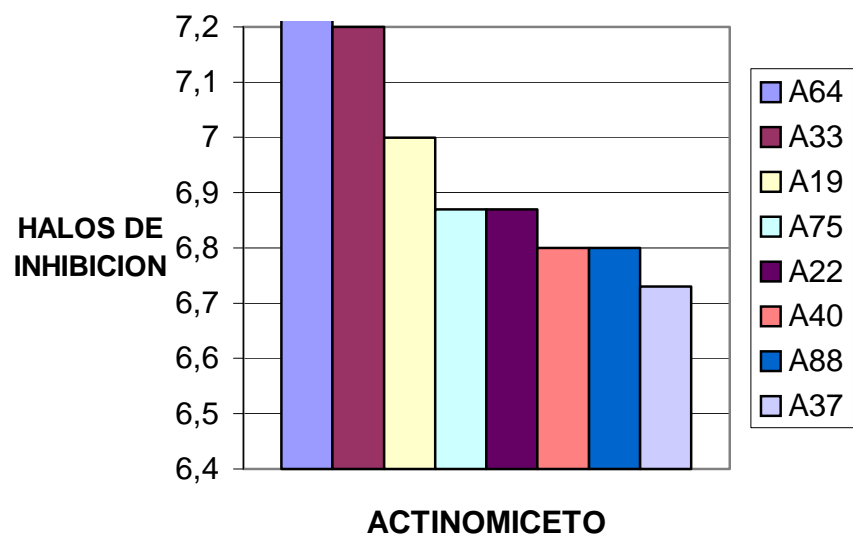
	A64	A33	A19	A75A22	A40A88	A37
	7.27	7.20	7.00	6.87	6.80	6.73
6.73	0.54NS	0.47NS	0.27NS	0.14NS	0.07NS	
6.80	0.47NS	0.40NS	0.20NS	0.07NS		
6.87	0.40NS	0.33NS	0.13NS			
7.00	0.27NS	0.20NS				
7.20	0.07NS					
7.27						

TUKEY 5%= 1.30

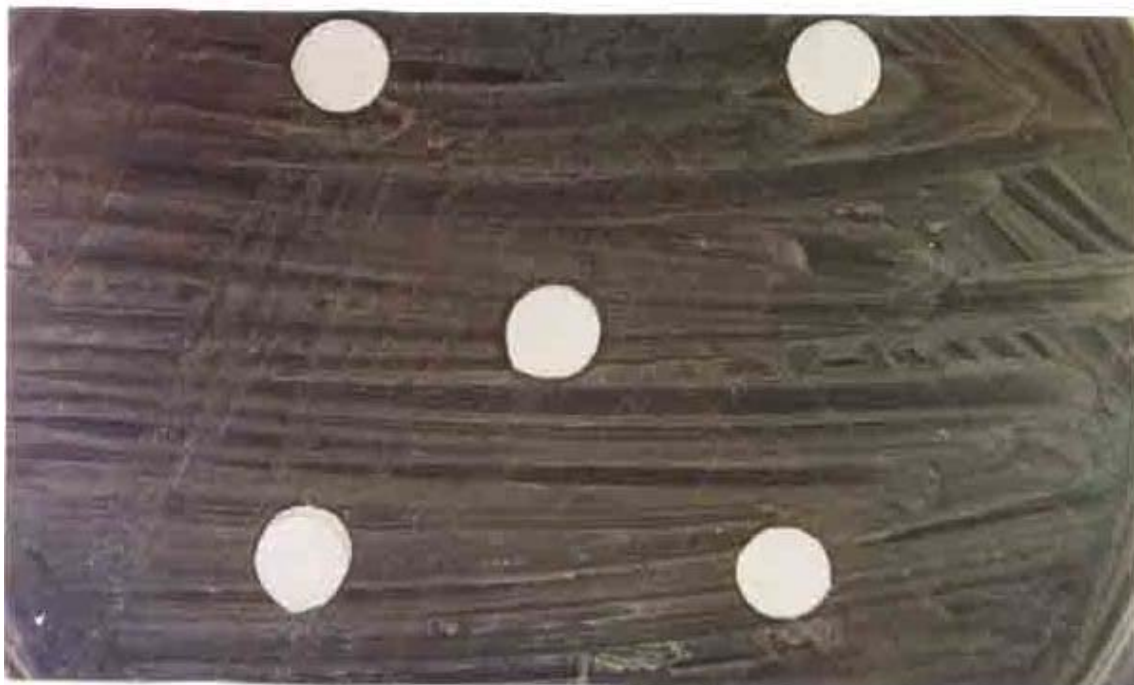
X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

6.6.1.2 Escherichia coli. Las dos cepas evaluadas A1 y A19, ejercieron antibiosis de 7.6 y 9.4 mm, con diferencia altamente significativa en el análisis de varianza (Tabla 5 y Gráfica

GRÁFICO No. 3 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA Bacillus subtilis

FOTOGRAFÍA 5
VALORACIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR MÉTODO DE DISCO DE PAPEL PARA BACTERIAS



Bacillus subtilis A64



Pseudomonas aeruginosa A56

4), determinándose mayor eficiencia de A19, por producción de una sustancia antibiótica específica contra la bacteria patógena.

Según otros estudios de antagonismo con actinomicetos sobre bacterias testigo como Bacillus subtilis y Escherichia coli, podemos determinar que los resultados obtenidos en esta investigación corroboran la resistencia de Escherichia coli a estas sustancias inhibitorias explicando que de las treinta y ocho cepas de actinomicetos solo dos inhibieron su crecimiento, por otra parte se comprueba la sensibilidad de Bacillus subtilis a estas sustancias antibacterianas (Cruz, 1995; Ramos, 1991).

6.6.1.3 Staphylococcus aureus. Las cepas A64, A88, A81 y A19, ejercieron antibiosis sobre esta bacteria con área de inhibición de 7.2, 9.8 y 7.9, 7.8 mm para diferencias altamente significativas entre ellas en el análisis de varianza, observándose la mayor eficiencia de A88 con diferencias significativas respecto a las tres cepas restantes (Tabla 7 y Gráfica 5).

GRAFICA No 4. PROMEDIO HALOS DE INHIBICIÓN PARA E. coli

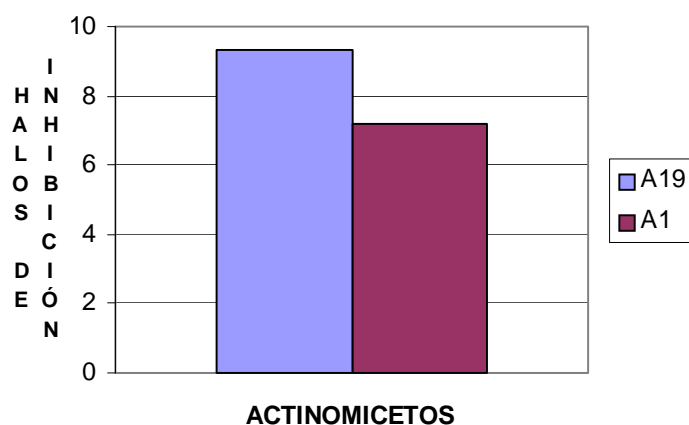


TABLA 7

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE Staphylococcus aureus CON SENSIDISCOS LLEVANDO SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS DE CUATRO ACTINOMICETOS

	A88	A81	A19	A64
	9.8	7.9	7.8	7.2
7.2	2.6x	0.70NS	0.6NS	
7.8	2.0x	0.10NS		
7.9	1.9x			
9.8				

TUKEY 5% = 0.77

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

6.6.1.4 Pseudomonas aeruginosa. Se encontraron las cepas A40, A1, A19, A37 y A56 con áreas de inhibición de 6.8 a 9.8 mm y diferencias significativas entre ellas, de acuerdo con el análisis de varianza (Tabla 8 y Gráfica 6). La cepa A56 fue la mas eficiente con diferencias significativas respecto a todas, siguiendo A37 con diferencias significativas respecto a las restantes, y A19 con diferencias significativas respecto a A1 y A40, cepas que no difirieron en su capacidad antibiótica.

GRAFICA 5. PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA
Staphylococcus aureus

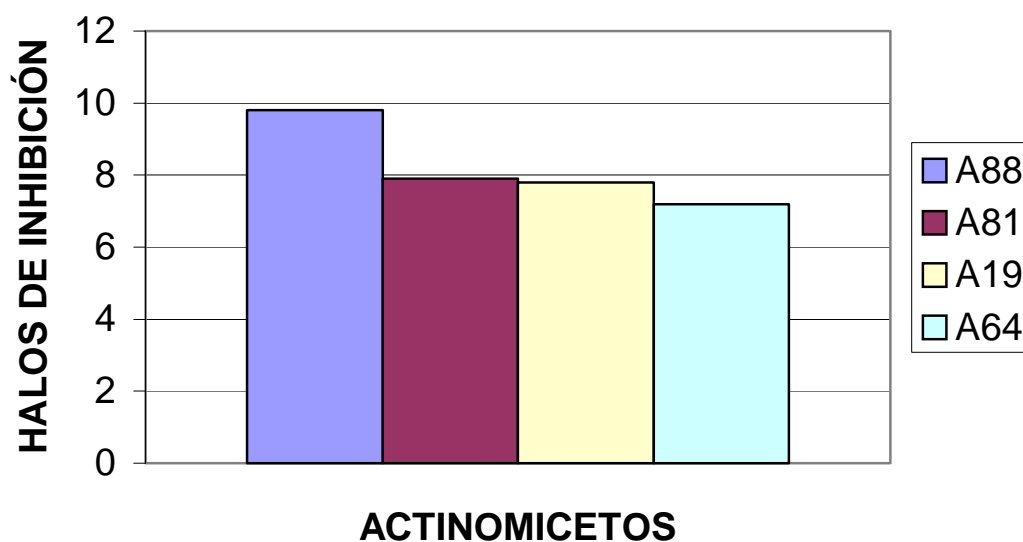


TABLA 8

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE Pseudomonas aeruginosa CON SENSIDISCOS LLEVANDO SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS DE CINCO ACTINOMICETOS

	A56	A37	A19	A1	A40
	9.80	8.86	7.93	6.86	6.80
6.80	3.0x	2.06x	1.13x	0.06NS	
6.86	2.94x	2.0x	1.07x		
7.93	1.87x	0.93x			
8.86	0.94x				
9.80					

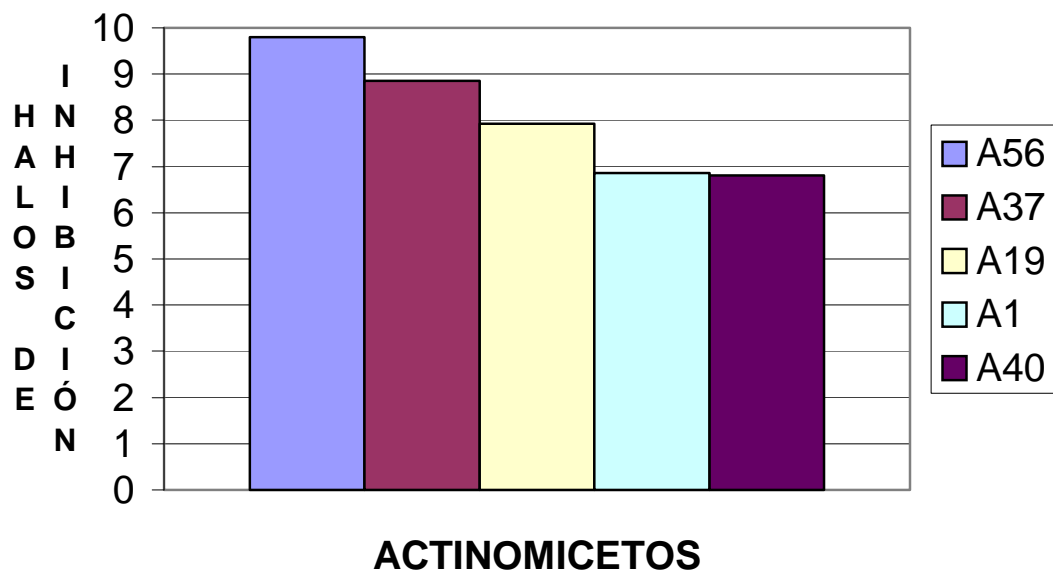
TUKEY 5%= 42.36

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

En esta tabla se muestran diferencias significativas en las cepas evaluadas, observando que A56 presentó mayor grado de inhibición respecto a A40.

En investigaciones realizadas por Ramos (1994), se ha podido demostrar que las sustancias antimicrobianas producidas por los actinomicetos son mas eficientes sobre cepas de Bacillus, seguido de Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y por ultimo la mas resistente la cepa de Escherichia coli, proporciones similares se obtuvieron en la presente investigación comprobando la mayor eficiencia en bacterias Gram positivas (Fotografía 5).

GRAFICA No 6. PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA Ps. aeruginosa

6.6.2 Antagonismo sobre hongos

6.6.2.1 *Trichophytum* sp. El área de inhibición estuvo comprendida entre 6.0 y 11.06 mm presentándose diferencias altamente significativas entre cepas de actinomicetos, de acuerdo con el análisis de varianza (Tabla 9, Gráfica 7 y Fotografía 6)

TABLA 9

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE INHIBICION DE CRECIMIENTO DE *Trichophytum* sp CON SENSIDISCOS LLEVANDO SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS DE TRECE ACTINOMICETOS

	A37A19	A81	A40	A57	A88	A33	A56	A41	A64	A22	A1A51
	11.06	10.50	9.70	9.0	8.86	8.06	7.80	7.13	6.6	6.4	6.0
6.0	5.06x	4.50x	3.7x	3.06NS	2.86NS	2.06NS	1.80NS	1.13NS	0.60NS	0.40 NS	
6.4	4.66x	4.10x	3.3NS	2.6NS	2.46NS	1.66NS	1.40NS	0.73NS	0.2NS		
6.6	4.46x	3.90x	3.1NS	2.4NS	2.26NS	1.46NS	1.20NS	0.53NS			
7.13	3.93x	3.37x	2.4NS	1.87NS	1.73NS	0.93NS	0.67NS				
7.80	3.26NS	2.70NS	1.9NS	1.20NS	1.06NS	0.26NS					
8.06	3.00NS	2.44NS	1.64NS	0.94NS	0.80NS						
8.86	2.20NS	1.64NS	0.84NS	0.14NS							
9.0	2.06NS	1.50NS	0.70NS								
9.70	1.36NS	0.80NS									
10.50	0.56NS										
11.06											

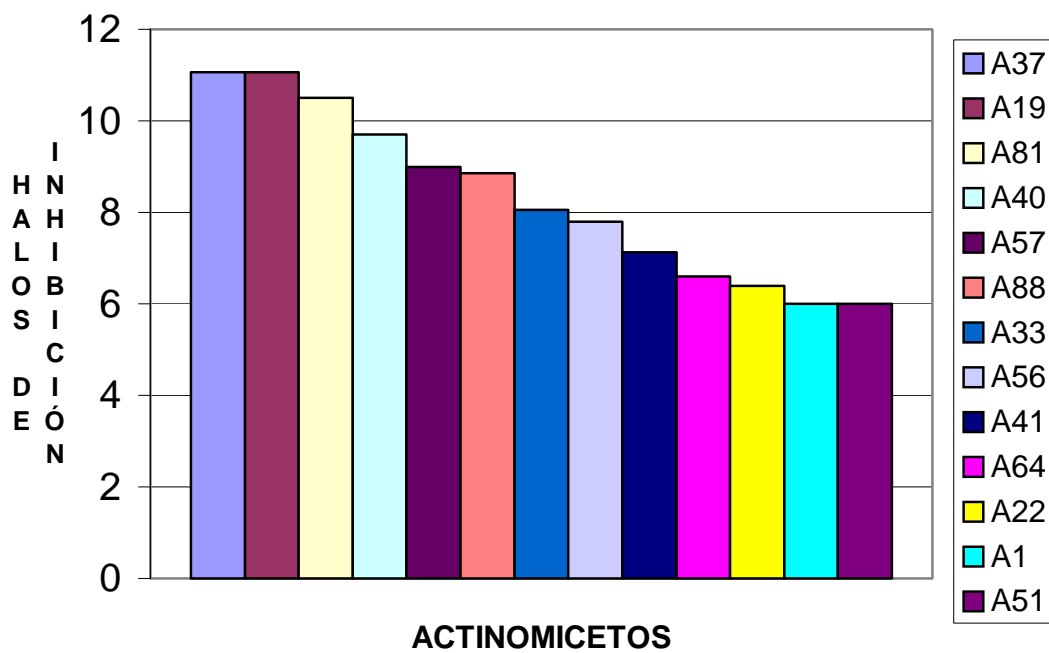
TUKEY 5% = 3.37

X= Diferencia significativa

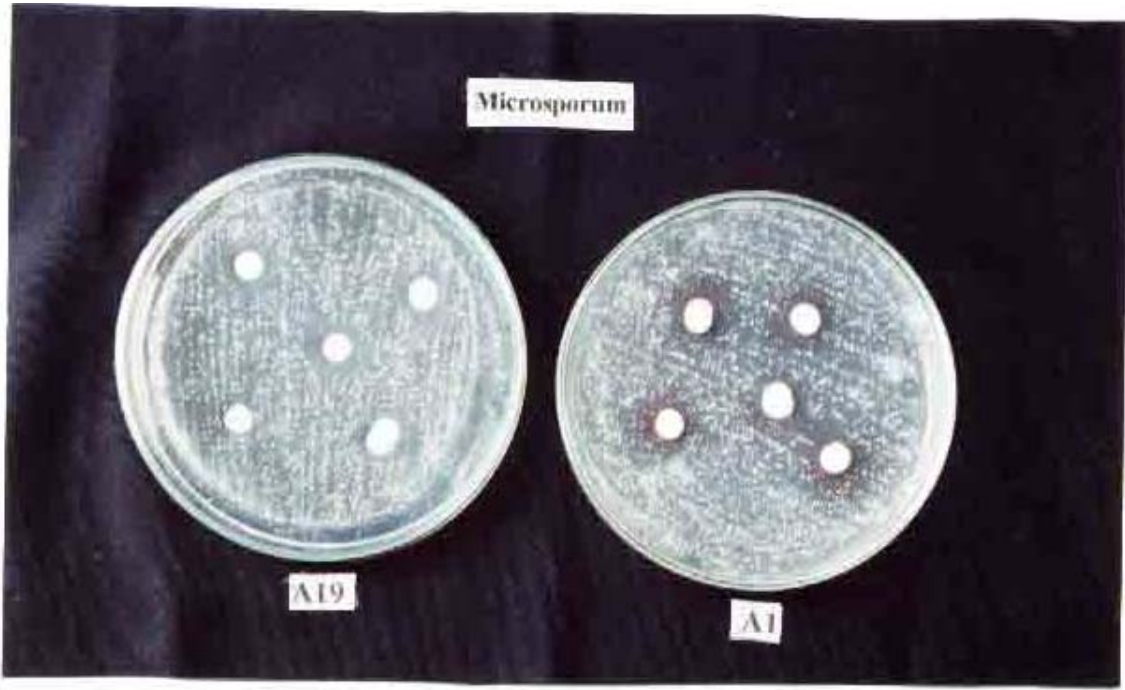
NS= Diferencia no significativa

Fueron poco eficaces las cepas A1, A51, A22, A64, A41, A57, A37 y A88 con áreas de inhibición de 6.0 a 9.0 y sin diferencias significativas entre ellas.

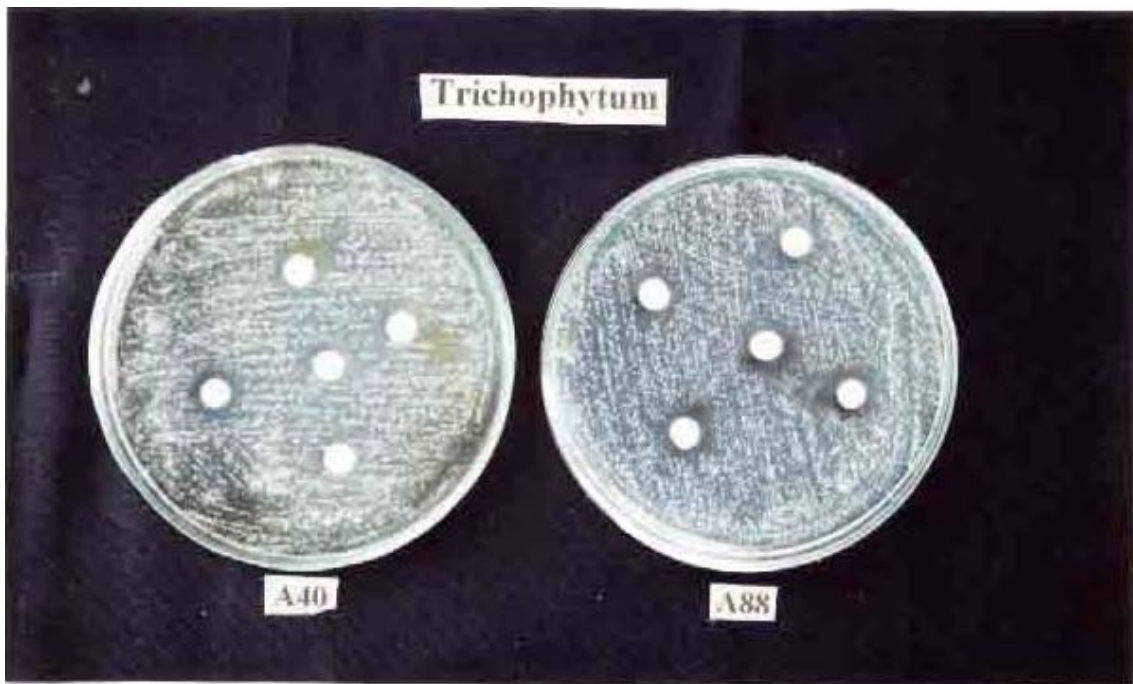
GRÁFICA No. 7 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA
Trichophytum sp.



FOTOGRAFÍA 6
VALORACIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR MÉTODO DE DISCO DE PAPEL PARA HONGOS



Microsporium sp



Trichophyllum sp

Las cepas mas eficientes fueron A81, A37 y A19 con 10.5 a 11.06 mm de áreas de inhibición, con diferencias significativas respecto a las cepas A1, A51, A22, A64 y A41 con 6.0 a 7.13 mm de área de inhibición.

6.6.2.2 *Microsporum* sp. En el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre cepas de actinomicetos que produjeron áreas de inhibición de 6.0 a 12.46 mm, observándose poca eficiencia de las cepas A64, A22, A33, A56, A57 y A88 con 6.0 a 8.20 mm (Tabla 10 y Gráfica 8).

TABLA 10

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Microsporum* sp CON SENSIDISCOS LLEVANDO SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS DE TRECE ACTINOMICETOS

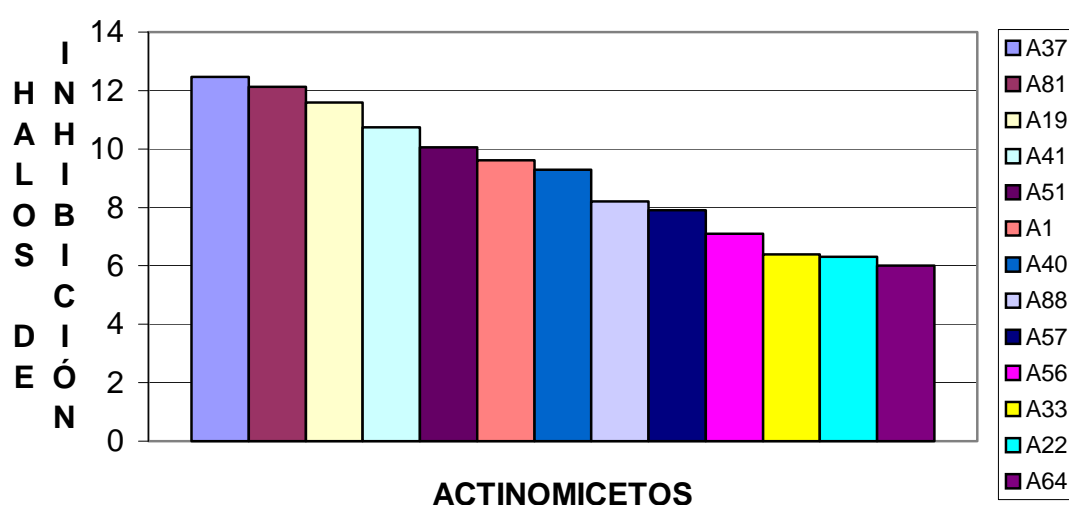
	A37	A81	A19	A41	A51	A1	A40	A88	A57	A56	A33	A22	A64
	12.46	12.13	11.60	10.73	10.06	9.60	9.30	8.20	7.90	7.10	6.40	6.30	6.0
6.0	6.46x	6.13x	5.6x	4.73x	4.06x	3.6x	3.3x	2.2NS	1.9NS	1.1NS	0.4NS	0.3NS	
6.30	6.16x	5.83x	5.3x	4.43x	3.76x	3.3x	3.0x	1.9NS	1.6NS	0.8NS	0.1NS		
6.40	6.06x	5.73x	5.2x	4.33x	3.66x	3.2x	2.9NS	1.8NS	1.5NS	0.7NS			
7.10	5.38x	5.03x	4.5x	3.63x	2.96NS	2.5NS	2.2NS	1.1NS	0.8NS				
7.90	4.56x	4.23x	3.7x	2.83NS	2.16NS	1.7NS	1.4NS	0.3NS					
8.20	4.26x	3.93x	3.4x	2.53NS	1.86NS	1.4NS	1.1NS						
9.30	3.16x	2.83NS	2.3NS	1.43NS	0.76NS	0.3NS							
9.60	2.86NS	2.53NS	2.0NS	1.13NS	0.46NS								
10.06	2.4NS	2.07NS	1.54NS	0.67NS									
10.73	1.73NS	1.4NS	0.87NS										
11.60	0.86NS	0.53NS											
12.13	0.33NS												
12.46													

TUKEY 5%= 3.37

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

GRÁFICA No. 8 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN PARA Microsporum sp



Se determinaron como promisorias las cepas A19, A81 y A37 con 11.60 y 12.13 y 12.46 mm de inhibición, sin diferencias significativas entre ellas, pero diferentes significativamente a las cepas menos eficientes.

Se puede destacar el hecho de que no se ha encontrado bibliografía que reporten investigaciones acerca del efecto antagónico de las sustancias producidas por los actinomicetos frente a hongos dermatofitos lo cual no permite comparar los datos obtenidos en esta investigación.

Sin embargo existen reportes de investigaciones que comprueban la eficiente acción antagónica de los actinomicetos sobre hongos fitopatógenos, como el caso de Rhizoctonia solani, hongo causante de pérdidas severas en sembradíos de alfalfa, soya, algodón, caña de azúcar y algunas legumbres (Bayona, 1999).

En comparación con los resultados obtenidos en las pruebas con bacterias se determinó una mayor eficiencia de estas sustancias frente a los dos géneros de hongos dermatofitos ensayados.

Un hecho destacable de esta investigación es la determinación de cepas con actividad antagónica, tanto para bacterias como para hongos dermatofitos, demostrando un amplio rango de inhibición y efectividad de las cepas de actinomicetos aisladas sobre los microorganismos testigos (Tabla 11).

TABLA 11
CEPAS CON CAPACIDAD INHIBITORIA SOBRE BACTERIAS Y HONGOS

CEPA	E. coli	P. aeruginosa	B. subtilis	S. aureus	Microsporum	Trichophytum
A1	+	+			+	+
A19	+	+	+	+	+	+
A75			+			
A88			+	+	+	+
A33			+		+	+
A22			+		+	+
A64			+	+	+	+
A37		+	+		+	+
A40		+	+		+	+
A56		+			+	+
A81				+	+	+
A41					+	+
A57					+	+
A51					+	+

(+) Presentaron inhibición

Esta tabla sintetiza los resultados obtenidos en la antibiosis con sensidiscos.

De las catorce cepas con capacidad antimicrobiana trece fueron eficientes sobre Microsporum y Trichophytum, excepto A75 que actuó únicamente sobre B. subtilis presentando el menor rango de inhibición.

A19, fue la cepa que presentó el rango de inhibición más amplio actuando sobre todos los microorganismos testigo.

Las cepas A1, A88, A64, A37 y A40 fueron capaces de inhibir a cuatro microorganismos testigo diferentes actuando específicamente sobre hongos y manera parcial sobre bacterias.

Las cepas A22, A56, A81 y A33 ejercieron inhibición sobre Microsporum sp., Trichophytum sp y una bacteria testigo.

Las cepas A41, A57 y A51 actuaron específicamente sobre hongos dermatofitos.

7. CONCLUSIONES

La elaboración de la presente investigación permitió obtener las siguientes conclusiones:

1. El agar almidón amoniacal fue el medio mas favorable en un 20% para el aislamiento de actinomicetos del suelo, con respecto a los demás medios de cultivo analizados, su composición favorece la obtención de energía para el crecimiento de estos microorganismos.
2. Las mayores poblaciones de actinomicetos se encontraron en el suelo de bosque natural en un 20% respecto a los demás sustratos comprobando su abundancia en sitios con altas cantidades de materia orgánica sin descomponer.
3. De las colonias aisladas se purificaron 89 cepas diferentes de actinomicetos determinándose que el 91% corresponden al género Streptomyces con 81 cepas, y el 9% al género Nocardia con 8 cepas identificadas.
4. En los diferentes sustratos analizados se presento una distribución de actinomicetos activos en la producción de sustancias antibióticas con efecto antagónico sobre los microorganismos utilizados como testigo.
5. Se obtuvieron 14 cepas productoras de antibióticos de las cuales 12 cepas son Streptomyces con 85% y 2 pertenecen al género Nocardia constituyendo el 15%.

6. Finalmente se encontraron ocho cepas eficientes contra Bacillus subtilis, dos frente a Escherichia coli, cuatro frente a Staphylococcus aureus y cinco frente a Pseudomonas aeruginosa. Así mismo se encontraron trece cepas que inhibieron respectivamente a Microsporum sp y Trichophytum sp con diferente grado de efectividad.

8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar investigaciones en las cuales se utilicen otros microorganismos testigo con el fin de ampliar el espectro de acción de las sustancias producidas por actinomicetos.
2. Se sugiere que se realicen los estudios de separación y caracterización de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana y el posterior estudio farmacológico para comprobar su actividad in vivo.
3. Realizar posteriores estudios con actinomicetos con el fin de encontrar una actividad diferente a la de antimicrobiano, como la de insecticida, fertilizante u otra forma de actividad biológica de aplicación en el campo de medicina veterinaria y en agronomía.

BIBLIOGRAFIA

1. AGUIRRE, U.C., Aislamiento y Caracterización preliminar de cepas de microorganismos productores de sustancias con actividad antimicrobiana a partir de cinco muestras de tierra provenientes de los departamentos de Boyacá y Santander. Tesis Universidad Nacional de Colombia, 1982.
2. ANDREWS, W.A., Soil ecology. New Jersey. Prentice Hall International. 1973.
3. BARNETT, H.L., Illustrated genera of imperfect fungi. Second edition. E.E.U.U. Edit Burgess publishing company Minneapolis, 1955-1960.
4. BAYONA, M., Microorganismos de interés industrial. Manual de laboratorio. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Bogotá D.C. Centro editorial Javeriana. Primera edición. 1999.
5. BERDY, J., Screening Clasification and identification of microbial products. En Verrall, M. Discovery and isolation of microbial products, Ellis Horwood puldishas Chichester.1985.
6. BROCK, T.D. Madigan, M.T. Microbiología. Ed. Plentice Hall, Octava edición. México. 1998.

7. CERCOS, A.P. Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias. Ed. Salvat. S.A. Barcelona, 1957.
8. CLARIODGE, C., Aminoglycoside antibiotics, en Rose, A, Economic microbiol. Vol. 3, Secondary products of metabolism, London. Academic press, 1979.
9. COLLINS, G. Biología de los microorganismos. Fundamentos de Agricultura Moderna. Barcelona- España. Ed. Aedos. 1971.
10. CONANT, N. et al, Micología traducido al español por el Dr. Fernando Colcharo Arrubarrena. Tercera edición. México. Editorial Interamericana. 1972.
11. CRUZ, H., Aislamiento de Actinomyces de suelo rizosférico de Parmelia sp. y determinación de su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Micobacterias. Santa Fe de Bogotá. Tesis de pregrado, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Colombia, 1993.
12. CRUZ, L. B., Estandarización de la metodología para el establecimiento de un cepario en el departamento de farmacia, Tesis Universidad Nacional de Colombia, 1993.
13. DALHOFF, A. Studies on the action of aminoglycosides on bacterial membranes. Zbl Bakterial. 1, Abt. 1, Orig. A. 1983.
14. DAVILA, Cesar. Texto de microbiología. Ed. Universitaria. Quito, 1983.

15. DAVIS, B.D., Principles of microbiology and immunology. A harper international edition. 1968.
16. DELGADO. J.E., Comparación del crecimiento *in vitro* del Actinomyces viscosus con edulcolorantes. Revista Científica, Pontificia Universidad Javeriana. No40. Febrero, Bogotá, 2000.
17. DUVO, O., Microbiología médica. Quinta edición. México D.F., McGraw-Hill Interamericana. 1997.
18. ESCOBAR, M., Fundamentos de microbiología. Ceja. Pontificia Universidad Javeriana. Santafé de Bogotá.1998.
19. FLORENT, J. , Streptomycin and commercially important aminoglycoside antibiotics, En Moo yang, M., Comprehensive biotechnology. Vol.3, Oxford. Pergaman press, 1985.
20. FRANCO, M., Aislamiento, caracterización y evaluación de actinomicetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos, Santa Fe de Bogotá. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Colombia, 1999.
21. GEBHARDT, L., Microbiology. Thirdeeditroh. Copyright.1965.

22. GONZALES, A., Métodos analíticos de laboratorios de suelos. Quinta edición. Instituto geográfico Agustín Codazzi. 1990.
23. H.C., Cefalosporinas de tercera generación: perfil de seguridad después de 10 años de uso clínico, *New Journal of Clin Pharmacol*, 1990.
24. HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.4, Baltimore, USA, William & Wilkins, 1989.
25. HOSTALEK, Z. Tetracycline antibiotics, en ROSLA, *Economic microbial*, Vol. 3, Secondary products of metabolism, Academic press, London, 1979.
26. JAWETZ, E., *Manual de microbiología médica*. Traducido al español por el Dr. Armando González Mendoza. Segunda edición. México. Editorial el Manual Moderno, 1966.
27. JORGENSEN, A., *Microbiología de las Fermentaciones industriales*, 7a. Edición, Zaragoza, Editorial Acribia, 1959, 75.
28. KWAPINSKI, V.B., *The compendium of microbiology*. Printed y published by Arnorld publishing CO, 58 Margaret Street, Se dnew, N.S.W. 1972.
29. LECHEVALIER, H.A., *Three centurie sof microbiology*. New York, McGraw-Hill Book Company. 1965.

30. MANTILLA, V., Compendio de Microbiología y Parasitología, Madrid, Editorial Marbon, 1952.
31. MARTINEZ, M., Microbiología Ambiental Manual de Laboratorio, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 1998.
32. McCARTHY, M., E. coli 0157; H7, Oot break in USA traced to apple juice, lancet. 1996.
33. NAYEA, S. et al, Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición. Editorial Pueblo y Educación. 1991.
34. PRESCOTT, H. Microbiología. España. Mc Graw Hill. Cuarta edición. 1999.
35. QUENTRIN, W. R., Bacteriología y Micología médicas, Interamericana, México D.F., Mc Graw Hill, 1991.
36. RIPPON, J, Tratado de micología médica. Tercera edición, Ciudad de México. Interamericana Mc Graw Hill, 1990.
37. ROUGIEUX, G., Techniques de Microbiologie Agricole, Paris, 1958.
38. SAÑUDO, B., Microbiología de aguas. Universidad de Nariño. 1992

39. WAKMAN, S.A., The Actinomycetes their natura. Occultenc, acitivities and importante walthman, Mass; USA. 1950.

40. WAKSMAN, S.A., Soil microbiology. London, Sohn Willy & Sons, inc, New York. 1952.

41. WALTER, A.M., Manual de antibióticos quimioterapéuticos, Barcelona, Manuel Marin y Cia editores. 1955.

ANEXOS

ANEXO A**COMPOSICION MEDIOS DE CULTIVO****AGAR ALMIDON AMONICAL**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 gr
K_2HPO_4	1 gr
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 gr
NaCl	1 gr
CaCO_3	3 gr
Almidón	3 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt

pH 6.8-7.2

AGAR ASPARAGINA

K_2HPO_4	1 gr
Asparagina	1 gr
Glicerina	10 gr

Solución de oligoelementos	1 ml
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt

pH 6.7-6.8

AGAR CASEINA ALMIDON

Almidón	10 gr
Caseina	0.3 gr
KNO ₃	2 gr
NaCl	2 gr
K ₂ HPO ₄	2 gr
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.5 gr
CaCO ₃	0.2 gr
F ₄ SO ₄	0.1 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt

pH 7.0-7.2

AGAR GLUCOSA ASPARAGINA

Glucosa	2 gr
---------	------

Asparagina	1 gr
K ₂ HPO ₄	0.5 gr
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 gr
Extracto de tierra	200 ml
Agar	15 gr
Agua destilada	800 ml
pH 7.0	

AGAR SUCROSA ALMIDON

Almidón	4 gr
Sucrosa	10 gr
NaNO ₃	2 gr
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 gr
K ₂ HPO ₄	0.5 gr
KCl	0.5 gr
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt
pH 7.0	

AGAR BENEDICT

Glicerina	20 ml
-----------	-------

Arginina	2.5 gr
NaCl	1 gr
CaCO ₃	0.1 gr
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt
pH 7.0	

AGAR A.V.

L-arginina	0.3 gr
Glucosa	1 gr
Glicerina	5 ml
K ₂ HPO ₄	0.3 gr
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0.2 gr
NaCl	0.3 gr
Agar	15 gr
Agua destilada	1 lt
pH 7.0	

ANEXO B

PREPARACION DE EXTRACTO DE SUELO

Se tomó 500 gr de suelo fértil a una profundidad de 10 cm. , se disuelve en un erlenmeyer con 500 ml de agua destilada, se autoclava a 120 °C durante 1 hora. Cuando la temperatura baja, se filtra hasta obtener un estrato claro. Se ajusta el pH a 7 y se esteriliza nuevamente a 120 °C durante 30 minutos (González, 1990).

ANEXO C**PREPARACION DE LA SOLUCION DE OLIGOELEMENTOS**

A un litro de agua destilada, agregar una gota de percloruro de hierro, y 0.5 gramos de cada una de las siguientes sales:

K_2MoO_4	0.05 gr
Na_2BO_7	0.05 gr
$FeCl_3$	1gota
$Co(NO_3)_2$	0.5 gr
$CaSO_4$	0.05 gr
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.05 gr
$MnSO_4$	0.05 gr
Sulfato de cobre	0.05 gr
Agua destilada	1 litro

Se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos.

ANEXO D

PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS OBTENIDOS A PARTIR DE ACTINOMICETOS

NOMBRE	FECHA DE DESCUBRIMIENTO	MICROORGANISMO
Cicloserina	1955	Streptomyces orchidaceus Streptomyces garryphalus
Vancomicina	1956	Streptomyces orientalis
Rifamicina	1957	Streptomyces mediterranei
Canamicina	1957	Streptomyces kanamyceticus
Nebramicina	1958	Streptomyces tenebraeus
Paramomicina	1959	Streptomyces rimosus
Ácido Fusídico	1960	Fusidium coccineum (a)
Espectinomomicina	1961-1962	Streptomyces flavopersicus
Lincomomicina	1962	Streptomyces lincolnensis
Gentamicina	1963	Micromonospora purpurea
Josamicina	1964	Streptomyces narvonensis Var. Josamyceticus
Tobramicina	1968	Streptomyces tenebraeus
Ribostamicina	1970	Streptomyces ribosidificus
Butirosina	1970	Bacillus circulans (b)
Sinomomicina	1970	Micromonospora myosensis
Rosaramicina	1972	Micromonospora rosaria

(a) HONGOS

(b) BACTERIAS diferentes de actinomicetos

(c) Tomado de SPECIA- GROUPERHONE- POULENC. 1988.