

Aislamiento y evaluación de actinomicetos contra bacterias fitopatógenas y transmitidas por alimentos

M. G. Maldonado-Blanco, O. Pérez-González, E. I. Saucedo-Tovar, A. Obregón-Cárdenas, M.S. Flores-González.

Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León C.P 66455. mgpemald@hotmail.com

RESUMEN: Los microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces* son de los mayores productores de antibióticos, representando más del 50% del total de compuestos antimicrobianos producidos. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de 57 Actinomicetos y 19 bacterias bacilares provenientes de diferentes muestras de suelo obtenidas de diferentes regiones de nuestro país, donde se realizó el aislamiento en medio de papa dextrosa adicionado con extractos de malta y levadura, y después en experimentos en placa Petri se confrontaron cada uno de los microorganismos aislados contra 2 bacterias fitopatógenas y 8 bacterias de interés médico. Los resultados obtenidos indicaron que el 53% (41) de todos los aislados presentaron actividad al menos contra una de las bacterias. Las bacterias *B. subtilis*, *B. cereus* y *S. aureus* fueron inhibidas por un mayor número de aislados, mientras que contra *Pseudomonas* sp., *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. y *E. coli* fueron pocas las especies que presentaron actividad inhibitoria (1-4 aislados). Los mejores resultados de inhibición bacteriana se obtuvieron sobre las cepas Gram (+), contra *K. pneumoniae* una cepa presentó 100% de inhibición

Palabras clave: Actinomicetos, bacterias patógenas, inhibición.

ABSTRACT: The microorganisms belonging to the genus *Streptomyces* are the largest producers of antibiotics, representing more than 50% of the total antimicrobial compounds produced. In this work we evaluated the antibacterial activity of 57 actinomycetes and 19 bacillary bacteria from different soil samples obtained from different regions of our country, where the isolation was carried out in the potato dextrose agar added with malt and yeast extracts, then the experiments done were confronted each of the microorganisms isolated against 2 phytopathogenic bacteria and 8 bacteria of medical interest. The results obtained indicated that 53% (41) of all the isolates showed activity against at least one of the species of bacteria. *B. subtilis*, *B. cereus* and *S. aureus* were inhibited by a greater number of isolates, whereas against *Pseudomonas* sp., *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. and *E. coli* were few species that showed inhibitory activity (1-4 isolates). The best results of bacterial inhibition were obtained on the Gram (+) strains, against *K. pneumoniae* a strain showed 100% inhibition.

Key words: Actinomycetes, pathogen bacteria, inhibition.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

De los antagonistas microbianos evaluados en el mundo las bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* son de particular importancia e interés (Hassan et al. 2011). Entre los 10,000 compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos, más del 50% se aislaron de actinomicetos (Anderson y Wellington 2001). A lo largo del siglo veinte, los antibióticos han sido una defensa primaria contra las enfermedades bacterianas. Infortunadamente, el uso inapropiado y excesivo de los antibióticos en la crianza de animales está amenazando su eficacia (Jassim y Limoges 2014). La emergencia de enfermedades infecciosas causada por bacterias resistentes a los antibióticos, requiere alternativas a los fármacos ya conocidos. (Barrow and Soothill 1997; Alisky et al., 1998). La búsqueda de nuevas drogas está llegando a ser crítica, debido a la preocupación creciente de la falta de nuevos fármacos. Hay un gran interés por investigar alternativas y agentes antimicrobianos naturales, lo cual se ha incrementado también debido al consumo de preservativos químicos en alimentos y en

superficies de procesamiento de alimentos. Aun ahora, *Salmonella* permanece como la mayor bacteria causal de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo, donde las aves son conocidas por ser los principales reservorios de este patógeno zoonótico (FSA 2011; Bardina *et al.*, 2012). Esta bacteria es la segunda causa en importancia de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos en E. U. y la gran mayoría de estas infecciones son asociadas con el consumo de productos como pollo y huevos contaminados con *Salmonella*. (Foley *et al.*, 2008). Este microorganismo ha evolucionado en su virulencia y mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que llevan a continuos retos a nuestra salud pública. Además de este microorganismo, existen otros que también causan enfermedades serias como *Listeria monocytogenes* que también se transmite por el consumo de alimentos contaminados, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y dentro de los patógenos vegetales, *Xanthomonas campestris*.

Dentro de estos patógenos sobresale *Klebsiella pneumoniae* por su capacidad de formar biofilm (Vuotto *et al.*, 2014; Chung 2016) que protege al patógeno de la respuesta inmune del hospedero así como de los antibióticos (Jagnow and Clegg 2003; Bandeira *et al.*, 2014).

Por otra parte, algunos miembros del género *Streptomyces* han sido reportados que reducen significativamente el crecimiento de patógenos fúngicos. (Taechowisan *et al.*, 2005; Errakhi *et al.*, 2007; *S. aureofaciens* mejora la protección contra antracnosis postcosecha en el mango causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Haggag y Abdall 2011). Formulaciones de *S. griseus* a base de talco se utilizaron para controlar la marchitez del tomate causada por *Fusarium* (Anitha y Rabeeth 2009). *S. rochei* en combinación con *Trichoderma harzianum* se utilizó para controlar la podredumbre de la raíz en la pimienta, causada por *Phytophthora capsici* (Ezziyyani *et al.*, 2007)

De esta manera en este trabajo se aislaron distintos actinomicetos del suelo, se probaron contra diversas bacterias patógenas transmitidas por alimentos, así como otros microorganismos patógenos de plantas, se determinaron los porcentajes de inhibición en cultivos en caja Petri y los resultados mostraron que se aislaron 57 Actinomicetos y 19 bacterias bacilares de las cuales el 53% (41) de todos los aislados presentaron actividad al menos contra una de las bacterias. Menor fue el número de aislados que presentaron inhibición contra *Pseudomonas sp.*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.* y *E. coli* (1 a 4 aislados). La inhibición fue mayor contra bacterias Gram (+).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de suelo de diferentes ambientes incluyendo zonas boscosas, desérticas, de cultivo. Se tomó un gramo de cada una y se agregó a 10 ml de agua destilada estéril, posteriormente se sometieron a temperaturas de 50°C durante 10 minutos y posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴, a continuación se tomó un volumen de 0.1 ml y se esparció con espátula de vidrio sobre cajas Petri conteniendo agar papa dextrosa adicionado con 0.3% de extracto de levadura y 0.3 % de extracto de malta. Las cajas se incubaron a 25°C durante 10 días. Posteriormente se tomó una muestra para observar al microscopio y buscar la morfología característica de los actinomicetos, (Gram (+) y en forma filamentosa). Posteriormente fue aislada cada colonia y transferida a tubos de agar inclinado conteniendo el mismo medio. Por otra parte cepas de las diferentes bacterias usadas, incluyendo *B. cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella sp.*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Xanthomonas campestris*, pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología FCB-UANL, fueron activadas en agar nutritivo durante 24 horas a 30-37°C. Para las pruebas de inhibición se prepararon placas con agar nutritivo, y se señalaron líneas en la parte de debajo de la placa separadas 2 cm aproximadamente, se dibujó también una línea pasando por el centro de la placa, en la cual se sembró la cepa de actinomiceto 48 horas antes de sembrar las bacterias. Después en la misma placa se sembraron 5 especies de bacterias, a las que se observó posterior a 24 horas la inhibición del crecimiento. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y al final se determinó los porcentajes de inhibición en base a la distancia en cm de la línea dibujada en el fondo de la caja.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La continua capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia antibacteriana (Kim y Chung 2004, Narayanan 2004), ha motivado la investigación de nuevos y más potentes antibióticos y es aquí, donde países como México, que cuentan con una gran biodiversidad, ofrecen un gran potencial en la búsqueda de nuevos metabolitos con acción inhibitoria contra bacterias de interés en alimentos y también contra patógenos vegetales. De los 76 especies de microorganismos aislados y probados contra bacterias patógenas, mostrado en la Tabla I, 41 (53.95%) de ellos fueron capaces de inhibir al menos una especie bacteriana. La mayor capacidad de inhibición fue contra las bacterias Gram positivas *B. subtilis*, *B. cereus* y *S. aureus*; mientras que *L. monocytogenes* la cual es una bacteria que presenta gran resistencia a los antibióticos, solo pudo ser inhibida por la cepa M5 (R) 2 en más de un 50 %. De las bacterias Gram negativas, *X. campestris* fue inhibida más de un 50% por 12 de los microorganismos aislados. Un total de 56.75% de los microorganismos aislados poseen actividad antibacteriana solo contra bacterias Gram (+), 29.72% contra bacterias Gram (-) y 13.51% sobre ambas bacterias. Estos resultados difieren de lo reportado por Jeffrey (2008) quien reportó especies de actinomicetos que inhibieron en mayor porcentaje a bacterias Gram (-). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Sierra-García et al. (2012) quienes mencionan que *S. aureus* y *B. subtilis* fueron las bacterias más sensibles en su evaluación.

La búsqueda de nuevos productos utilizados contra las especies patógenas, especialmente actinomicetos ha sido enfocada hacia nichos inexplorados para acceder a especies nuevas, que pueden proveer sustancias con potencial para el desarrollo de nuevos antibióticos.

Tabla I. Actividad Antibacteriana (% de inhibición) presentada por microorganismos aislados de muestras de suelo contra diversas bacterias patógenas.

<i>S. aureus</i>	%	<i>S. cholerae suis</i>	%	<i>B. cereus</i>	%	<i>B. subtilis</i>	%	<i>X. campestris</i>	%
M4 (R) 5	51.7	M4 (R) 5	45.7	D 17	57.1	D 17	68.96	M1 (R) 3	62.5
M4 (R) 2	86.2	D5	57.1	M1 (R) 6	42.86	D5	86.2	M (R) 3	70
D5	51.7	M (R) 3	42.86	M1 (R) 8	85.7	M1 (R) 6	68.97	M1 (R) 8	62.5
M1 (R) 3	86.2	Ma 2	60	Ma 2	68.6	M1 (R) 3	68.97	Ma 2	61
M (R) 3	100	M4 (R) 6	40	M3 Colima	85.7	M1 (R) 8	100	A8	62.5
M1 (R) 8	68.9	M4 (R) 1	42.9	A7	65.7	Ma 2	76.8	M1 (R) 13	62.5
M1 Colima 2	71.4	Narr 2	71.4	A8	54.3	M3 Colima	100	M (R) 10	61
Ma 2	84.2			M4 (R) 4	54.3	A7	71.4	M4 (R) 3	67.5
M3 Colima	100			M4 (R) 1	42.9	M4 (R) 6	67.9	M1 (R) 7	50
M4 (R) 1	69.7			M1 (R) 13	57.1	A8	71.4		62.5
A20	60.4			M1 (R) 10	42.9	M1 (R) 9	83.9		50
M1 (R) 5	49.1			M (R) 10	71.4	M4 (R) 4	53.6		65.71
M2 (R) 3	53.6			Narr1	40	M4 (R) 1	62.5		
M3 (R) 3	71.4			M4 (R) 3	42.86	M1 (R) 5	42.9		
M2 (R) 16	71.4			M1 (R) 2	52.9	M2 Colima	53.6		

M2						
Colima	53.6		M5 (R) 1	51.43	M (R) 10	71.4
M1						
Colima	71.4				Narr1	44.83
					Narr 2	65.5

		<i>L.monocy</i>	%	<i>K.pneumo</i>	%	<i>Pseudomo</i>		<i>Salmonella</i>	%
<i>E. coli</i>	%	<i>togenes</i>		<i>niae</i>		<i>nas</i>	%	sp.	
D5	42.86	M5 (R) 2	55.17	M2 Colima	100	M1 (R) 8	37.5	D5	42.86
M1 (R)									
13	85.7							M5 (R) 5	42.86
MA 23	57.14							M1 Colima 2	85.7
								Ma 2	70

BIBLIOGRAFÍA

- Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N (1998) Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect* 36:5–15
- Anderson AS, Wellington EMH 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:797–814
- Anitha A, Rabeeth M 2009. Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. *Afr J Basic Appl Sci* 1:9–14
- Bandeira, M., Carvalho, P.A., Duarte, A. and Jordao, L. 2014. Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. *Pathogens* 3, 720–731.
- Bardina C, Spricigo DA, Corte's P, Llagostera M (2012) Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl Environ Microbiol* 78:6600–6607
- Barrow PA, Soothill JS 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Genet* 5:268–271
- Chung, P.Y. 2016. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* pii: fnw219
- Errakhi R, Bouteau F, Lebrihi A, Barakate M 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. Against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J Microbiol Biotechnol* 23:1503–1509
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C, Candela ME 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *J Phytopathol* 155:342–
- Foley SL, Lynne AM, Nayak R (2008) *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 86(14):E149–E162
- FSA 2011. Foodborne disease strategy 2010–15: an FSA programme for the reduction of foodborne disease in the UK. Version 1.0. FDS Publishing Web <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fds2015.pdf>.
- Hadacek F., Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis Journal*, 11:137-147.
- Haggag WM, Abdall AM 2011. Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in Mango against post-harvest anthracnose and enhances fruit yield. *Eur J Sci Res* 63:139–149
- Hassan AA, El-Barawy AM, El Mokhtar MN 2011. Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *J Am Sci* 7:752–760
- Jagnow, J. and Clegg, S. (2003) *Klebsiella pneumoniae* MrkD mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 149, 2397–2405.
- Jassim SAA, Limoges RG .2013. Impact of external forces on cyanophage–host interactions in aquatic ecosystems. *World J. Microbiol Biotechnol* 29(10):1751–1762
- Kim P.I., Chung K. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234: 177-183.
- Narayanan K. 2004. Insect defense: its impact on microbial control of insect pest. *Current Sciences*, 86: 800-814.
- Sierra-García I.N., Romero-Tabarez M., Orduz-Peralta S. 2012. Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actual Biol.* 34: 5-19.
- Taechowisan T, Lu C, Shen Y, Lumyong S 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAcl30 and their antifungal activity. *Microbiology* 151:1691–1695.

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M.P., Donelli, G. and Varaldo, P. 2014. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* 3, 743–758.