

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DE ESTREPTOMICETOS COMO POSIBLES FUENTES DE ANTIBIOTICOS CONTRA BACTERIAS PATOGENAS DEL CERDO"

T E S I S PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS (AREA MICROBIOLOGIA) PRESENTA: ALFONSO NEMESIO SANCHEZ ZUÑIGA

DIRECTORES: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

m. 345239



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud a mi Universidad Nacional Autónoma de México Al Departamento de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan por haberme permitido y apoyado en la continuación de mi formación profesional .

Así también dedico este trabajo y la consecución del grado de maestro en ciencias a todos los profesores, investigadores y técnicos académicos que con sus conocimientos y ética universitaria y profesional, impartieron sus cátedras y asesorías de forma continua y apegada a los lineamientos de nuestra casa de estudios, para guiarme a través de la vida escolar y académica en las diferentes asignaturas y trabajos de investigación desarrollados a lo largo del programa.

Para poder alcanzar la cima de una montaña es necesario contar con un espíritu que atesore un sinnúmero de cualidades y atributos, los cuales se van adquiriendo en el trayecto de una vida, y estos se ven necesitados en cierta etapa, de un equipo humano, para que en un ambiente de armonía, amor y apoyo continuo, se logre llegar ahí con mayor motivación, lo que en un día se empezó , hoy culmina. Este equipo que siempre a mi lado camina como materias generadoras de una fuerza especial son dos grandes seres muy especiales para mi : Paty y Maria Fernanda. Gracias.

A Susana Mendoza, le agradezco todo su verdadero apoyo, no solo como profesora y asesora, sino también como una gran persona y amiga. ha quien admiro por toda su trayectoria académica y por sus valores humanos, y que día a día durante toda mi estancia en el posgrado me impulso a continuar, a pesar de los obstáculos que a veces aparecieron , pero sobre todo me apoyo a lograr concluir esta etapa iniciada hace ya algún tiempo. Sinceramente gracias.

No olvido a ninguno de mis compañeros de una u otra generación de este programa de maestría, a ellos también les dedico esta tesis, ya que es difícil un camino nuevo, pero contando siempre con ellos, a veces esto se sentía menos arduo.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de: Dr. Susana E, Mendoza Elvira, Dr. Abel Ciprián Carrasco y Dr. Eliseo Hernández Baumgarten en el laboratorio de Virología de la Coordinación del Posgrado de la FESC-UNAM

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | i |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Característica generales del género <i>Streptomyces</i> | 1 |
| 1.2 Morfología del micelio vegetativo y aéreo..... | 2 |
| 1.3 El suelo como un habitat natural de estreptomicetos..... | 5 |
| 2. OBJETIVOS. | |
| 2.1 Objetivo General | 9 |
| 2.2 Objetivos Particulares | 9 |
| 2.3 Justificación | 10 |
| 3. MATERIALES Y METODOS. | |
| 3.1 Zona de estudio | 11 |
| 3.2 Colecta del suelo y determinación de características fisicoquímicas | 11 |
| 3.3 Evaluación de diferentes medios de aislamiento | 11 |
| 3.4 Cultivo | 12 |
| 3.5 Caracterización morfológica | 12 |
| 3.6 Microscopia | 13 |
| 3.7 Pruebas de actividad antimicrobiana | 13 |
| 4. RESULTADOS | 15 |
| 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 24 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 30 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 31 |

RESUMEN

Se aislaron trece cepas del género *Streptomyces* a partir de muestras de suelo provenientes de una granja de explotación porcícola convencional. Identificando, con base en pruebas bioquímicas y morfológicas y con microscopía electrónica de barrido, a 10 de ellas a nivel de especie y 3 solo a nivel género. La gran mayoría de las especies aisladas e identificadas se caracterizaron por desarrollar un micelio de color gris y la superficie de la espora en 12 casos fue del tipo liso y en uno de ellos fue de tipo espinoso; el crecimiento de la cadena de esporas es predominantemente recto-flexuoso. Nueve de la trece cepas aisladas presentaron alguna actividad antimicrobiana contra bacterias ATCC patógenas del cerdo; el 77 % de estas cepas produjeron sustancias que únicamente afectan a bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal y el 23 % contra bacterias que afectaron el sistema respiratorio porcino. Es importante resaltar que el 10% de las cepas aisladas sintetizaron metabolitos que afectaron a bacterias grampositivas; el 30% sobre bacterias gramnegativas y el 60% restantes presento actividad contra ambos grupos.

1. INTRODUCCIÓN

a. Características generales del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es un grupo de microorganismos muy abundante en todos los ambientes, tanto terrestres como acuáticos e incluso como parásitos de plantas y animales incluyendo al hombre. Sin embargo dentro de esta gama de habitats, el suelo es un reservorio natural para el desarrollo exitoso de la biomasa bacteriana, permitiendo que el grupo de estos microorganismos sea el más numeroso en este sustrato, Paul (1989). Los estreptomicetos son un grupo capaz de producir un elevado número de antibióticos de diferentes tipos y estructuras químicas más que cualquier otro tipo de actinomicetos presentes en el suelo, Hwan *et al* (2001). Aproximadamente el 60 % de los antibióticos desarrollados para la agricultura han sido aislados de *Streptomyces* spp. (Tanaka, 1993). De ahí que se ha sugerido la existencia de un gran número de especies de este género en la naturaleza que puedan producir nuevos antibióticos en el futuro (Okami 1988).

Por lo tanto es un grupo de microorganismos con una gran importancia desde el punto de vista farmacéutico, industrial y en la propia agricultura, debido a que son una fuente de diversos metabolitos secundarios, por ejemplo Satoshi *et al* (2001) reportaron a *Streptomyces avermitilis* con una producción de más de 25 metabolitos secundarios, cuatro de ellos se relacionan directamente con la biosíntesis de melanina y en base a secuenciación genética se han localizado los genes funcionales a ambos extremos del genoma lo que amplía sus posibles actividades antibióticas, y sus posibles usos como promotores de crecimiento, herbicidas, antihelmínticos, y farmacológicos, los cuales se reproducen de acuerdo a diferentes condiciones, Chater *et al* (1993). En la actualidad esta búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas se ha intensificado logrando aislar estreptomicetos de un gran número de ambientes tanto acuáticos como terrestres incluyendo diferentes tipos de suelo, plantas, aguas y sedimentos marinos (Vinning & Stuttard, 1995)

Las características particulares que presentan estos microorganismos han sido estudiadas desde hace varias décadas por diferentes autores y al paso del tiempo, los adelantos científicos han permitido realizar una detallada descripción tanto en el nivel morfológico, bioquímico, biotecnológico, taxonómico así como ecológico.

Los estreptomicetos son bacterias Gram-positivas, aeróbicas, de metabolismo oxidativo, catalasa positivo, que generalmente reducen los nitratos a nitritos y degradan caseína, gelatina, hipoxantinas, almidones y L-tirosina. Utilizan un amplio rango de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para la obtención de energía y su propio crecimiento, estos patrones de utilización son a menudo utilizados como características taxonómicas (Williams *et al* 1983). Las fuentes de carbono más ampliamente usadas incluyen celobiosa, glucosa, glicerol, D-manosa y trealosa; las fuentes de nitrógeno incluyen amonio, L-arginina, L-asparagina y nitrato.

La temperatura para su desarrollo varía en un amplio rango de 10 a 35°C; aunque algunas especies, pueden desarrollarse por arriba de los 37°C e incluso se han reportado crecimientos bacterianos entre 45°C a 55°C (Kutzner, 1981)

La pared celular peptidoglicana de los estreptomicetos contiene grandes cantidades de ácido L-diaminopimélico (L-DAP), con puentes interpeptídicos de glicina y carece de ácidos micólicos, incluso actualmente esta característica se usa como criterio taxonómico (Lee, *et al* 2005); en cuanto al espectro de ácidos grasos, existe un gran número de ácidos grasos iso- y anteisaturados, además de menaquinonas hexa u octahidrogenadas con nueve unidades isoprenoides como el isoprenolo (Li W *et al* 2002) además presenta un complejo patrón lipídico polar consistente de fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol (Lechevalier *et al* 1971).

Respecto a la proporción de bases nitrogenadas presentes en su DNA se ha cuantificado un alto contenido de guanina –citósina con rangos del 69 al 73 % molecularmente (Goodfellow and Cross, 1984b), marcando así una característica diferencial respecto a los demás géneros de la familia *Streptomycetaceae*.

A diferencia de la mayoría de las bacterias, los estreptomicetos presentan una apariencia especial de características tanto microscópicas como macroscópicas: como el color en el micelio vegetativo superficial y en el micelio aéreo, pigmentos que difunden y colorean el medio de cultivo, consistencia del micelio aéreo y la propia morfología de las colonias. En estas propiedades los estreptomicetos son similares a los hongos, por ello no es sorprendente que en algún tiempo fueron ubicados dentro del reino Fungi, con más afinidad a los hongos verdaderos que a las bacterias (Jhonston, 1988).

Macroscópicamente, las colonias de estreptomicetos se adhieren fuertemente al medio de cultivo, toman texturas pulverulentas de diferente color, de acuerdo a los micelios vegetativos y aéreos, con característico olor a tierra húmeda.

El color de la masa de esporas es ampliamente usado para la taxonomía de este grupo. Las cepas son ubicadas en secciones, series y grupos de especies sobre la base de este criterio. Así podemos encontrar que los estreptomicetos están divididos en siete series por el color: azul, gris, rojo, verde, violeta, blanco y amarillo. Subsecuentemente se han adicionado otras subseries para incluir otros colores (Kutzner, 1981). Sin embargo, el color es influenciado por factores como el medio de cultivo, las condiciones de crecimiento y la edad del cultivo.

1.2. Morfología del micelio vegetativo y aéreo

El ciclo de vida de los estreptomicetos es único entre las bacterias, presenta tres estadios anatómicos característicos del género. Un micelio vegetativo (en medio sólido o líquido), un micelio aéreo que se segmenta formando esporas y las propias artrosporas. Mientras el primer estadio del ciclo de vida no ha sido utilizado por los taxonomistas, el segundo y tercero constituyen los criterios de diagnóstico e identificación de las especies (Kutzner, 1981).

Micelio Vegetativo

El micelio vegetativo varía en tamaño, forma y producción de pigmentos. Cuando el crecimiento es raquíptico, resulta difícil su observación. Durante su incubación produce gotas de agua, por esta causa es llamado de tipo húmedo y desprende un olor característico a tierra húmeda. Presenta hifas microsifonadas con un diámetro de 0.5 a 2.0 micras, la longitud y forma de las hifas es variable, pueden ser rectas con longitud de más de 600 micras. Cuando se desarrolla en un medio sólido, por lo general es irregularmente espiralado formando a veces pseudo espirales localizadas al final del micelio, y como característica particular no produce esporas por segmentación, sin embargo, en algunos estreptomicetos se ha observado, al final del crecimiento vegetativo, la formación de cadenas de esporas.

Numerosas especies de estreptomicetos presentan la característica diferencial del micelio vegetativo coloreado a menudo el pigmento se difunde en el medio confiriéndole a este el mismo color aunque un poco más tenue, y en algunos otros casos el medio es más coloreado que el propio micelio.

Aunque esta característica no ha sido usada consistentemente por los taxonomistas, la siguiente clasificación de los pigmentos en cuanto a su localización con respecto a la producción celular puede ser tomada en cuenta: a) endopigmentos; referidos a estructuras celulares y otorgando un llamativo color a las colonias; b) exopigmentos: estos son segregados dentro del medio circundante, y pueden ser tanto solubles en agua y difundirse dentro del medio o precipitarse para producir masas tan amorfas como partículas cristalinas.

Otros puntos adicionales de interés son que algunos pigmentos son producidos como leucocomponentes menos coloreados y únicamente después de su excreción son transformados en pigmentos reconocibles y de acuerdo al pH los pigmentos cambian de color y a menudo de solubilidad, por ejemplo rojo e insoluble en condiciones ácidas, azul y soluble en condiciones alcalinas (Kutzner, 1981).

El color del micelio vegetativo y de los pigmentos solubles ha cambiado de posición con respecto a su utilización como criterio taxonómico, ya que parece ser que en el pasado tuvo un papel más importante que en el presente; ahora el color del micelio aéreo es reconocido como un criterio taxonómico más importante formalmente. La razón es que el color del micelio vegetativo es mucho más dependiente del medio, de su temperatura, edad, y en algunos casos, de la iluminación que el propio color del micelio aéreo maduro. Otra razón es que el color del pigmento es variable de acuerdo a la presencia o ausencia de información genética para esta propiedad, estos pigmentos son metabolitos secundarios los cuales no parecen ser esenciales para la célula y se pierden sin causar daño al organismo. Actualmente el argumento es de que el color no permite por sí solo dar una clave a la identidad química del pigmento, ya que los pigmentos químicamente diferentes pueden presentar el mismo color, además el mismo pigmento puede diferir de color; dependiendo del pH y por último el color observado es a menudo una mezcla de diferentes pigmentos.

Para la determinación del color del micelio vegetativo y de los pigmentos solubles se recomiendan usar medios de crecimiento específicos tal como agar extracto de malta y extracto de levadura, la aparición de sorprendentes colores en otros medios usados para el estudio de estos organismos, puede requerir un medio específico. El color del micelio

vegetativo puede ser blanco, amarillo, rosa rojo anaranjado, verde, café y negro. Es de difícil distinción cuando las colonias son delgadas o el color es muy pálido. Algunas cepas pierden su propiedad de producir pigmentos o tienden a aclarar el color, esto sucede cuando son cultivados sistemáticamente en el laboratorio. Lo cual parecería indicar que el pigmento es un medio para competir con otras bacterias del suelo.

El micelio vegetativo sobre un medio sólido no se fragmenta, aunque en algunos estreptomicetos se presenta la formación de la cadena de esporas al final del crecimiento del micelio. Las hifas no son cenocíticas pues contienen paredes celulares completas (Glauert and Hoppwood, 1960, Moore and Chapman, 1959, Stuart, 1959).

Micelio aéreo

La morfología del micelio aéreo presenta una amplia variabilidad con respecto a la longitud de las hifas, al tipo o forma de ramificación, al arreglo de los esporóforos y a su morfología ya sean rectos, curvos o helicoidales, (Hao and Kendrick, 1998)

La característica estructural más importante del micelio aéreo consiste en el arreglo de la cadena de esporas. La formación de estas estructuras requiere de un óptimo desarrollo del cultivo, factores como el tipo de medio de crecimiento, el pH y la humedad son de particular importancia para ello (Hütter, 1962). La espora germina vía un tubo germinal primario que se ramifica después de un período de extensión linear y una replicación del núcleo, este crecimiento es exponencial en el número de ramificaciones continuas y solo es limitado por la propia disponibilidad de nutrientes, (Burroughs *et al*, 2000).

Flaig and Kutzner (1960), mencionaban ya una serie de características para ser tomadas en cuenta en la clasificación de las especies del género *Streptomyces*, entre ellas se mencionaban; la longitud de la hifa del micelio aéreo las hifas cortas correspondían a colonias de apariencia polvorolienta y las hifas largas se asociaban con apariencias lanudas. Además se tomaba en cuenta el tipo de bifurcación, ya sea simpodial (semejante a un árbol o arbusto) o monopodial (largas hifas con cadenas de esporas a ambos lados), por último la ocurrencia de espirales, tomando en cuenta su frecuencia, su arreglo en las partes terminales de las ramificaciones, la longitud de las espirales, el número e vueltas, el intervalo de las mismas, la dirección de las vueltas (a la derecha o a la izquierda).

Pridman, Hesseltnie y Benedict (1958), propusieron una clasificación mucho más simple tomando en cuenta tres criterios para contribuir en la clasificación del género *Streptomyces*: a) recto-flexible (RF); b) gancho, rizo y espiral con una o dos vueltas (RA); y c) en espirales (S). Aunque de hecho es difícil diferenciar entre los tipos RA y S, ya que es difícil decidir cuando es un rizo y cuando una espiral. Por ello en un estudio posterior de Wellington (1978) y el Project International *Streptomyces* confirmo un muy bajo porcentaje de la categoría RA en la especies de estreptomicetos.

Con respecto a la morfología de las artrosporas Flaig *et al* (1952) propusieron por primera vez, cuatro tipos de esporas con respecto a su superficie u orilla: lisas, verrugosas, peludas y espinosas. Estos tipos se han convertido en criterios morfológicos taxonómicos de gran valor; un quinto tipo "abultado" fue propuesto por Lyons y Pridham (1971), este consistía en un tipo intermedio entre el verrucoso y el espinoso.

Aunque la superficie de la espora es una propiedad muy estable y determinantemente clara, también pueden presentarse algunas confusiones intermedias, ya sea entre liso y verrucoso, verrucoso y espinoso y espinoso y peludo. Estas dificultades de interpretación pueden ser aclaradas utilizando el microscopio electrónico de barrido (Dietz and Mathews, 1969, 1971).

Para la clasificación e identificación de especies de estreptomicetos y tomando en cuenta los datos del International Streptomyces Project (Shirling and Gottlieb, 1967, Küster, 1972; Nonomura, 1974; Szabo *et al* 1975 y Hütter, 1967) el micelio aéreo es determinantemente útil y se han empleado cuatro criterios: color del micelio aéreo, morfología de la cadena de esporas, la forma o estructura de la superficie de la espora y la formación de melanina. Actualmente el avance en técnicas bioquímicas incluyen análisis de DNA, RNA, así como las secuencias filogenéticas para determinar aun con mayor exactitud la identificación taxonómica de estos organismos. (Huang, *et al* 2004)

La consistencia del micelio aéreo difiere significativamente de especie a especie: mealy (harinoso), dusty (polvoroso), woolly (lanudo). Esto aunque no es reconocido como un criterio taxonómico es importante tenerlo presente. También aunque de menor importancia y raramente comentado por los autores, es bueno describir la morfología de las colonias que si bien es necesaria que cuente con una fotografía para avalar las palabras, Shinobu (1958) presento que, al observar colonias de 3 a 4 semanas de cultivo en la caja de Petri, se reconocían tres tipos morfológicos o de arreglos: a) tipo crisantemo (surcos radiales), b) tipo concéntrico (surcos concéntricos) y c) tipo fruncido (surcos irregulares o parecidos a cabellos en red); fuera de los autores japoneses es difícil encontrar la mención de esta característica en la literatura.

1.3 El suelo como un habitat natural de estreptomicetos

Los estreptomicetos son muy numerosos y se encuentran ampliamente distribuidos, no sólo en el suelo sino en una variedad de habitats diferentes, incluyendo estiércol, fango de los ríos y el fondo de los lagos. Se encuentran en la superficie del suelo, así como en los horizontes inferiores, a profundidades considerables. Particularmente, en ambientes de pH elevado, los estreptomicetos constituyen una gran proporción de la comunidad. Como regla general son saprofitos, aunque algunas especies pueden provocar enfermedades a las plantas, animales domésticos e incluso al hombre. Este género tiene una función ecológica en la degradación y disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno para los diferentes niveles tróficos, ya que representa un 98 % de toda la diversidad de actinomicetos en el suelo (Xu.L. *et al* 1996).

En el suelo los estreptomicetos encuentran las condiciones optimas para su crecimiento, desarrollo y proliferación, esto debido a sus características y a las interacciones con otros microorganismos sobre los cuales presentan algunas ventajas como son: el ser capaces de degradar constituyentes de residuos de plantas y animales, los cuales no son fácilmente atacados por otras bacterias y hongos, tales como los polisacáridos (almidón, pectina, quitina), proteínas (por ejemplo, queratina y elastina) y algunos incluso degradan compuestos aromáticos, incluyendo al fenol por ejemplo (Jiang,C & Xu, L.1996); otra ventaja es que utilizan el nitrógeno inorgánico y no requieren de vitaminas ni de factores de crecimiento; además en el suelo encuentran el sustrato ideal para su crecimiento micelial y por su ciclo de vida (espora-micelio-espora), también se pueden adaptar a las variadas condiciones físicas de su habitat, tal como la humedad y aireación, las cuales pueden cambiar dramáticamente en poco tiempo de acuerdo a las condiciones climáticas y a la

estación del año; el crecimiento de los estreptomicetos en el suelo es discontinuo en el espacio y en el tiempo y la sobrevivencia entre diferentes periodos es por la producción de sus esporas (Ravel *et al*, 2000) aunque no tan resistentes como las endosporas bacterianas, si son capaces de contribuir a la supervivencia por largos periodos de sequía, frío y las condiciones anaeróbicas debido a la saturación de agua (Kutzner, 1976).

El tamaño de la comunidad depende del tipo de suelo, así como de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente. Las estimaciones por cuenta en placa proporcionan valores que varían de 10^5 a 10^8 por gramo en zonas templadas, encontrándose cifras menores en regiones frías, turberas ácidas, tundras y suelos inundados. Incluso se han reportado aislamientos de estreptomicetos en muestras de suelos con altos contenidos de quitina (Hoster *et al* 2005) y en suelos de selvas, particularmente en la rizosferas vegetales (Sahin, N, 2004) incluso en terrenos inundados en donde se cultiva arroz (Hayakawa, et al 1988).

Tanto en terreno virgen como en terreno cultivado, siempre son mayoría. En áreas alcalinas y especialmente cuando hay sequedad, la abundancia relativa es alta. Las poblaciones son mayores en zonas de pastizales y el suelos de pastoreo que en suelos cultivados y la abundancia en campos de cultivo con frecuencia sobrepasa la de los sitios vírgenes adyacentes. Existe una alta correlación entre la diversidad de actinomicetos y el clima, en regiones tropicales y subtropicales la diversidad es mayor. Los suelos en regiones climáticas cálidas son más favorables para una extensa flora que los de áreas frías (Xu, L. *et al* 1996); el tamaño de la comunidad en latitudes templadas tiende a aumentar conforme se acerca a los trópicos. Consecuentemente el número total y el porcentaje de incidencia aumenta del hemisferio norte hacia el sur, asimismo el número celular varía de acuerdo a la estación del año y a las prácticas de cultivo.

Varios estudios recientes sugieren que los grupos dominantes dentro de los actinomicetos que forman conidias existen, en gran medida, en forma de esporas y que las conidias desempeñan una función de sobrevivencia. Muchas de las esporas de *Streptomyces*, el género que predomina numéricamente, no germinan al ser agregadas al suelo como resultado de los efectos asociados con los representantes de las poblaciones establecidas, puesto que la germinación tiene lugar en el suelo esterilizado. Probablemente, condiciones naturales, las esporas germinan cuando nuevos sustratos orgánicos se vuelven aprovechables, desarrollándose las hifas sobre los fragmentos de materia orgánica. De esta manera las esporas son abundantes en aquellos micrositios donde existen los nutrientes disponibles y el micelio desaparece conforme lo digieren sus propias enzimas o la enzimas producidas por poblaciones cercanas (Lloyd 1969) y (Mayfield *et al* 1972).

En términos generales y al igual que otros sistemas bióticos, la influencia de los factores físicos y químicos del suelo como: el pH, humedad, textura del suelo, temperatura, porcentaje de materia orgánica, permiten el desarrollo diferencial de las colonias de estreptomicetos. Estos factores presentes en un hábitat natural influyen en la variabilidad y cantidad de especies de estreptomicetos que se desarrollan en la zona (Goodfellow, 1983).

El pH es claramente un factor determinante en la distribución y actividad de los estreptomicetos. De acuerdo con el pH de los suelos, estas bacterias prefieren pH neutros o alcalinos más que los suelos de pH ácidos, desarrollándose en un rango de 3.5 a 7.5, aunque se han reportado ya varios aislamientos en suelos ácidos (Williams *et al*, 1971). Muchas

cepas de estreptomicetos no pueden proliferar o tiene actividad insignificante a pH inferior a 5.0, y en medios altamente ácidos constituyen con frecuencia menos del 1 % del número viable total bacteriano (Mishustin *et al* 1967). El hecho de que el pH limite tal crecimiento bacteriano, tiene aplicación práctica en el control de ciertas enfermedades vegetales producidas por este género, ya que se usa la acidificación del suelo para eliminar el agente patógeno. Flaig y Kutzner (1960), demostraron de acuerdo a un estudio con suelos ácidos y alcalinos que se pueden desarrollar estreptomicetos acidofílicos, así como alcalinofílicos.

Muchos suelos contienen una gran proporción de arcillas y fracciones coloidales húmicas, provenientes de la descomposición del humus, tal material coloidal, afecta marcadamente la actividad microbiana y los parámetros microambientales. Las esporas de los estreptomicetos son fácil y rápidamente absorbidas por la kaolina, pero no por la montmorilonita, excepto a pH bajo (Ruddick and Williams 1972), La adición de montmorilonita cálcica a cultivos de estreptomicetos, acelera su crecimiento y respiración (Mara and Orangi, 1981). Además, los sitios de absorción asociados con el material húmico puede llevar a los micrositios a elevar el pH en los suelos ácidos. (Williams and Mayfield, 1981).

En los suelos en donde existe mayor cantidad de raíces se han reportado mayor número de estos organismos que en los sitios contiguos del suelo, sin embargo esto depende también del tipo de especies y de la edad de las plantas. Por ejemplo, en el maíz, frijol y espinacas hay más actinomicetos que en otras plantas (Kaunat, 1963). En la rizosfera del frijol se han identificado especies de estreptomicetos que son capaces de producir estreptomycinina particularmente asociada a la presencia de dos genes específicos de la biosíntesis del *Streptomyces griseus* (Huddleston *et al* 1997) Las partículas orgánicas del suelo son colonizadas por el micelio vegetativo, este crece entre los espacios o poros del suelo y finalmente se producen las cadenas de esporas en las partes terminales o en sus ramificaciones (Kutzner, 1981).

En un suelo en condiciones de saturación se presenta menor número de colonias que en aquellos que contienen poca humedad, 2-5%, (Ristaino, 1993). Las condiciones anaeróbicas en suelos saturados debido a la reducción del oxígeno disponible limitan la colonización del suelo (Papendick and Campbell, 1985). Esto es consecuencia de que los estreptomicetos del suelo tienen metabolismo aeróbico y consecuentemente son incapaces de desarrollarse y de diseminarse cuando el oxígeno libre es escaso.

Los estreptomicetos sobreviven bien en suelos secos debido a la formación de artrosporas, pero necesitan una muy baja tensión de agua para su crecimiento, a diferencia de otras bacterias, por ello en los suelos bien drenados como son los arenosos y limosos se presentan mayores cantidades de estos, que en los suelos arcillosos (William *et al*, 1972). En esos suelos secos el número de colonias de estreptomicetos disminuye sensiblemente en tensiones de humedad cercanas a 4.0 pF, pero aún así su proporción con respecto a otras bacterias es mucho mas alta, debido a que sus esporas que son mas resistentes a la desecación que las células vegetativas de las bacterias. En suelos neutros y estériles se ha encontrado que el crecimiento óptimo ocurre en tensiones de humedad que van de 1.5 a 2.5 pF. Algunos estreptomicetos de suelos áridos son capaces de crecer con altos potenciales osmóticos (Wong and Griffin, 1974).

El crecimiento óptimo de los estreptomicetos, con respecto a la temperatura del suelo, se presenta en suelos templados, ya que muchas cepas son mesofílicas, y se encuentran íntimamente ligados a los estados iniciales de descomposición de la materia orgánica, compostas y turberas (fodders) y sustratos similares, pero se ha encontrado que existen cepas

termofílicas que son activas aún a temperaturas cercanas a los 40°C (Lacey,1981). Por ejemplo *Streptomyces albus*, que es mesófilo puede crecer a los 45°C. Craveri y Pagani (1962) propusieron el subgénero *Thermostreptomyces* para estreptomicetos termofílicos y este género esta reconocido por el Manual Bergey bajo los géneros inciertos. Diversos autores reconocen que estas especies son mas termotolerantes que termofílicas (Corbaz, Gregory y Lacey, 1963).

Comúnmente se ha asociado a los estreptomicetos una gran actividad en la degradación de la materia orgánica , teniendo un papel importante en los ciclos de materiales complejos y polímeros recalcitrantes, como la lignocelulosa, celulosa, lignina (Crawford *et al* ,1979), teniendo además, la capacidad de degradar muchos otros polímeros presentes en el suelo y en el mantillo (capa de materia orgánica en proceso de descomposición), incluyendo hemicelulosas, quitina, queratina, pectina, y material de las paredes celulares de los hongos, así también se les ha implicado en la degradación de herbicidas (Percich and Lockwood,1978), plásticos (Sharpell,1980), taninos polifenólicos (Lewis and Starkey,1969) y ácidos húmicos (Szegei y Gulyas,1968).

Es posible que los estreptomicetos puedan proteger a las raíces de las plantas por la inhibición del crecimiento de hongos patógenos, basados en su capacidad de producir antibióticos antifúngicos *in vitro* ,esta situación es todavía muy discutida, existen varios reportes que consideran esta posibilidad (Hopwoody Merrick, 1977; Martín y Demain, 1980).

El orden *Actinomycetales* , al cual pertenece el género *Streptomyces* ,es de especial interés, debido a que muchas cepas tienen la capacidad de sintetizar metabolitos tóxicos. Tres cuartas partes de los estreptomicetos aislados pueden producir agentes antimicrobianos conocidos comúnmente como antibióticos , estas sustancias producidas en cultivos son capaces de inhibir, directamente o al menos en cultivos, el crecimiento o de eliminar poblaciones de bacterias (Gonzalez et al 1999) levaduras y hongos de muchas categorías taxonómicas. El porcentaje de estreptomicetos que producen antibióticos varían con el tipo de suelo y la estación del año (Bae *et al* 1972). Además de producir metabolitos antimicrobianos, de diferentes tipos, muchas especies de *Streptomyces* liberan enzimas extracelulares que provocan la lisis bacteriana (Loutit, 1966). La presencia de este tipo de enzimas puede ser importante en el equilibrio microbiológico del suelo así encontramos que, por ejemplo, los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son químicamente antibióticos distintos pero con un modo de acción y espectro muy similares (Klug&Odelson 1992; Vinning & Studdard 1995).

El fenómeno de antibiosis en el suelo ha recibido especial interés por muchos patólogos de plantas, numerosos estudios sugieren que las enfermedades en el suelo hacia las plantas, pueden ser controladas por la adición de nutrientes tales como la quitina o material de las paredes celulares de los hongos y esto conduce a un incremento de la flora productora de antibióticos, sin embargo se ha mencionado que no es tan solo el propio enriquecimiento lo mas importante, sino también la capacidad de desarrollar efectos líticos sobre hongos, debido a la composición de se su pared la cual contiene quitina. *Streptomyces humidus*, produce dos sustancias antifúngicas, SH1 y SH2 que han sido identificadas como ácido fenilacético fenilacetato de sodio respectivamente, las cuales inhiben el crecimiento de *Phytium ultimum* y *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solana* *Sacharomyces cerevisiae* y *Pseudomona syringae* a bajas concentraciones (Byung et al 2001); Existen mecanismos sugeridos de efectos de los estreptomicetos sobre los hongos del suelo, por ejemplo en el control de los hongos patógenos de las raíces de las plantas, los mecanismos sugeridos son: el de la lisis por enzimas (por ej. Quitinasa.) Mitchell,1963; antibióticos fúngicos (Rem, 1953), inhibición por toxinas no específicas (Sneh and Henis, 1972).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Aislar e identificar la especies del género *Streptomyces* presentes en el suelo de una granja porcícola valorando su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas del tracto respiratorio del cerdo.

2.2 Objetivos particulares

2.2.1 Determinar el porcentaje de humedad, materia orgánica, pH y textura de las muestras del suelo colectadas en la granja porcícola.

2.2.2 Probar diferentes medios de cultivo que permitan el aislamiento de estreptomicetos.

2.2.3 Aislamiento y purificación de especies de *Streptomyces*

2.2.4 Caracterización morfológica de las especies a través del crecimiento en medios ISP

2.2.5 Identificar las diferentes especies del género *Streptomyces* por medio de las pruebas bioquímicas y microscopia electrónica.

2.2.5 Evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de estreptomicetos contra *B. bronchiseptica*; *P. multocida*; *A. pleuropneumoniae*; *H. parasui*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella typhi*; *Escherichia coli* y *S. faecalis*.

2.3. JUSTIFICACION

El aumento de los diversos trastornos de salud en la pira ha producido una alta utilización de antibióticos, ya sea en forma individual o en combinación por parte del porcicultor, y por ende un abuso en su uso , aunado a ello los agentes microbianos han ido desarrollando formas diversas de resistencia a los diferentes productos existentes en el mercado veterinario. Algunos de estos productos antibióticos se han sintetizado a partir de metabolitos diversos producidos por bacterias del género *Streptomyces*, por lo cual en el presente trabajo se considera relevante aislar e identificar las especies de estreptomicetos que habitan en el suelo de una granja de explotación porcícola convencional, buscando obtener un posible aprovechamiento de los metabolitos que producen como una fuente alternativa de posible actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas del tracto respiratorio del cerdo.

Con respecto al aislamiento de estreptomicetos en el suelo, se han realizado un gran número de estudios incluyendo sedimentos marinos y excrementos, pero no se han reportado investigaciones en el suelo de granjas avícolas y porcícolas,

3.MATERIALES Y METODOS.

3.1 Zona de estudio.

Sitio de muestreo. La zona de trabajo de donde se hizo la colecta de las muestras del suelo es una granja de explotación porcícola que se ubica en San Mateo Ixtacalco, municipio de Cuautitlán, Estado de México, con una superficie aproximada de 250 m².

Los suelos de esta zona se caracterizan por la existencia de aluviones de textura fina, representados por arcillas y que pertenecen al orden de Inceptisoles, subgrupo mólicovertico. En la zona se presenta un clima de tipo templado húmedo con lluvias en verano (Flores *et al* , 1981).

3.2. Colecta del suelo y determinación de características fisicoquímicas

En la granja se seleccionaron al azar 10 sitios de muestreo y con una barrena tipo california de 7.6 cm de diámetro se colectaron al azar 30 muestras de suelo a tres diferentes profundidades: 0-5 cm, 5-10 cm y 10-15 cm. Colectadas las muestras se almacenaron en bolsas de plástico negro y se transportaron al laboratorio.

Las muestras se pesaron y se dejaron secar a temperatura ambiente, volviéndose a pesar después de 48 horas y determinar el porcentaje de humedad de cada una.

A todas la muestras se les determino adicionalmente el pH por el método de suspensión 1:2.5 utilizando un potenciómetro Corning modelo 10 con electrodo integrado.

Se determino la textura, por el método del hidrómetro de Bouyoucos (1963). El análisis del porcentaje de materia orgánica de realizo por el método de Walkley (1947).

Asimismo se sometieron a secado en estufa 40-45⁰C durante 16 horas para reducir la flora bacteriana sin afectar a las posibles colonias de estreptomicetos en el aislamiento (Williams *et al* 1972).

3.3 Evaluación de diferentes medios de cultivo que permitan el aislamiento de estreptomicetos

Se probaron 4 diferentes medios de cultivo para lograr el aislamiento de colonias específicas de estreptomicetos: Agar Emerson, Mycosel Agar, Agar tripticasa soya y Agar almidón caseína.

De cada una de las muestras del suelo se tomo una alícuota de 50 g de suelo y se suspendió en 100 ml de agua desionizada estéril. Las muestras se agitaron durante 60 minutos en un Roto-mix a baja velocidad. Posteriormente, en forma estéril, se prepararon diluciones de cada una de las muestras sembrándose 0.1 ml de cada una de ellas en los cuatro diferentes medios de cultivo para el aislamiento, incubándose durante un periodo de 14-21 días 30⁰C

3.4 Cultivo y Pruebas bioquímicas

Las cepas aisladas de cada muestra se cultivaron y purificaron en el medio de agar- extracto de malta y levadura, incubándose durante 14 días a 30°C y a partir de estas se realizaron las pruebas bioquímicas necesarias para su identificación a nivel de género basadas en : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt,J.G, 1977).

Catalasa, oxidasa, nitrato, malato, urea, RM, VP,O/F, SIM, TSI, MIO, LIA , y el grupo de azúcares (arabinosa; fructuosa;galactosa; glucosa, inositol,manitol, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicín y xilosa preparados en medio ISP 9)

3.5 Caracterización morfológica

Para evaluar el tipo de crecimiento, producción de pigmentos color del micelio aéreo, morfología de la cadena de esporas (Sahin,N.2004) y (Shirling *et al* 1966) y tipo de superficie de la spora (Tresner *et al.*,1961), las cepas de estreptomicetos purificadas se sembraron en los siguientes medios de cultivo Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP 2), agar avena (ISP 3) agar almidón-sales de inorgánicas (ISP 4), agar glicerol-asparagina (ISP 5), agar peptona-extracto de levadura (ISP6), agar tirosina (ISP 7), agar nitrato (ISP 8).

3.6 Microscopia

Para la caracterización de las formas de crecimiento de la cadena de esporas y de la superficie de la esporas se utilizó microscopia electrónica de barrido, cultivando las cepas purificadas durante 14 días en agar extracto de malta-extracto de levadura a 30°C; de donde en forma estéril se tomaron muestras directamente para observar en el microscopio compuesto(Shirling *et al* 1966); para la observación en el microscopio electrónico de barrido Modelo JEOL 25SII, las muestras se tomaron de este mismo medio, se fijaron durante 48 horas con vapores de tetraóxido de osmio, posteriormente se secaron y se cubrieron con oro para su observación al microscopio (Eguchi,1993).

3.7 Pruebas de actividad antimicrobiana

Las cepas de estreptomicetos aisladas del suelo y purificadas se cultivaron para su esporulación en el medio de extracto de malta-extracto de levadura adicionado con glucosa, ajustado a pH7.2, incubándose durante 72 horas a 30°C con una agitación de 130 rpm, midiendo la cantidad de biomasa cada 12 horas en un espectrofotómetro Varian modelo 20.

| Medio de Esporulación | |
|-----------------------|---------|
| Glucosa | 4.0 g |
| Extracto de malta | 10.0 g |
| Extracto de levadura | 4.0 g |
| Agua desionizada | 1000 ml |

3 ml del medio de esporulación se adicionaron al medio de fermentación histidina-fructosa-sales minerales, ajustado a pH 7.2 (Williams *et al* 1977). El medio se mantuvo en agitación a una velocidad de 130 rpm durante 144 horas a 30 ° C.

Medio de Fermentación

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Fructuosa | 40.00 g |
| Ac. Glutámico | 2.20 g |
| L-histidina | 0.77 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1.00 g |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 49.50 mg |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 45.00 mg |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 46.80 mg |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 40.35 mg |
| Agua desionizada | 1000 ml |

Cada 24 horas se tomaron muestras de 5 ml del sobrenadante de cada una de las cepas de estreptomicetos aisladas. Se centrifugaron, se esterilizaron por filtración con membranas Millipore de 0.2 micras. Con 20 µl del filtrado se impregnaron discos de papel Whatman # 1, se secaron y almacenaron a 4°C hasta su uso. La actividad antimicrobiana de cada disco se probó colocándolos en cajas de medio Mueller Hinton con las siguientes bacterias ATCC patógenas del cerdo: *Actinobacillus pleropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Pastereulla multocida* tipo A y D, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

4. RESULTADOS

4.1 Colecta del suelo y determinación de características fisicoquímicas

Se colectaron un total de 30 muestras del suelo, 10 muestras de profundidad 0-5 cm, 10 de profundidad 5-10 cm y 10 de profundidad 10-15 cm. En la tabla 1 se presentan los resultados promedio de las características fisicoquímicas relevantes a la posible presencia de colonias de estreptomicetos.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo

| PROFUNDIDAD (cm) | pH | % MO | Humedad | Textura |
|------------------|------|------|---------|-------------------------|
| 0-5 | 7.29 | 6.30 | 4.18 | Mijajón arcillo arenoso |
| 5-10 | 6.97 | 6.16 | 3.87 | Migajón arcillo arenoso |
| 10-15 | 6.49 | 6.00 | 3.20 | Migajón arcillo arenoso |

Como se observa en la tabla 1, la profundidad a la cual se tomaron las muestras presenta el mismo tipo de textura del suelo, aunque si es evidente que el índice de acidez es cercano a la neutralidad en la capa intermedia, mientras que en las capa superior tiende a la basicidad y en la inferior, el grado tiende a la acidez, mientras que el porcentaje de materia orgánica disminuye al avanzar en profundidad al igual que el contenido de agua.

Asimismo, en la tabla 2 se observa la cuantificación promedio de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las muestras de suelo en relación a las tres distintas profundidades de donde se tomaron las muestras.

Tabla 2. Promedio de UFC 1×10^4 g/Suelo

| Profundidad (cm) | UFC |
|------------------|-----|
| 0-5 | 4.4 |
| 5-10 | 5.0 |
| 10-15 | 1.5 |

En la profundidad intermedia se presenta un número mayor de Unidades Formadoras de Colonias, no así en la capa inferior, en donde se observa un índice demasiado bajo en comparación a las otras dos profundidades.

4.2 Evaluación de diferentes medios de cultivo que permitan el aislamiento de estreptomicetos

De los 4 medios de evaluación para el aislamiento propuestos en la metodología, se descartaron tres de ellos, ya que en algunos casos, además de permitir el crecimiento de estreptomicetos, también lo hacían otro tipo de microorganismos o definitivamente no permitían el aislamiento de las colonias en estudio.

En el caso del medio de cultivo agar Emerson permitió aislar estreptomicetos, pero también junto con ellos otros microorganismos, a este medio como se menciona en la metodología, no se le agregó ningún antibiótico.

El medio Mycosel™ agar, no permitió el aislamiento de colonias de estreptomicetos a partir de las muestras de suelo, lo mismo sucedió en el caso del uso del medio Agar soya tripticasa.

El único medio que permitió el aislamiento total de las colonias de estreptomicetos fue el de agar almidón caseína propuesto por Kutzner (1964), el cual fue adicionado con los antibióticos reportados por Porter (1960), Sulfato de polimixina B 5mcg/ml, Penicilina G sódica 1mcg/ml y Ciclohexamida y Nistatina 50mcg/ml. (Williams 1965) Estas adiciones se hicieron de forma estéril después de haber esterilizado el medio.

Se logró aislar un total de 13 cepas de estreptomicetos, con las cuales se continuaron los estudios posteriores.

4.3. Cultivo y Pruebas bioquímicas

Se lograron aislar un total de 13 cepas de estreptomicetos a las cuales se cultivaron y purificaron en el medio de agar extracto de malta y levadura. A estas muestras se les practicaron las pruebas bioquímicas indicadas en la tabla 3, las cuales son básicas para determinar familia y género.

En la tabla 3 se presentan los resultados de los diferentes parámetros bioquímicos practicados a las trece cepas aisladas.

4.4 Caracterización morfológica

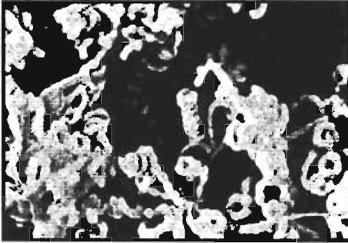
Para evaluar el tipo de crecimiento, producción de pigmentos color del micelio aéreo, morfología de la cadena de esporas y tipo de superficie de la espora (Tresner *et al.*, 1961), las cepas de estreptomicetos purificadas se sembraron en los siguientes medios de cultivo Agar extracto de levadura-extracto de malta (ISP 2), agar avena (ISP 3) agar almidón-sales de inorgánicas (ISP 4), agar glicerol-asparagina (ISP 5), agar peptona-extracto de levadura (ISP6), agar tirosina (ISP 7) y agar nitrato (ISP 8), incubándose 30°C durante 14 días. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características morfológicas y crecimiento de estreptomicetos

| CEPAS AISLADAS | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|----|-----|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Color micelio | Bco | G | Bco | Bco | G | G | G | G | G | Bco | G | G | Bco |
| Superficie de espora | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | Sm | H | Sm |
| Cadena de esporas | S | S | Rf | Rf | Rf | S | Rf | S | Rf | Rf | S | Rf | Rf |
| Melanina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Crecimiento en ISP 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en ISP 3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en ISP 4 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en ISP 5 | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | + | + | - |
| Crecimiento en ISP 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en ISP 7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Crecimiento en ISP 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Bco= blanco; G=gris; Sm=lisa; H= con vellosidades; S=espiral; Rf=rectoflexuoso

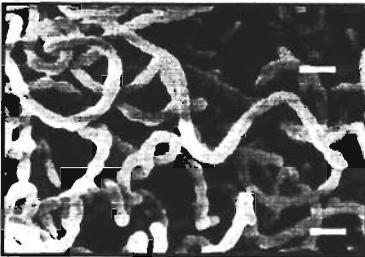
Las formas de crecimiento de la cadena de esporas, así como el tipo de superficie de la esporas, que en solo en una cepa fue espinosa y en el resto de las cepas se encontró que el tipo de superficies de esporas fue liso., se observan estos casos en las imágenes que se anexan, tomadas con microscopia electrónica de barrido (10000x) en el laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan-UNAM. (barra= 1micra)



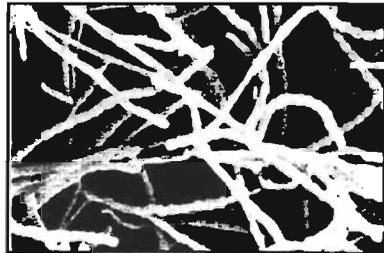
Cepa 1. *Streptomyces rimosus*



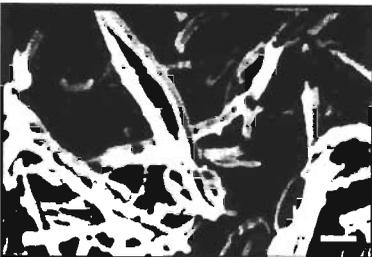
Cepa 2. *Streptomyces erumpus*



Cepa 3. *Streptomyces sp.*



Cepa 4. *Streptomyces aureocirculatus*



Cepa 5. *Streptomyces platensis*



Cepa 6. *Streptomyces catenulae*

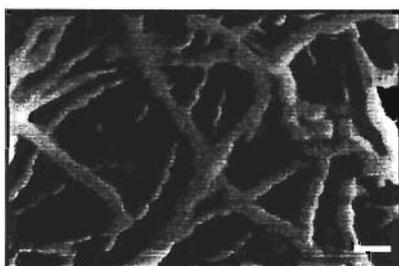
(Fotos: Rodolfo Robles Gómez)



Cepa 7. *Streptomyces* sp.



Cepa 8. *Streptomyces erumpus*



Cepa 9. *Streptomyces* sp.



Cepa 10. *Streptomyces vendargus*



Cepa 11. *Streptomyces lividans*



Cepa 12. *Streptomyces* sp.

(Fotos: Rodolfo Robles Gómez)

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a pruebas bioquímicas, utilización de azúcares, producción de pigmento, color del micelio, formas y tipos de crecimiento en medios ISP, así como el tipo de superficie de la esporas, se lograron identificar a nivel de especie 9 cepas de un total de 13 cepas aisladas, las 4 restantes sólo se logró su identificación a nivel de género.

CEPA 1. *Streptomyces rimosus*

CEPA 8. *Streptomyces eumpus*

CEPA 2. *Streptomyces erumpus*

CEPA 9. *Streptomyces sp.*

CEPA 3. *Streptomyces sp.*

CEPA 10. *Streptomyces vendargus*

CEPA 4. *Streptomyces aureocirculatus*

CEPA 11. *Streptomyces lividans*

CEPA 5. *Streptomyces platensis*

CEPA 12. *Streptomyces sp.*

CEPA 6. *Streptomyces catenulae*

CEPA 13. *Streptomyces vendargus*

CEPA 7. *Streptomyces sp.*

4.5 Pruebas de actividad antimicrobiana.

Los resultados de la evaluación de actividad microbiana contra cepas ATCC de bacterias patógenas del cerdo se presentan en la tabla 6

Tabla 6. Prueba de actividad antimicrobiana

CEPAS AISLADAS de *Streptomyces*

| CEPA ATCC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--------------------------------------|----|---|---|---|----|---|---|---|---|----|----|----|----|
| <i>S. faecalis</i> | 10 | * | 8 | * | 8 | 8 | * | * | * | * | * | 10 | * |
| <i>S. tiphy</i> | 14 | * | 8 | * | * | 8 | * | * | * | * | 10 | * | * |
| <i>S. aureus</i> | 10 | * | * | 8 | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| <i>E. coli</i> | 10 | * | * | * | * | 8 | 8 | * | 8 | * | * | 8 | * |
| <i>P. multocida</i> <i>Tipo A</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| <i>P. multocida tipo D</i> | 8 | * | * | * | 10 | * | * | * | * | * | 8 | * | * |
| <i>H. parasitus</i> | 16 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| <i>B. Bronchiseptica</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |

Halo de inhibición (mm) * sin actividad antimicrobiana

5. DISCUSION.

Uno de los habitats de preferencia para el desarrollo de las colonias de estreptomicetos, es el suelo, ahí el 90 % de los actinomicetos que se logran aislar pertenecen al género *Streptomyces* (Paul and Clark, 1989; Suzuki et al 1994).

Observando los resultados de las condiciones fisicoquímicas analizadas de las muestras de suelo de nuestro estudio, podemos establecer , que la capa del suelo de profundidad intermedia , presenta el pH mas cercano a la neutralidad, un contenido de materia orgánica alto y una humedad suficiente para permitir que el agua penetren en los espacios porosos de la propia textura migajón arcillo arenosa y proveer así las condiciones apropiadas para la proliferación del micelio y la consecuente producción de esporas, estructura bajo la cual los estreptomicetos pueden existir en el suelo por largos periodos de tiempo (Kutzner, 1981; Goodfellow and Williams, 1983).

Mientras que la disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores que gobiernan la distribución y actividad de los estreptomicetos del suelo, la temperatura, el factor pH y el contenido de humedad, así como el tipo de suelo son otros parámetros que tienen una gran influencia, al igual que la temporada y el clima (Williams *et al*, 1972).

De acuerdo al número promedio de UFC/g del suelo obtenidas, 4.4 y 5.0 para la profundidad de 0-5 cm y 5-10 cm del suelo respectivamente, y en concordancia con el pH, la humedad y el contenido de materia orgánica para esa profundidades, es razonable deducir la presencia de estos organismos y es evidente como para la tercera profundidad del suelo (10-15 cm) el número de UFC disminuye drásticamente, aun cuando los índices arriba citados disminuyen en un pequeño porcentaje, menos del 10%, una razón para ello la encontramos en que estos organismos son aerobios tal y como lo demostró la prueba bioquímica de oxidación y/o fermentación, en donde se aprecia que todas las cepas aisladas metabolizan el azúcar en presencia de oxígeno. A medida que se aumenta la profundidad, la disponibilidad de oxígeno va disminuyendo tanto por la propia presión del suelo, como por la compactación y reducción de los espacios aéreos existentes entre las partículas del suelo (Hagerdon, 1976).

Por el alto contenido de materia orgánica, que se observa en la tabla 1, la cual tiene una variación cercana al 5 % entre la capa más superficial y la capa de mayor profundidad, podríamos haber esperado un conteo de UFC más equilibrado para las tres capas , pero relacionado con la humedad y con la disminución lógica del oxígeno presente, se puede inferir la razón por la cual el número de UFC es tan inferior en la capa de mayor profundidad.

Considerando este punto y tomando en cuenta que los estreptomicetos tienen un papel preponderante en la degradación de los ácidos húmicos (Szegi and Gulyas, 1968), así como su condición aeróbica y la propia textura del suelo que permite la fijación de esporas a las partículas arcillosas (Ruddick and Williams, 1972), se explica el alto valor de UFC en la capa intermedia de las muestras de suelo analizadas, lo que coincide con la propia composición física del suelo que refiere Gonzalez et al (1999), y que también reporta alto contenido de estreptomicetos en los suelos en donde predomina la arcilla como componente principal.

Otro factor determinante en la distribución de los estreptomicetos es el pH, en este estudio, el número de UFC más alto, 5.0, se obtuvo en la capa intermedia del suelo, en donde el valor del pH tiende a la neutralidad y el menor conteo de UFC se presenta una vez más en la capa más profunda donde el valor de pH es ligeramente ácido, lo que nos demuestra que por lo menos las cepas de estreptomicetos aisladas de estos suelos, son preferentemente neutrófilas, Corke and Chase (1964), indican que efectivamente existe una disminución de cepas aisladas a medida que el pH disminuye de neutro hacia valores ácidos. También existen reportes de que la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios es influenciada por el pH (Lee & Hwang, 2002)

Hagerdom (1976), presenta una efectiva disminución de las UFC aisladas a medida que el valor de pH cambia de neutro a ácido y también disminuye con la profundidad, es importante destacar que uno de los suelos de la zona de estudio, con las que el trabajo, pertenece a la llamada serie Dayton, formado por depósitos aluviales por el cual se caracteriza por un pH promedio de 6.8, un contenido de materia orgánica de 6.0 y un porcentaje de arcillas de 22.7 en lo que se refiere al horizonte A o capa superficial y expuesta del suelo. Lo anterior es muy concordante con el tipo de suelo estudiado en este trabajo, el cual también está formado por depósitos aluviales arcillosos con contenido de materia orgánica entre el 5 y 6 % y pH con tendencia a la neutralidad (Flores et al, 1981) y con respecto a las UFC aisladas muestra una tendencia muy similar.

El aislamiento de los actinomicetos del resto de la flora bacteriana presentes en la naturaleza es complicado por su propia característica de lento crecimiento en comparación a otras bacterias del suelo por ello se recomienda la adición de estos antibióticos que permitan solamente aislar colonias de estreptomicetos, aunque también pueden inhibir el crecimiento de otras cepas del mismo género (Hirsch and Christensen, D.L. 1983). El uso de antibióticos selectivos para aislar estreptomicetos en presencia de otras bacterias puede resultar menos efectivo, debido a que el espectro de sensibilidad a menudo se traslapan, pero es recomendable su utilización para facilitar el aislamiento, sobre todo cuando su espectro de sensibilidad es bien conocido (Mayfield *et al.*, 1972; Vickers *et al.*, 1984).

Aunque la selectividad de los procedimientos de aislamiento puede ser influenciada por el propio pretratamiento de las muestras, la selección de los medios de aislamiento, así como el uso de inhibidores selectivos en el medio, definitivamente tienen un vital relevancia para lograr los primoaislamientos (Williams, S.T. *et al.*, 1988), ya que la competencia con hongos y otros microorganismos es inhibida por esa incorporación de agentes antifúngicos y antibióticos en los medios; los estreptomicetos son generalmente insensibles a estos compuestos a concentraciones de 50 mcg/ml .

De los diferentes medios empleados para lograr el aislamiento de los estreptomicetos, definitivamente dos de ellos no tuvieron la efectividad para lograrlo, me refiero al agar soya tripticasa y al agar de marca comercial MycoselTM (donado por Becton and Dickson) el cual incluye dos antibióticos tal como la ciclohexamida y el clorafenicol., inclusive el agar Emerson permitió el crecimiento de estreptomicetos, pero también el de otros microorganismos. El único medio que permitió aislar únicamente a las colonias de estreptomicetos fue el de agar almidón caseína (Kutzner, 1964) al cual se le adicionaron antibióticos como la Ciclohexamida (actidiona) y Nistatina 50mcg/ml (Porter et al., 1960) y Sulfato de polimixina B y 5mcg/ml ** y Penicilina G sódica 1mcg/ml (Williams, 1965).

Williams and Davis (1965) reportaron que el uso único de la actidiona a la concentración de 50 mcg/ml en el medio de almidón caseína solo logro inhibir completamente el 22 % de hongos, parcialmente inhibió al 56 % y no inhibió el 22% de los hongos; por otra parte al aplicar solamente la nistatina a la concentración de 50 mcg/ml en el mismo medio se logro una inhibición completa del 69% de la población de hongos en el proceso del aislamiento de los estreptomicetos, siendo parcialmente inhibida el 22% de los hongos y lograr un 9% de hongos no inhibidos; pero al combinar la actidiona más la nistatina a concentraciones de 50 mcg/ml se logro inhibir completamente el 89% de la población fungica e inhibiendo parcialmente al 16% y con ello lograr la inhibición total de hongos en el medio de aislamiento.

En este mismo estudio se utilizó el sulfato de polimixina B (5mcg/ml) y la penicilina sódica (1.0 mcg/ml) como agenteas antibacterianos; mucha cepas bacterianas fueron inhibidas, aunque los resultados no fueron tan marcados como el uso de los agentes antifungicos ya mencionados. Por lo tanto ahí se planteo el uso de la actidiona y nistatina en combinación con la polimixina B y la penicilina sódica.

En el medio de agar almidón-caseína se adiciono la ciclohexamida, comúnmente conocida como actidiona, que ha sido ampliamente usada en conjunto con la nistatina en las concentraciones indicadas de 50mcg/ml, con el fin de inhibir la presencia de agentes fungicos; aunque algunos otros tal como la pimarcina y el mycostatin (nistatina) son más efectivas (Porter et al 1960; Williams and Davies 1965).

El uso de la polimixina B, en concentración de 5 mcg/ml y de penicilina a razon de 1mcg/ml fue necesaria para inhibir el crecimiento de otros géneros del orden actinomycetales, estos antibióticos ya habían sido utilizados por Williams and Davis (1965) obteniendo aislamientos selectivos de estreptomicetos.

Otro punto muy importante a considerar es que tanto el Agar Emerson como el Agar almidón caseína fueron ajustados pH 7.2 cercanos a la neutralidad, de ahí que muchos estreptomicetos aislados pudiéramos referirlos como neutrófilos (Williams *et al.*, 1971); esto por si mismo, es otro punto que facilitó su aislamiento, además de las propias fuentes de carbono y nitrógeno presentes sobre todo en el segundo medio, entre estas podemos citar al almidón, la caseína y la fuente de nitrato. Por ello dos de los medios mas usados para el aislamiento es el de almidón caseína (Küster and Williams, 1964) y el agar quitina (Hsu and

concentraciones indicadas de 50mcg/ml, con el fin de inhibir la presencia de agentes fungicos; aunque algunos otros tal como la pimarcina y el mycostatin (nistatina) son más efectivas (Porter et al 1960; Williams and Davies 1965).

El uso de la polimixina B, en concentración de 5 mcg/ml y de penicilina a razón de 1mcg/ml fue necesaria para inhibir el crecimiento de otros géneros del orden actinomycetales, estos antibióticos ya habían sido utilizados por Williams and Davis (1965) obteniendo aislamientos selectivos de estreptomicetos.

Otro punto muy importante a considerar es que tanto el Agar Emerson como el Agar almidón caseína fueron ajustados pH 7.2 cercanos a la neutralidad, de ahí que muchos estreptomicetos aislados pudiéramos referirlos como neutrófilos (Williams *et al.*, 1971); esto por sí mismo, es otro punto que facilitó su aislamiento, además de las propias fuentes de carbono y nitrógeno presentes sobre todo en el segundo medio, entre estas podemos citar al almidón, la caseína y la fuente de nitrato. Por ello dos de los medios mas usados para el aislamiento es el de almidón caseína (Küster and Williams, 1964) y el agar quitina (Hsu and Lockwood, 1975).

Desde el punto de vista práctico, es conveniente como primer paso realizar un perfecto aislamiento y obtener cultivos puros para poder realizar el número de pruebas bioquímicas necesarias incluyendo los aspectos morfológicos y bioquímicos y anatómicos que permitan la identificación de los organismos objeto de estudio; recomendándose para ello utilizar cultivos jóvenes

De las 13 cepas aisladas de las muestras del suelo se cultivaron y purificaron en el medio de agar extracto de malta y levadura. A estas muestras se les practicaron las pruebas bioquímicas indicadas para determinar género.

Como se observa en la tabla 3, todas las especies aisladas son organismos aeróbicos con procesos oxidativos, como lo demuestra el grado positivo para los parámetros de oxidasa y O/F y citrato, indicando además su dependencia y requerimientos de oxígeno para realizar su metabolismo. En cuanto a los resultados de las hidrólisis de almidón, caseína y gelatina, se observa que para las trece cepas aisladas, estos parámetros evaluados todos son positivos, concordando con lo establecido por Shirling *et al* 1966 y por Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, J.G, 1977).

Respecto a la utilización de azúcares, cuyos resultados se presentan en la tabla 4, y en donde se evaluaron once diferentes tipos de azucares, observamos que todas las especies metabolizan a la fructuosa, glucosa, inositol y manitol y que definitivamente, ninguna especie utiliza a la ramnosa, salicin y xilosa; estos patrones son utilizados como un criterio adicional para la clasificación e identificación de las especies de estreptomicetos. (Pridham, 1976.).

Estas evaluaciones o pruebas bioquímicas ubicaron a las especies aisladas del suelo, como pertenecientes a la familia *Streptomyetaceae* y al género *Streptomyces* de acuerdo a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, J.G, 1977).

En la evaluación del tipo de crecimiento, producción de pigmentos y color del micelio

aéreo, así como la morfología de la cadena de esporas(Shirling *et al* 1966) y tipo de superficie de la espora (Tresner *et al.*,1961), el crecimiento de las trece especies se produjo de manera positiva en 6 de los medios ISP , únicamente en el medio ISP 5, alrededor del 50% de las especies no crecieron en esas condiciones de nutrientes.

El color del micelio predominante, en las especies aisladas, fue el color gris, presentándose en 8 de las especies y en las 5 especies restantes, el color del micelio fue el blanco. No se presento una gran variedad de color.

La superficie de la espora, la cual se observó por microscopia electrónica de barrido, nos revelo que exceptuando una especie, las doce restantes tuvieron su superficie lisa (smooth(Sm)) y sólo en una de ellas se observo la superficie fibrosa (hairy(H)). Flaig *et al* (1952) reporta cuatro posibles tipos de superficies de esporas (Smooth, warty, hairy and spiny) asignándoles un criterio taxonómico, y aunque algunas veces esto puede dificultarse , es indispensable utilizar el microscopio electrónico de barrido.

Con respecto a la forma del crecimiento de la cadena de esporas, algunos autores han distinguido hasta 15 tipos morfológicos diferentes (Ettlinger *et al* ,1958), posteriormente existe una clasificación mucho mas simple propuesta por Pridham, Hasseltine and Benedict (1958), utilizando unicamente tres tipos morfológicos para clasificar a las especies de estreptomicetos: recto-flexuoso (RF),curvos (RA) y espirales (S). De las trece especies aisladas , encontramos que 8 especies siguieron un patrón recto-flexible (RF) y las 5 restantes, tuvieron un desarrollo en espiral (S) y ninguna de ellas tuvo crecimiento curvo. Li W.J. *et al* (2002), también encuentran que las cepas aisladas de suelos de Beijiang, provincia China, tuvieron un crecimiento de la cadena de esporas en forma rectoflexible y ocasionalmente curvas.

Se puede establecer que de acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a su bioquímica, forma de crecimiento, color del micelio y tipo de superficie de espora, no se presento una gran diversidad de características y por ello el tipo de especies presentes y que se pudieron aislar, cultivar, clasificar e identificar fue menor para este tipo de suelo de la granja, en donde las condiciones del mismo son demasiado estables en cuanto a temporalidad y características de uso.

Utilizando los metabolitos producidos por las 13 cepas de estreptomicetos aislados del suelo de la granja porcícola se evaluó su posible actividad antimicrobiana en contra de cepas bacterianas ATCC patógenas del cerdo.

Actinobacillus pleuropneumoniae, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*,

Pastereulla multocida tipo A y D, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella tiphy* y *Escherichia coli*.

En general podemos observar, que en total, de las 13 cepas de estreptomicetos aislados del suelo de la granja porcícola, únicamente 9 de ellas produjeron metabolitos que presentaron cierta actividad en contra de cualquiera de los dos grupos de bacterias patógenas del cerdo, ya sean de afectación digestiva o respiratoria; mientras que las 4 cepas restantes no desarrollaron ningún metabolito con actividad hacia ambos grupos.

En 1999, Gonzalez, et al, reportan que de 800 cepas aisladas de seis diferentes tipos de suelos, 48 de ellas (6%) produjeron algún tipo de antibiótico y 25 de ellas producían lincosamidas, 16 producían macrólidos y 6 streptogramina y solo tres cepas produjeron tanto lincosamida como macrólidos.

Como se observa el porcentaje de cepas productoras de ciertos antibióticos es muchos mas alto en unas 10 veces que lo reportado por ellos, sin embargo es conveniente realizar estudios químicos que permitan purificar y caracterizar químicamente a las sustancias antibióticas que reportamos con cierta actividad.

De estas 9 cepas, el 77 % de ellas presentaron algún metabolito que desarrolló un halo de inhibición únicamente cuando se enfrentaron a bacterias patógenas del tracto gastrointestinal y solamente el 23 % presentó actividad en contra de la bacterias que afectan las vías respiratorias porcinas.

De igual manera es importante resaltar que de las 9 cepas de estreptomicetos aislados e identificados, el 10 % sintetizó metabolitos que actuaron contra bacterias grampositivas; el 30 % presento actividad únicamente sobre bacterias gramnegativas y el 60% restante presento actividad contra ambos grupos de bacterias.

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que los metabolitos de la cepas de estreptomicetos que se aislaron del suelo, muestran una tendencia de cierta actividad antimicrobiana contra las cepas patógenas del cerdo evaluadas en el presente trabajo; especialmente la cepa número 1, identificada taxonómicamente como *Streptomyces rimosus* la cual, presentó el mayor porcentaje de actividad en base al halo de inhibición mostrado, teniendo una baja actividad en contra de *Pastereulla multocida* tipo D, una mediana actividad en contra de *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; y una alta actividad en contra de *Salmonella tiphy* y *Haemophilus parasuis*. Este mismo metabolito no mostró actividad alguna en contra de *Pastereulla multocida* tipo A, *Bordetella bronchiseptica* así como para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Lo anterior nos lleva a inferir que en este caso, la cepa de estreptomiceto, no muestra un patrón general de actividad preferencial en contra de bacterias patógenas ya sean del tracto digestivo o del tracto respiratorio del cerdo, por el contrario actuó sobre ambos grupos.

La cepa número 3, identificada taxonómicamente solo a nivel de género, presento cierta actividad en contra de *Streptococcus faecalis* y *Salmonella tiphy*, dos bacterias que afectan el tracto gastrointestinal del cerdo; la cepa número 6, *Streptomyces catenulae*, presentó un halo de inhibición de baja actividad en contra de tres bacterias que típicamente afectan los

conductos gastrointestinales, *Streptococcus faecalis* y *Salmonella tiphy* y *Escherichia coli*; por otra parte la cepa número 12, identificada solo a nivel de género, presento actividad solo contra *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*. El resto de las 5 cepas restantes mostraron algún halo de inhibición solamente contra bacterias patógenas del tracto digestivo y dos de ellas incluso tuvieron actividad en contra de *Pastereulla multocida* tipo D.

De los resultados de esta evaluación podemos inferir, que el hecho de que los estreptomicetos que se aislaron del suelo de esta granja porcícola convencional, produzcan, a nivel de laboratorio, ciertos metabolitos que afectan *in vitro* a bacterias patógenas del cerdo nos lleva a pensar en que es necesario realizar más investigaciones tanto a nivel microbiológico como bioquímico y terapéutico con estos metabolitos, y tratar de desarrollar alguna alternativa antimicrobiana disponible para participar de alguna manera en el ámbito porcícola, que actualmente ha intensificado el uso de antibióticos indiscriminadamente provocando con ello un alto índice de resistencia por parte de los agentes patógenos. Asimismo se deben estudiar otras líneas que permitan comprender y englobar el intrincado panorama de las relaciones que se establecen entre el ambiente físico y biológico de la granja, el manejo alimenticio y de sanidad por parte del productor y por ende de las cualidades de los propios animales.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

6. CONCLUSIONES

De acuerdo al desarrollo general de la presente investigación y a los resultados obtenidos, podemos concluir :

- Respecto a las condiciones del suelo todos los estreptomicetos aislados se ubicaron en muestras de suelo con alto contenido de materia orgánica, un pH muy cercano a la neutralidad y una textura del suelo conocida como migaron arcillo-arenosa.
- En cuanto a lo medios de aislamiento., el medio que resulto más adecuado para este proceso de aislamiento de los estreptomicetos del suelo, fue el de agar almidón caseína adicionado con ciclohexamida y nistatina, así como sulfato de polimixina B y penicilina sódica.
- Se logro aislar 13 cepas de estreptomicetos de las muestras del suelo de una granja porcícola de explotación conveccional.
- Se identificando taxonómicamente en base a pruebas bioquímicas, formas de crecimiento y tipo de superficie de spora a las trece cepa aisladas, 9 de ella a nivel de especie y 4 solamente a nivel de género.
- De las cepas aisladas e identificadas , nueve de ellas presentaron alguna actividad antimicrobiana en base al halo de inhibición desarrollado contra bacterias patógenas del cerdo ya sea del tracto gastrointestinal y/o respiratorio.
- Una cepa identificada como *Streptomyces rimosus* tuvo actividad antimicrobiana contra 4 bacterias patógenas que colonizan el conducto gastrointestinal del cerdo y en contra de 2 bacterias que se desarrollan en las vías respiratorias; incluso contra *Haemophilus parasuis*, presento el mayor halo de inhibición de las cepas evaluadas.
- Las nueve cepas de estreptomicetos que sintetizaron alguna sustancia afectaron en menor grado a bacterias grampositivas, en un gran porcentaje afectaron tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas y también en un menor grado solo a bacterias gramnegativas, es decir el mayor numero de cepas actuaron en mayor grado o actividad contra ambos tipos de bacterias.

7. BIBLIOGRAFIA

Burroughs, N. J., Marsh, P., Wellington, E. H. M. 2000. Mathematical Analysis of Growth and Interaction Dynamics of Streptomycetes and Bacteriophage in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (9): 3868-3877.

Byung, K.H., Song, W.L., Beom, S.K. 2001. Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8) :3739-3745.

Corbaz, R., Gregory, P.H., Lacey, M.E. 1963. Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *Journal of General Microbiology* 32: 449-456.

Corke, C.T., Chase, F.E. 1964. Comparative studies of actinomycete populations in acid podzolic and neutral mull forest soils. *Proc. Soil Sci. Soc. Am* 28: 68-70

Cravery, R., Pagani, H. 1962. Thermophilic micro-organisms among actinomycetes in the soil. *Annali di Microbiologia* 12: 115-130.

Crawford, D. L., and Sutherland, J. B. 1979. The role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:143-151

Dietz, A., Mathews, J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Applied Microbiology*. 21: 527-537.

Eguchi, T., N. Takada. 1993 *Streptomyces bugoensis* sp. Nov. *Int. Syst. Bacteriol.* 4:794-798.

Flaig, W., Beutelspacher, H., Kuster, E., Segler-Holzweissig, G. 1952. Beitrag zur Physiologie und Morphologie der Streptomyceten. *Plant and Soil* 4:118-127.

Flaig, W., Kutzner, H. J., 1960a. Beitrag zur Systematic der Gattung *Streptomyces* Waskman et Henrici. *Archiv für Mikrobiologie* 35:105-138.

Flaig, W., Kutzner, H. J., 1960b. Beitrag zur Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waskman et Henrici. *Archiv für Mikrobiologie* 35:207-228.

Flores, R. D., et al. 1981. Estudio edafológico de los municipios de Cuautitlan, Estado de México. *Inst. Geol. UNAM.* 5 (1): 80-93

Glauert, A.M., Hoppwood, D.A. 1960. The fine structure of *Streptomyces coelicolor*. I. The cytoplasmic membrane system. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 7:479-488.

- Gonzalez, I., Niebla, A., Lemus, M., Gonzalez, L., Iznaga, I.O., Perez, M.E., Vallin, C., 1999. Ecological approach of macrolide-lincosamids-streptogramin producing actinomycetes from Cuban Soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29 (3): 147-150.
- Goodfellow, M., Cross, T. 1984. Classification. In Goodfellow, Mordarski and Williams (editors). *The biology of the Actinomycetes* Academic Press, London. pp 7-164.
- Goodfellow, T. & Williams, R. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. of Microbiol.* 37:189-216.
- Hagerdon, 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Microbiol.* 3:368-375.
- Hao, J. and Kendrick, E.K., 1998. Visualization of Penicillin-Binding proteins during Sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, **180** (8) :2125-2132.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K., Nonomura, H., 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.* 66:367-373.
- Huang, Y., Li, W., Wang, L., Lannot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C., Liu, Z., Swings, J., Goodfellow, M., 2004. *Streptomyces glauciniger* sp. Nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (6): 2085-2089.
- Hwan, B.K., Won, L.S., Seok, K.B., Jung, Y.L., Surk, S.M. 2001. Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8):3739-3745.
- Hirsch, C.F. and Christensen, D.L., 1983. Novel method for selective isolation actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 46. 4.925-929.
- Hoster, F., Schmitz, J.E., Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganism: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (4): 434-442
- Hsu, S.C., and J. L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*. 29:422-426.
- Huddleston, A. S., Cresswell, N., Neves, M.C. 1997. Molecular detection of streptomycin-producing streptomycetes in Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4): 1288-1297
- Hütter, R. 1962. Zur Systematik der Actinomyceten. 8. Quirbildende Streptomyceten. *Archiv für Microbiologie*. 43:365-391.
- Hutter, R. 1967. *Systematik der Streptomyceten*. Basel. New York : Karger.

Jiang.C. & L. Xu. 1996. Diversidad of acuatic actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau Yunnan China. Appl. Environ. Microbiol. 62 (1): 249-253.

Khan, M.R., Williams, S. T. 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil VIII. Soil Biol. Biochem. 7:345-348.

Küster, E., Williams,S.T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. Nature 202:928-929.

Küster, E. 1972. simple working key for classification and identification of named taxa included in the International Streptomyces Project. International Journal of Systematic Bacteriology 22:139-148.

Kutzner, H.J., Schlag, H., Christ, B., Habermehl, G. 1976. Streptomyces coelicolor Müller: production of blue pigment, amylocyanin, and heptaene antibiotics,p.235. 5th. International Fermentation Symposium Berlin. Berlin: Verlag Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie.

Kutzner, H. J.1981. The family *Streptomycetaceae*. In Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (editors). The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Springer- Verlag, Berlin, pp. 2029-2090.

Lacey, J. and M. Goodfellow. 1981. Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin. Journal of Applied Bacteriology 51:289-297.

Lechevalier, H.A., Lechevalier,M. P. , Gerber, N.N. 1971. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes. Advances in Applied Microbiology 14:47-72.

Lee,J.Y. & Hwang, B.K., 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various soils of Korea. Can. J. Microbiol.48 (5):407-417

Lee,J.Y., Jung, H.W., Hwang, B.K., 2005. Streptomyces koyagensis sp. Nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butanoic.acid. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55 (1) 257-262

Li,W.J., Zhang,L.P., Xu, P., Cui, X.L. 2002. Streptomyces beijiagensis sp.nov., a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (5)1695-1699

Lyons, A.J., Pridhman, T.G. 1971. *Streptomyces torulosus* sp.n. an unusual knobby-spored taxon. Applied Microbiology 22:190-193.

Martin,Alexander. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición AGT editor S.A. México. pp 46-42

Martin, J. F., and A. L. Demain. 1980. Control of antibiotic synthesis. Microbiology Review 44:230-251.

- Mayfield, C. I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **4**:79-91
- Mitchell, R., Alexander, M. 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Proceedings of Soil Science Society of America* **26**:556-558
- Moore, R. T., Chapman, G.B. 1959. Observations of the fine structure and modes of growth of a streptomycete. *Journal of Bacteriology* **78**:878-885.
- Nonomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the streptomycetes included in ISP. *Journal of Fermentation Technology* **52**:78-92.
- Okami, Y., and K. Hotta 1988. Search and discovery of new antibiotics, p.33-67. In M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordaski (ed). *Actinomycetes in biotechnology*. Acad. Press, London. U.K.
- Papendick, R. I. and Campbell, G. S. 1985 Theory and measurement of water potential. In *Water Potential Relations in soil Microbiology* (J.F. Parr, W.R. Gardner and L. F. Elliot, Eds). pp 1-22. Soil Science Society America, Madison.
- Porter, J. N., Wilhelm, J. J., Tresner, H. D. 1960. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Applied Microbiology* **8**:174-178
- Porter, J. N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic-producing actinomycetes. *Advan. Appl. Microbiol.* **14**:73-92
- Pridhman, T. G., Hesseltine, C. W., Benedict, R. G. 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to select groups. Placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* **6**:52-79.
- Ravel, J., Wellington, E. M. H., Russel, T.H., 2000 Interspecific transfer of *Streptomyces* Giant Linear plasmids in sterile Amended Soil Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2):529-534
- Ristaino, J.B. 1993. Infection of sweet potato fibrous roots by *Streptomyces ipomoeae*: influence of soil water potential. *Soil Biol. Biochem.* **25**:185-192.
- Ruddick, S. M., Williams, S.T. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil V. Some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **3**:93-103.
- Sahin, N. 2004. Isolation and Characterization of mesophilic, oxalate-degrading *Streptomyces* from plant rhizosphere and forest soils. *Naturwissenschaften.* **91** (10):498-502

Satoshi, O., Ikeda, H., Ishikaga, J. 2001. Genome sequence of and industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Sci. Usa. 98 (21): 12215-12220

Shinobu, R. 1958. Physiological and culture study for identification of soil actinomycetes species. Memoirs of the Osaka University of Liberal Arts and Education. B. Natural Science 7:1-76

Shirling, E. B., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology 16:313-340

Sneh, B., Henis, Y. 1972. Production of antifungal substances active against *Rhizoctonia solani* in chitin-amended soil. Phytopathology 62:595-600

Stuart, D.C., Jr. 1959. Fine structure of the nucleoid and international membrane systems of *Streptomyces*. Journal of Bacteriology 78:272:281

Szabo, I. M., Marton, M., Butri, I., Fernandez, C. 1975. A diagnostic key for the identification of species of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* included in the International *Streptomyces* Project. Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae 21:387-418.

Susuki, K., Nagai, K., Shimizu, Y., Susuki, Y. 1994. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. Actinomycetology. 8:122-127

Tanaka, Y.T., and S. Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. Annu. Rev. Microbiol. 47:57-87

Tresner, H. D., Davies, M.C., Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology on its role in species differentiation. Journal of Bacteriology 81:70-80.

Vinning C. & Stuttard, M., 1995. Determinations and screening of populations of *Streptomyces* in different soils. Amer. Sci. Soil. 67 :345-349.

Walkley, 1947. A critical examination for rapid method for determining organic carbon in soil. Effect of variations in digestion conditions and inorganic soil constituents. Soil Sci. 63 :251-254

Wellington. E.H.M. & Williams, S.T. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. Microbios Letters 6:151-157

Williams, S.T., Davies, F. L. 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in the soil. Journal of General Microbiology 38:251-261.

Williams, S.T., Davies, F.L., Hall, D. M. 1969. A practical approach to the taxonomy of actinomycetes isolated from soil. In: Sheals, J.g. (ed). The soil ecosystem. London: The Systematics Association **8**:107-117.

Williams, S.T., Davies, F.L., Mayfield, C.I., Khan, M. R .1971. Studies on the ecology of actinomycetes in soil II. The pH requirements of streptomycetes from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry* **3**:187-195.

Williams, S.T., Mayfield, C.I. 1971. Studies on the ecology of actinomycetes in soil III. The behaviour of neutrophilic streptomycetes in acid soil. *Soil Biology and Biochemistry* **3**:197-208.

Williams, S. T., Bradshaw, R. M., Colsterton, J.W., Forge, A. 1972a. Fine structure of the sheath of some *Streptomyces* species. *Journal of General Microbiology* **72**: 24-258.

Williams, S.T., Shameemullah, M., Watson, E.T., Mayfield, C.I. 1972b. Studies on the ecology of actinomycetes in soil VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry* **4**:215-225.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M., Sneat, P.H., and M. J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology* **129**: 1743-1813.

Wong, P.T.W. and Griffin, D.M. 1974. Effect of osmotic potential on *Streptomyces* growth, antibiotic production, and antagonism to fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **6**:319-325.

Xu, L., Li, Q., Jiang, C., 1996. Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan China. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (1):244-248.