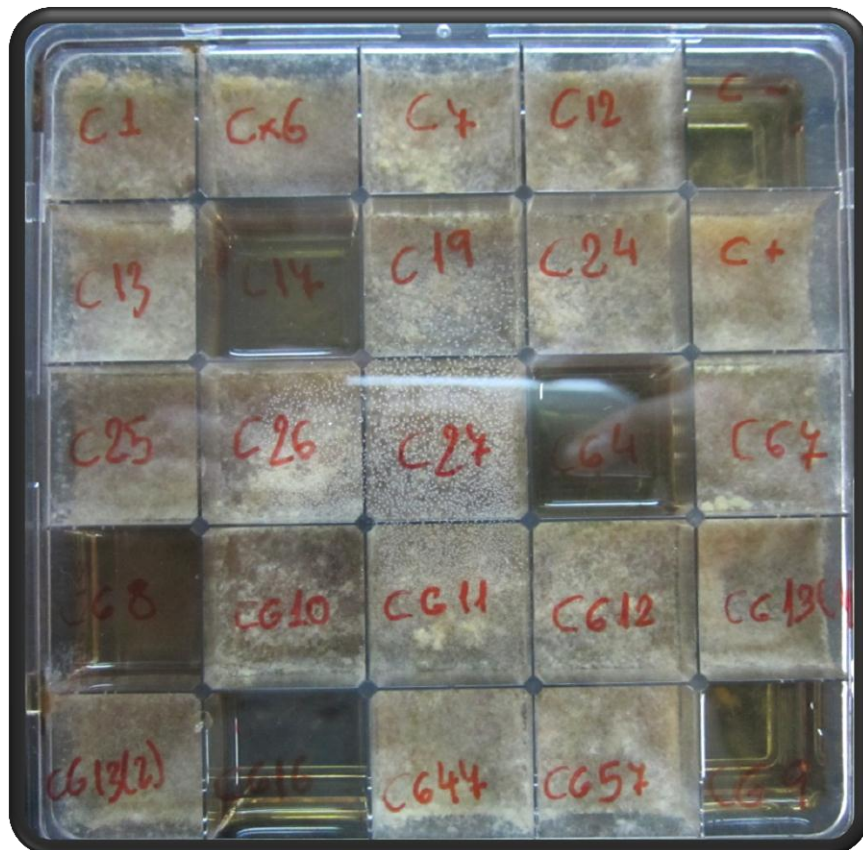




# Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost

Guillermo Pelaz Guerra



Trabajo de Fin de Grado dirigido por Martha E. Trujillo Toledo.

Salamanca, 2014

# ÍNDICE

---

RESUMEN / <i>ABSTRACT</i> .....	3
<b>1. OBJETIVO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Compost.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Compostaje .....	5
2.1.2. Actividad microbiana en el proceso de compostaje .....	5
<b>2.2. Actinobacterias .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Morfología .....	7
2.2.2. Hábitat.....	8
2.2.3. Importancia de las Actinobacterias.....	9
<b>2.3. <i>Amycolatopsis</i> .....</b>	<b>10</b>
2.3.1. Aplicaciones de <i>Amycolatopsis</i> .....	10
2.3.2. <i>Amycolatopsis jiangsuensis</i> .....	12
<b>2.4. <i>Saccharomonospora</i> .....</b>	<b>12</b>
2.4.1. Aplicaciones de <i>Saccharomonospora</i> .....	13
2.4.2. <i>Saccharomonospora halophila</i> .....	13
<b>3. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Aislamiento de Actinobacterias .....</b>	<b>14</b>
3.1.1. Selección y preparación de los medios de cultivo .....	14
3.1.2. Siembra .....	17
3.1.3. Revisión de placas y aislamiento de colonias .....	18
3.1.4. Aislamientos en placas compartidas .....	19
<b>3.2. Purificación de cepas .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Conservación en glicerol .....	21
<b>3.3. Obtención de metabolitos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4. Actividad anti-fúngica .....</b>	<b>23</b>
3.4.1. Test de bioactividad .....	25
<b>3.5. Obtención del ADN genómico .....</b>	<b>27</b>
3.5.1. Recolección de células.....	28
3.5.2. Extracción y purificación del ADN (mediante el kit SIGMA).....	29
<b>3.6. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....</b>	<b>30</b>
<b>3.7. Electroforesis.....</b>	<b>34</b>
3.7.1. Revisión de la electroforesis y extracción del gen 16S .....	36
<b>3.8. Purificación de bandas .....</b>	<b>37</b>
<b>3.9. Cuantificación .....</b>	<b>39</b>
<b>3.10. Revisión de las secuencias genéticas obtenidas .....</b>	<b>41</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Aislamiento de Actinobacterias .....</b>	<b>42</b>

4.2. Purificación de cepas .....	43
4.3. Obtención de metabolitos.....	44
4.4. Actividad anti-fúngica .....	44
4.5. Obtención del ADN genómico .....	49
4.6. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	50
4.7. Electroforesis.....	50
4.8. Purificación de bandas .....	50
4.9. Cuantificación .....	50
4.10. Revisión de las secuencias genéticas obtenidas .....	51
5. CONCLUSIÓN .....	52
6. BIBLIOGRAFÍA .....	53
7. ANEXO.....	57
7.1. Inventario de aislamientos .....	57
7.2. Inventario fotográfico de las cepas.....	59

# RESUMEN:

---

Se realizaron aislamientos de Actinobacterias de una muestra de compost y otra de extracto de compost mediante el uso de medios selectivos incubados en condiciones mesófilas (28°C) y termófilas (50°C). Las cepas obtenidas se purificaron y se almacenaron en glicerol a fin de garantizar su mantenimiento.

Se extrajeron metabolitos de las cepas aisladas y se sometieron a test de bioactividad frente a hongos patógenos a fin de verificar si las Actinobacterias aisladas eran responsables del efecto anti-fúngico observado en la aplicación del compost del que se obtuvieron.

Resultó que algunos de los metabolitos generaron inhibición fúngica y se procedió a la secuenciación genética e identificación de las cepas que los habían producido. Las cepas demostraron ser nuevas especies cercanas a los géneros *Amycolatopsis* y *Saccharomonospora*.

# ABSTRACT:

---

*Actinobacterias were isolated from compost and compost extract samples by using selective media incubated at mesophilic (28°C) and thermophilic (50°C) conditions. The obtained strains were purified and stored in glycerol to ensure their maintenance.*

*Isolated strain's metabolites were extracted and subjected to bioactivity test against pathogenic fungi in order to verify whether the isolated Actinobacterias were responsible of the antifungal action observed in the application of the compost the strains were isolated from.*

*It turned out that some of the metabolites generated fungal inhibition and we proceeded to genetic sequence and identify the strains that had produced this metabolites. The strains proved to be a new species near the genus *Amycolatopsis* and *Saccharomonospora*.*

# 1. OBJETIVO:

---

El objetivo principal que persigue este trabajo es el de alcanzar un mayor conocimiento acerca de las poblaciones de Actinobacterias presentes en dos muestras de compost.

El Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales nos ha cedido dos muestras, una de compost y otra de extracto de compost, con la peculiaridad de que han demostrado en diversos estudios potenciar el crecimiento de diversas especies vegetales y mostrar una menor presencia de hongos fitopatógenos generalmente asociados a estos cultivos.

Así pues, se aislarán las poblaciones de Actinobacterias de las muestras de dicho compost y se verificará, mediante test de bioactividad, si son responsables de la inhibición de los hongos mediante la producción de metabolitos, y en caso de ser así, se procederá a la identificación de aquellas cepas generadoras de dichos metabolitos.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

El trabajo que aquí se presenta versa sobre poblaciones de Actinobacterias en el compost así que comenzaremos hablando de lo que son el compost y las propias Actinobacterias para tener una toma de contacto con los conceptos más importantes en los que se basa este estudio. Así mismo, haremos una pequeña introducción sobre los géneros bacterianos *Amycolatopsis* y *Saccharomonospora* que se tendrán en cuenta en el capítulo de resultados.

### 2.1. Compost

El compost es un producto obtenido a partir de restos animales y vegetales que sirve como abono orgánico para la tierra, presentando una enorme ventaja en lo relativo a la disminución de basura.

#### 2.1.1. Compostaje

El compostaje es el método mediante el que se produce el compost que es utilizado para mantener y aumentar el contenido en materia orgánica de un suelo (Prescott, 2004). En este proceso se deja que se descompongan los materiales vegetales en condiciones aeróbicas y de humedad. La fabricación de compost a partir de materia orgánica parece ofrecer una alternativa atractiva a los vertederos para la descomposición de residuos sólidos domésticos y agrícolas (Díaz *et al.*, 1993; Palmisano & Barlaz, 1996). Comparado con otros métodos de eliminación alternativos, la fabricación de compost tiene ventajas ambientales considerables. Atlas y Bartha (2008) estiman que el compostaje se practicará en el futuro a escala cada vez mayor.

#### 2.1.2. Actividad microbiana en el proceso de compostaje

La fabricación de compost es un proceso microbiano que convierte los residuos orgánicos putrescibles en un producto estable e higiénico, parecido al humus, que se reduce en volumen y puede utilizarse para la mejora del suelo. La fabricación de compost se realiza en pilas estáticas (caballones), pilas aireadas o pilas de alimentación continua. En condiciones favorables, el autocalentamiento en pilas estáticas normalmente eleva la temperatura dentro de una pila de compost a 55-60°C o más en 2 o 3 días. Estas altas temperaturas favorecen que microorganismos termófilos participen activamente en estos procesos (Mandigan, 2009).

Después de la fase termofílica, hay varios meses de “cura” a temperaturas mesofílicas. Durante este período, las poblaciones termófilas bajan y son remplazadas por las mesófilas que sobrevivieron al proceso termofílico.

Cuando finaliza el compostaje, la lignina residual y otros materiales vegetales más resistentes, se habrán convertido parcialmente en humus. Este compost biológicamente

estabilizado se añade al suelo para aumentar su contenido en materia orgánica y estimular a los microorganismos del suelo.

Durante el proceso, la aplicación de aireación consigue acelerar considerable la formación de compost (Epstein *et al.*, 1976; Palmisano & Barlaz 1996).

Con el fin de evaluar el proceso de compostaje y la calidad del producto final, se necesita un mejor conocimiento de las dinámicas de la comunidad microbiana. Se ha demostrado la eficiencia del compost aplicado a campos agrícolas como fertilizante a largo plazo (Odlare, 2005), en la mejora del suelo (Jakobsen, 1995), como sustituto de la turba en la horticultura (Ekland *et al.*, 1998) y como agente supresor contra patógenos de las plantas (Hoitink & Boehm, 1999). La estabilidad del compost está fuertemente relacionada con las actividades microbianas durante el proceso de compostaje; por lo tanto, varios autores han sugerido que los parámetros microbiológicos pueden servir como indicadores de la maduración de compost (Eiland *et al.*, 2001; Benito *et al.*, 2003; Tiquia, 2005). El conocimiento de los microorganismos presentes en el compost, la convivencia entre las diferentes poblaciones y la forma en las que unas se remplazan por otras durante las diferentes etapas del proceso de degradación biológica deben contribuir a garantizar una alta calidad del compost final (Steger *et al.*, 2007).

En lo referente a las Actinobacterias del compost se ha subrayado en varios estudios (Finstein & Morris, 1975; Hermann & Shann, 1997; Ryckeboer *et al.*, 2003) que juegan un papel importante en las etapas posteriores del proceso de compostaje y en particular para la degradación de compuestos relativamente complejos recalcitrantes (Goodfellow & Williams, 1983). Según algunos autores la proporción de Actinobacterias respecto de otros grupos presentes en el compost es aproximadamente del 10% (Steger *et al.*, 2007). Sin embargo, otros estudios (Wang *et al.*, 2014) determinan que la proporción de actinomicetos representan entre el 18-86% de las bacterias según la fase y que la fracción de Actinobacterias alcanza su punto máximo durante la maduración del compost. Lo que si podemos establecer que la Actinobacterias son críticas para el ecosistema de compost.

Los estudios de Wang *et al.* (2014) también determinan que las comunidades de actinomycetales muestran variaciones temporales durante el compostaje. En concreto, las especies de *Corynebacterium* dominan durante la fase inicial, mientras que los géneros *Saccharomonospora* y *Thermobifida* son más abundantes durante la fase termófila. En las etapas finales del compost los miembros mesófilos de *Micrococcineae* son los más abundantes. Son estos *Micrococcineae* junto con los termófilos dominantes los que facilitan conjuntamente la degradación de los materiales lignocelulósicos durante el compostaje. La capacidad de las Actinobacterias para degradar lignocelulosas implica que este grupo de bacterias tenga gran potencial para ofrecer indicadores útiles acerca de la madurez del compost.

## 2.2. Actinobacterias

Las Actinobacterias son un grupo de bacterias Gram positivas, con alto contenido en guanina y citosina características por la formación de hifas filamentosas que normalmente no se fragmentan y producen esporas asexuales. Taxonómicamente conforman el Orden *Actinomycetales* de la Clase *Actinobacteria*. En su morfología general se parecen mucho a los hongos. Probablemente, parte de esta similitud es la consecuencia de la adaptación a los mismos hábitats (Prescott, 2004).

Son conocidos desde hace más de cien años y fueron considerados durante gran parte de este tiempo como un grupo de organismos “exóticos” con rasgos morfológicos parecidos tanto a bacterias como a hongos. De esta forma, las Actinobacterias fueron clasificadas en un principio como hongos, puesto que con ellos compartían la existencia de hifas aéreas. Actualmente y sobre la base de la composición química de la membrana celular, en particular su composición en lípidos y peptidoglicanos, estos microorganismos forman parte del Dominio *Bacteria* (Prescott, 2004).

### 2.2.1. Morfología.

Su morfología los distingue de los demás organismos procariotas. A lo largo de su ciclo de vida presentan una morfología muy variada que puede comprender desde formas unicelulares cilíndricas y cocoidales hasta una compleja organización micelial. En algunos casos presentan estructuras de diferenciación especiales como esporangios, que han jugado un papel fundamental en la identificación y clasificación de estas bacterias (Fernández, 2005).

Su desarrollo se traduce en un proceso multicelular que conduce a la diferenciación en estructuras organizadas. Sin embargo, la colonia madura no es el producto final del desarrollo sino una parte de su ciclo de crecimiento, formación y germinación de esporas y expansión (Fernández, 2005).

El crecimiento comienza con la germinación de una spora sobre un sustrato sólido que genera hifas que se ramifican a intervalos más o menos regulares y que se extiende radialmente. El micelio resultante, o micelio vegetativo, consiste en hifas que o bien penetran en el sustrato o bien crecen sobre su superficie. Cuando crecen en un sustrato sólido como el agar, la red ramificada de hifas que desarrollan crece tanto sobre la superficie del sustrato como en su interior, formando un “micelio de sustrato”. Los tabiques dividen habitualmente las hifas en células largas (20µm o más) que contienen varios nucleoides. A veces, se forma una masa análoga a un tejido, que recibe el nombre de talo. Muchas Actinobacterias tienen un micelio aéreo que se extiende por encima del sustrato y forma esporas asexuales, de pared fina, llamadas conidios o conidiosporas, en las puntas de los filamentos. Si están situadas en un esporangio, reciben el nombre de esporangiosporas. La formación de esporas se desarrolla en respuesta a la privación de nutrientes. La mayoría no son especialmente termorresistentes, pero soportan bien la desecación y por lo tanto tienen un considerable valor adaptativo (Prescott, 2004).



Este tipo de crecimiento representa una de las características principales de las Actinobacterias y ha sido relacionado con su habilidad para degradar la materia orgánica insoluble presente en el medio ambiente mediante enzimas extracelulares (Fernández, 2005).

Posteriormente, se desarrollan ramificaciones aéreas del micelio vegetativo que dan lugar al micelio aéreo. Estas hifas aéreas sufren un proceso de diferenciación que incluye por un lado diferentes cambios morfológicos según la especie y por otro la formación de las esporas. El ciclo de desarrollo se completa con la germinación de las esporas y la expansión de la colonia (Fernández, 2005).

La formación de esporas en el micelio vegetativo se ha descrito frecuentemente en varios géneros como por ejemplo, *Saccharopolyspora*, *Micromonospora*, *Thermoactinomyces* y ocasionalmente el género *Streptomyces* (Cross & Goodfellow, 1973). Sin embargo, aunque en ciertos géneros esté sólo asociada al micelio vegetativo, la formación de esporas es una característica normal del micelio aéreo (Fernández, 2005).

La mayoría de las Actinobacterias son inmóviles, cuando existe movilidad, se limita a las esporas flageladas (Prescott, 2004).

La composición de la pared celular de los actinomicetos varía mucho según los grupos y tiene una importancia taxonómica considerable (Prescott, 2004).

### 2.2.2. Hábitat

Las Actinobacterias son microorganismos generalmente saprófitos y como tales, comparten su entrono con otras bacterias y hongos filamentosos, formando una comunidad ecológica interconectada. Descritos en una amplia variedad de entornos, tanto naturales como modificados por el hombre, pueden desarrollarse sobre un amplio rango de sustratos como tierra, material vegetal vivo o en descomposición, agua salada, agua dulce, estiércol o compost (Prescott, 2004).

Algunas especies pueden formar asociaciones ecológicas beneficiosas con plantas o animales o bien se han descrito como agentes causales de ciertas enfermedades en humanos y animales (Williams *et al.*, 1983).

De esta forma, se ha demostrado que algunas especies de actinomicetos que están presentes en la rizosfera de diversas plantas, son efectivos antagonistas de hongos patógenos (Crawford *et al.*, 1993; El-Tarabily, 1997; El-Tarabily & Soliman, 2000). En una interrelación más estrecha, colonizan los tejidos internos de la planta como patógenos, como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, y *S. turgidiscabies*; o bien con un balance favorable para ambos como sucede en la simbiosis *Frankia*-plantas actinorrícicas (Fernández, 2005).

### 2.2.3. Importancia de las Actinobacterias.

Las Actinobacterias tienen una importancia práctica considerable. Son fundamentalmente habitantes de la tierra y están muy ampliamente distribuidos, pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos y son muy importantes en la mineralización de la materia orgánica. Las Actinobacterias producen la mayor parte de los antibióticos naturales de importancia en medicina. Aunque la mayoría de las Actinobacterias son organismos de vida libre, algunos son patógenos para los seres humanos, ciertos animales y algunas plantas (Prescott, 2004).

Una de las características que distinguen a las Actinobacterias del resto de las bacterias es la capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores, inhibidores enzimáticos, etc.

La búsqueda de compuestos a partir de microorganismos, continúa siendo hoy día la principal fuente de nuevos antimicrobianos, y son las Actinobacterias aisladas del suelo, las principales bacterias productoras de los metabolitos conocidas hasta hoy. De cultivos de éstas se han aislado importantes agentes terapéuticos como aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas.

Los aminoglucósidos fueron introducidos en la clínica en 1943, cuando Waksman aisló de una cepa de *Streptomyces griseus* la esteptomina, primer antimicrobiano activo frente a *Mycobacterium tuberculosis*. A partir de otras especies de *Streptomyces* se obtuvieron neomicina (1949) y kanamicina (1957). Investigaciones posteriores encaminadas a mejorar la actividad antibacteriana y disminuir la toxicidad obtuvieron, tobramicina (1967), y los semisintéticos amikacina (1972), dibekacina (1971) y netilmicina (1975). A partir de distintas especies del género *Micromonospora* se obtuvieron gentamicina (de *M. purpurea* en 1958) y sisomicina (de *M. inyoensis* en 1978) (Fernández, 2005).

En la década de 1960 se descubrió un nuevo tipo de toxinas producidas por Actinobacterias. Este tipo de sustancias conocidas en la actualidad como antibióticos enodiónicos, han entrado recientemente a formar parte del grupo de los agentes antitumorales de muy elevada potencia. Entre las sustancias pertenecientes a este grupo se encuentran ejemplos como la calichaemicina, aislada en 1987 por Lee *et al.*, de la bacteria *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* (Lee *et al.*, 1987; Maiese *et al.*, 1989).

Las bacterias del suelo siguen siendo estudiadas, pero hay una notable merma en el hallazgo de nuevos productos, estimándose que más del 90% de los cultivos bioactivos descubiertos producen agentes ya informados o son variaciones menores de uno ya descrito (Leiva *et al.*, 2004). Por ello, se han reorientado estudios hacia otros ambientes, como sedimentos de ríos, lagos y océanos, así como plantas y animales, que ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Jensen & Fenical, 1994; Jiang & Xu, 1996).

### 2.3. Amycolatopsis

El género *Amycolatopsis* fue propuesto en 1986 por Lechevalier (Lechevalier, 1986). La química celular de estas bacterias se caracteriza por presentar una pared celular de tipo IV (ácido meso-diaminopimélico, arabinosa, galactosa y en la pared celular); ácido murámico en forma de N-acetilo; una ausencia de ácidos micólicos; fosfatidiletanolamina como fosfolípido de diagnóstico; MK-9 (H4) como principal menaquinona y una cantidad menor de MK-9(H2); y una mezcla compleja de ácidos grasos saturados y de cadena ramificada (Lechevalier, 1986). Las técnicas de secuenciación han permitido la identificación precisa de los miembros del género *Amycolatopsis*, y para el momento de la realización de la tesis de la cual se obtienen estos datos (Febrero de 2014) cuenta con 63 especies descritas y 4 subespecies (Dávila Costa & Amoroso, 2014).

Los miembros del género *Amycolatopsis* son capaces de hacer uso de varias fuentes de carbono, por ejemplo: (+)-L-arabinosa, (+)-D-celobiosa, (+)-D-fructosa, (+)-D-galactosa, (+)-D-lactosa, (+)-D-manosa, (+)-D-trehalosa y (+)-D-xilosa. Estos datos determinan existe una gran diversidad de medios de cultivo que pueden utilizar para el aislamiento de bacterias que pertenecen al género *Amycolatopsis* (Dávila Costa & Amoroso, 2014).

En cuanto a la morfología, *Amycolatopsis* produce sustrato ramificado y micelios aéreos que muestran de forma ocasional fragmentación. Las hifas fragmentadas normalmente constan de elementos en forma de varillas cuadrangulares. Los micelios de *Amycolatopsis* también poseen largas cadenas de estructuras lisas similares a esporas. Algunas especies también muestran un cierto grado de variabilidad en su morfología; *Amycolatopsis taiwanensis* forma cadenas cortas de forma ovalada con esporas lisas, *Amycolatopsis declapanina* presenta forma globosa y *Amycolatopsis pseudosporangia* superficie lisa (Tseng *et al.* 2006).

#### 2.3.1. Aplicaciones de *Amycolatopsis*

Recientemente ha habido un creciente interés en las posibles aplicaciones biotecnológicas del género bacteriano *Amycolatopsis*. Este género inicialmente llamó la atención por su capacidad de producir antibióticos aunque se trata de un género de múltiples facetas. Varios trabajos han demostrado que la versatilidad que muestran estas bacterias es valiosa en aplicaciones industriales, tales como la biorremediación, la biodegradación y la bioconversión.

##### ➤ Biorremediación de metales pesados

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más importantes de hoy en día.

A menudo las Actinobacterias han sido excelentes candidatos para la biorremediación ya que pueden adaptarse a temperaturas extremas (como las condiciones del desierto) y a la presencia de compuestos peligrosos. *Amycolatopsis tucumanensis* es la única especie encontrada en todo el género *Amycolatopsis* que presenta resistencia a los metales pesados. Las cepas de esta especie se aislaron en suelos con altas concentraciones de cobre. El cobre es cofactor para muchas enzimas pero también puede ser altamente tóxico. *A. tucumanensis* presentó una excelente resistencia a este metal debido en parte a la alta concentración de exopolímero que producía dicha bacteria. Dicho exopolímero permitía a la célula inmovilizar el cobre. Otra serie de estudios han confirmado que estas células son también capaces de acumular cobre de forma intracelular (Albarracín et al., 2008). Así pues, se ha propuesto a *A. tucumanensis* para biorremediar suelos contaminados por cobre.

➤ Biodegradación de herbicidas

Existen diversos compuestos orgánicos tóxicos que se liberan al medio ambiente, ya sea por aplicación directa o indirecta. Estos compuestos incluyen pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y combustibles entre otros y son bastante resistentes a la biodegradación por la flora nativa. Muchas bacterias de la clase *Actinobacteria* son capaces de biodegradar compuestos orgánicos tóxicos. Sin embargo, para la mayoría de estos compuestos la identificación de los metabolitos intermedios y rutas de biodegradación aún siguen sin estar claros (Álvarez *et al*, 2012). En el género *Amycolatopsis*, la cepa M3-1 ha destacado por su capacidad para degradar al herbicida ZJ0273. En un estudio de biodegradación realizado en un sistema acuático la *Amycolatopsis* M3-1 degradó el 60% del herbicida presente después de 25 días de incubación. Se encontró que durante el proceso de biodegradación se formaron seis metabolitos intermedios, de los cuales el conocido como M3-1 demostró ser inhibidor del crecimiento celular y de la degradación de ZJ0273. Sin duda, se hace necesario el desarrollo de enfoques que puedan disminuir la formación de estos compuestos mediante la utilización de cultivos mixtos en los que uno de los microorganismos sea resistente y pueda metabolizar el compuesto intermedio tóxicos (Cai *et al*, 2012). Para hacer frente a esto, las estrategias de biorremediación podrían ser diseñadas en base a la utilización de cultivos mixtos de *Amycolatopsis* sp M3-1 y *A. tucumanensis*. El uso de cepas que pertenecen al mismo género podría aportar ventajas en términos de preferencia por la fuente de carbono, las condiciones de crecimiento y la no limitación de crecimiento entre las dos especies. El uso de cepas relacionadas también puede reducir los costos operativos, lo cual puede ser muy importante en el diseño de estrategias de biorremediación (Dávila Costa & Amoroso, 2014).

➤ Bioconversión:

Los microorganismos son capaces de catalizar reacciones químicas específicas. El uso de microorganismos para este propósito se conoce como bioconversión e implica el cultivo del microorganismo, normalmente en un biorreactor, seguido por la adición del compuesto que se convertirá en el momento apropiado.

La vainilla es un compuesto que se utiliza en perfumería y en la industria alimentaria. La vainilla natural se extrae de las vainas de las semillas de las orquídeas *Vanilla planifolia*, siendo un proceso altamente costoso en mano de obra. Fleige *et al* (2013) han demostrado que *Amycolatopsis* sp ATCC 39116 es capaz de producir vainilla a partir de ácido cerúlico. En el mismo estudio, los autores también detectaron que *Amycolatopsis* sp ATCC 39116 posee una vainilla-deshidrogenasa (VHD) responsable de la oxidación del ácido vínico no deseado de la vainilla. Por consiguiente, se propone que el uso de *Amycolatopsis* sp ATCC 39116 mutante para un proceso de fermentación apropiada puede ser una forma de éxito para la producción de vainilla natural (Fleige *et al.*, 2013).

### 2.3.2. *Amycolatopsis jiangsuensis*

Fue aislada de la superficie de la planta costera *Dendranthema indicum* (Linn.) en la provincia de Jiangsu (China). Se trata de un actinomiceto aeróbico, gran positivo que forma micelios vegetativos ampliamente ramificados. Su micelio aéreo es blanco y el micelio vegetativo va de color blanco a blanco amarillento. Su intervalo de pH para el crecimiento se encuentra entre 6.0 y 11.0, con un rango óptimo de 7.0 a 8.0 de pH. Su rango de temperatura de crecimiento es de 15-37°C, siendo su óptimo a 28°C. El rango de tolerancia de NaCl es de hasta 10%. Utiliza muchos azúcares como fuente de carbono pero no D-lactosa e inositol. El ácido de diagnóstico del peptidoglicano es el ácido meso-diaminopimélico (Xing, 2013).

## 2.4. *Saccharomonospora*

El género *Saccharomonospora* fue propuesto por Nonomura y Ohara (Nonomura & Ohara, 1971) para Actinomicetos monospóricos cuyas paredes contienen meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa en el peptidoglicano (pared de quimiotipo IV según Lechevalier, 1986). Posteriormente se encontraron marcadores químicos adicionales que caracterizan al taxón, en particular, la presencia de importantes cantidades de ácidos grasos iso- y antesio-, ácidos grasos 2-hidroxi-fosfatidiletanolamina y menaquinonas que eran tetrahidrogenadas con nueve unidades de isopreno. Originalmente las especies que forman este género fueron recogidas dentro de *Thermomonospora*.

Las cepas de las especies termófilas de *Saccharomonospora* son normalmente aisladas de hábitats termófilos naturales tales como hojarasca, estiércol y compost, mientras que las especies mesófilas son frecuentemente encontradas en muestras de suelo (Al-Zarban,

2002). Las cepas de *Saccharomonospora* son propensas a tener un cierto papel en la degradación primaria del material vegetal atacando a la hemicelulosa (Bergey, 1994).

Algunas de las primeras cepas que se aislaron de este género son *Saccharomonospora azurea*, *Saccharomonospora cyanea*, *Saccharomonospora glauca*, *Saccharomonospora halophila* y *Saccharomonospora viridis*, la especie tipo del género (Kim, 1995).

#### 2.4.1. Aplicaciones de *Saccharomonospora*

Existen tres antibióticos que son producidos por cepas del género *Saccharomonospora*. *Thermoviridin* fue producido por la cepa que describe al género, *Saccharomonospora viridis*. Los dos restantes son producidos por cepas ahora incluidas dentro del género *Saccharomonospora* y son un agente antitumoral sin nombre producido por *Micropolyspora coerulea* y el antibiótico antibacteriano *primicina* producido por *Thermomonospora galeriensis* (Bergey, 1994)

#### 2.4.2. *Saccharomonospora halophila*

*Saccharomonospora halophila* fue aislada a partir de una muestra de suelo de un pantano en Kuwait. Se trata de una especie de Actinomicete no móvil, aerobia, de color azul claro, gran positiva, halófila y productor de micelio aéreo gris. Sus esporas, verrugosas, son sésiles y se producen solas o en parejas en el micelio aéreo. El micelio se mantiene estable y no se fragmenta durante el envejecimiento. La especie posee el ácido meso-diaminopimélico como aminoácido de diagnóstico en el peptidoglicano. Sus azúcares de diagnóstico son arabinosa y galactosa. Su crecimiento óptimo se obtiene en agar de almidón-nitrato suplementado con 10% de NaCl a 28°C. Crece en medio con 10-30% de NaCl. Utiliza las siguientes fuentes de carbono: L(+)-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, manitol, manosa, melibiosa y L-ramnosa. No utiliza D-xilosa (Al-Zarban, 2002).

# 3. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

A fin de facilitar la comprensión del trabajo se ha decidido describir conjuntamente los puntos de Metodología, donde se incluyen los materiales y métodos utilizados, y de Desarrollo experimental, donde se describen los procesos realizados durante la experimentación.

## 3.1. Aislamiento de Actinobacterias:

Como punto de partida se nos proporcionaron dos muestras, una de compost y otra de extracto de compost, por parte del profesorado del departamento de Producción Vegetal de la facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales de la Universidad de Salamanca. La elaboración y propiedades de dicho compost se detallan en el artículo “*Evaluation of green/pruning wastes compost and vermicompost, slungum compost and their mixes as growing media for horticultural production* (Morales-Corts *et al.*, 2014)”.

De forma resumida añadiremos que el compost y de extracto de compost fueron producidos a partir de la poda y residuos verdes de los diversos jardines de la provincia de Salamanca y fueron recogidos por la compañía “Arca” ubicada también en Salamanca. La mayoría del material correspondió a las hojas y los tallos de vegetales presentes a la familia *Cupressaceae*. Estos residuos vegetales fueron compostados utilizando pilas aireadas durante 180 días. Este compost mostró excelente resultados como fertilizante debido a su alta concentración de nitrógeno (Morales-Corts *et al.*, 2014).

Una de las características que ha llamado la atención de dicho compost es la de actuar como inhibidor de la actividad de diversas cepas de hongos patógenos. Para poder determinar si son las poblaciones de Actinobacterias presentes las responsables de dicha inhibición debemos proceder a su identificación.

Así pues se nos ofrecen dos vías para la realización de nuestra búsqueda, una la del compost y otra la del extracto de compost.

### 3.1.1. Selección y preparación de los medios de cultivo:

Para poder aislar las Actinobacterias de ambas muestras debemos recurrir a medios de cultivo capaces de seleccionar a los microorganismos del grupo que nos interesa. Esto nos lo permite el uso de medios de cultivo selectivos, medios que favorecen el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos mediante el perjuicio hacia los grupos restantes. En nuestro caso pretendemos evitar la aparición de otros grupos de

microorganismos no deseados por lo que a estos cultivos se añadirán antibióticos contra Gram negativos (las Actinobacterias son microorganismos Gram positivos) y anti-fúngicos.

La elección de los medios a utilizar para el aislamiento de Actinobacterias se extrajo de dos estudios donde se trabajó con este grupo de microorganismos, la tesis de la Universidad de Salamanca de Pablo Alonso de la Vega “*Distribución, caracterización e importancia ecológica de Micromonospora en nódulos fijadores de nitrógeno de Lupinus*” (Alonso, 2010) y la tesis de la Universidad de Newcastle de Mathew Upton “*Ecological approaches to selective isolation of Actinomycetes for bioactivity screening*” (Upton, 1994) :

- Medio húmico suplementado con vitaminas (para 0.5L) (Hayakawa & Nonomura, 1984):
- Extracto de levadura ..... 0.5 g
- Ácido húmico ..... 0.25g
- CaCO<sub>3</sub>..... 0.01g
- FeSO<sub>4</sub>..... 0.005g
- KCl ..... 0.85g
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O..... 0.025g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.25g
- Solución de sales traza..... 0.5mL
- Agua destilada ..... 0.5L
- Agar ..... 9.0g

La receta del medio establece que las vitaminas deben añadirse en la siguiente proporción:

- Triamine hydrochloride: ..... 50.0mg
- Riboflavin ..... 50.0mg
- Nicotinic acid..... 50.0mg
- Pyridoxine hydrochloride ..... 50.0mg
- Inositol ..... 50.0mg
- Calcium pantothenate ..... 50.0mg
- Para-amino benzoic acid..... 50.0mg
- Biotin ..... 25.0mg
- Agua destilada ..... 100mL

En nuestro caso se calcula la cantidad para 0,5L.

- Medio ISP2 para 0,5L (Wickerham, 1951):
- Glucosa ..... 2.0g
- Extracto de levadura ..... 2.0g
- Extracto de malta ..... 5.0g
- CaCO<sub>3</sub>..... 1.0g
- Agar ..... 9.0g



- Agua destilada ..... 0.5L

➤ Medio basado en extracto de compost:

Este último medio se basa en añadir directamente en 500mL de extracto de compost 9,0g de agar. Utilizamos este medio porque contiene los nutrientes concretos que requieren las poblaciones microbianas presentes en el compost puesto que se obtiene a partir de él.

El proceso de fabricación de estos medios fue relativamente sencillo. Para cada medio se pesaron sus componentes en una balanza analítica y se almacenaron en una botella de un litro para medio litro. El agar fue añadido junto con el agua después de la adición del resto de componentes para arrastrar los compuestos de las paredes de la botella. Para facilitar la disolución de los componentes se realizó agitación manual o se utilizó el agitador magnético. Después se procedió a su autoclavado a 121°C durante 15 minutos para asegurar su esterilización y se dejó enfriar el tiempo justo para poder manejarlo sin que llegara a solidificar en la botella.

Los antibióticos (y las vitaminas filtradas en el caso del medio de ácido húmico) se prepararon para la concentración de 0,5L de cada medio y se añadieron cuando el medio estuvo lo suficientemente frío y antes de ser servidos en placas.

Las concentraciones de antibióticos que se utilizaron para los medios fueron (concentraciones similares a las de los estudios de Alonso, 2010 y Upton, 1994):

- 12mg/L de ácido nalidixico
- 24mg/L de Kanamicina
- 50mg/L de Cicloheximida.

Cada medio se preparó para 0,5L así que las cantidades en gramos a añadir de cada antibiótico (partiendo de que la concentración de origen de cada uno era 10mg/mL):

- 60mg de ácido nalidíxico en etanol
- 120mg de kanamicina en agua destilada
- 250mg de cicloheximida en agua destilada.

Una vez añadidos los antibióticos y las vitaminas procedemos a verter cada medio en placas de Petri dentro de la campana de extracción. Como resultado tendremos 3 grupos de placas de medios de cultivo: ácido húmico (HA), ISP2 y extracto de compost (EC). Las placas se rotularon con las siglas HA, ISP2 y EC haciendo referencia al tipo de medio (ver Figura 1)

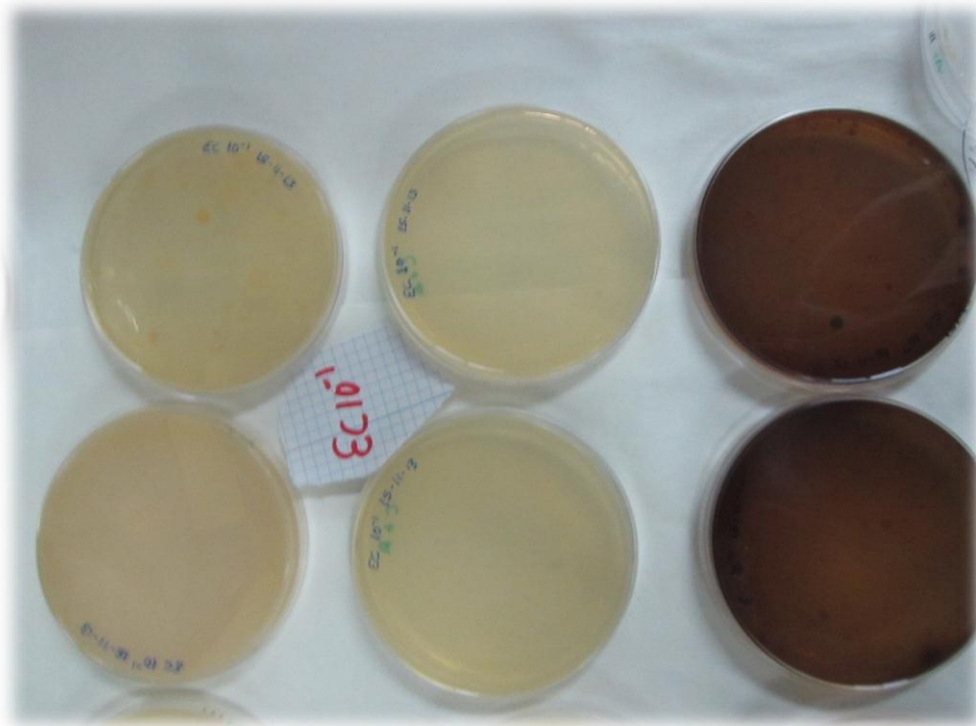


Figura 1. De izquierda a derecha medios ISP2, EC y HA

Tras la solidificación de los medios de cultivo en las placas se procedió a la preparación las muestras para su siembra.

### 3.1.2. Siembra

Ante el desconocimiento de qué concentración eran las óptimas para el aislamiento del grupo de bacterias buscado se realizaron diferentes diluciones seriadas de las muestras.

Se pesaron 10g de la muestra de compost y se suspendieron en un matraz con 90mL de agua destilada. Se sometió la mezcla a agitación mediante el agitador magnético durante una hora aproximadamente a fin de separar los microorganismos de la muestra de compost y homogeneizar el contenido. Paralelo a este proceso se procedió a la esterilización de varios tubos con 9mL de agua destilada

Una vez pasada la hora el compost disuelto se dejó reposar 5 minutos para facilitar su sedimentación. Se tomaron 10mL de esta mezcla y se llevaron a una tubito de manera que obtuvimos la dilución  $10^{-1}$ . Tomando 1mL de esta dilución y llevándolo a otro tubito que ya contenga 9mL de agua destilada estéril se obtuvo la dilución  $10^{-2}$  y tomando 1mL de esta nueva dilución y llevándolo a un nuevo tubito de 9mL de agua estéril se obtuvo a su vez la dilución  $10^{-3}$ . Repetiremos este proceso una vez más para obtener la dilución  $10^{-4}$ . Las diluciones que se sembraremos fueron las de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

La muestra de extracto de compost ya venía disuelta en líquido y lo único que se hizo fue diluirla con agua hasta obtener diluciones seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de manera análoga a las diluciones de la muestra de compost.

Estas diluciones fueron añadidas a los medios de cultivo mediante la técnica de siembra en superficie ayudándonos de un asa de Digralski. Cada dilución de cada muestra fue sembrada en 3 placas, 2 fueron incubadas en una estufa a 28°C y las restantes en una estufa a 50°C. El resultado fueron 54 medios de cultivo en incubación, 36 incubadas a 28°C y 18 a 50°C. Se realizó un seguimiento periódico de las placas incubadas a ambas temperaturas.

En cada medio de cultivo sembramos 3 placas de cada dilución, 2 para el cultivo a 28°C y 1 para el cultivo a 50°C. Así pues, dado que tenemos 3 medios de cultivo, 3 diluciones y queremos 3 réplicas para la incubación a diferentes temperaturas el resultado fue la siembra de 27 placas.

La siembra se realizó mediante la técnica de siembra en superficie que consiste en la toma de 200µL de la dilución elegida sobre el medio de cultivo y el reparto por toda la superficie de la placa mediante un asa de Digralski.

### 3.1.3. Revisión de placas y aislamiento de colonias

Las placas fueron revisadas periódicamente observándose el crecimiento de colonias de microorganismos sobre ellas. Evidentemente en aquellas en las que sembramos las muestras menos diluidas fueron las que acogieron mayor número de colonias. Esto no siempre es ventajoso debido a que un crecimiento exagerado provoca que los límites entre colonias sean difusos o que unas colonias se superpongan a otras de tal manera que se imposibilita el aislamiento. Aquellas muestras demasiado diluidas presentaron un crecimiento escaso o nulo de colonias.

Las colonias se revisaron 6, 10, 19 y 26 días después de la siembra.

A los 19 días después de la siembra se hizo un recuento de colonias por placa sobre las cepas.

Para las muestras incubadas a 28°C de compost se eligió la dilución  $10^{-3}$  pues presentaba un número de cepas significativo (entre 30-300) y para el extracto de compost  $10^{-1}$ .

Para las muestras incubadas a 50°C de compost se eligió la dilución  $10^{-4}$  y para el extracto de compost aunque el recuento se hizo para  $10^{-1}$  aunque hubo una profunda escasez de colonias así que no se tomaron valores. (ver tabla 1).

Incubación a 28°C				Incubación a 50°C			
Muestra	Medio de placa	Dilución	Número de colonias	Muestra	Medio de placa	Dilución	Número de colonias
Compost	AH	10 <sup>-3</sup>	170	Compost	AH	10 <sup>-4</sup>	75
Compost	ISP2	10 <sup>-3</sup>	64	Compost	ISP2	10 <sup>-4</sup>	14
Compost	EC	10 <sup>-3</sup>	69	Compost	EC	10 <sup>-4</sup>	49
Extracto	AH	10 <sup>-1</sup>	170	Extracto	AH	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas
Extracto	ISP2	10 <sup>-1</sup>	38	Extracto	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas
Extracto	EC	10 <sup>-1</sup>	63	Extracto	EC	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas

Tabla 1. Inventario de colonias

No se realizó recuento sobre aquellas placas que tenían demasiadas colonias (la mayoría de las de Compost con poca dilución) (ver Fig. 2 y 3).



Figuras 2 y 3 Izq. medio HA con diversas colonias en crecimiento; der. medio basado en compost con contaminación por hongos.

#### 3.1.4. Aislamientos en placas compartidas:

A medida que fueron apareciendo colonias con apariencia de Actinobacterias procedimos a su aislamiento en placas de medio ISP2 previamente en 4 partes iguales, de tal manera que cada nueva placa acogió 4 aislamientos diferentes. La nomenclatura que utilizaremos para referirnos a cada aislamiento a partir de ahora será CG seguido del número de aislamiento que sea. El inventario de aislamientos totales, así como la fecha y el medio original del aislamiento vendrán recogidos en la tabla del inventario de aislamientos en el Anexo (página 57).

Para realizar los aislamientos se utilizó un microscopio óptico a fin de poder determinar la presencia o no de Actinobacterias y de la necesidad de tomar con precisión a los organismos que nos interesan. El aislamiento de organismos exige trabajar con una condiciones de esterilidad, por ello se utilizaron palillos estériles con los que se fue “picando” sobre cada colonia identificada en el microscopio como Actinobacteria,

procurando llevarnos la mayor parte del material biológico posible, y sembrando mediante la técnica de siembra en estría en las nuevas placas de medio ISP2.

Una vez sembradas, las placas se incuban en estufa a la misma temperatura a la que se incubó la placa de la que procedieron

El resultado son diversas placas con 4 aislamientos separados e identificados con su código que incubaremos para comprobar que lo que hemos aislado son Actinobacterias libres de contaminación.

### **3.2. Purificación de cepas**

Después de incubar durante un tiempo los aislamientos en placa compartida comenzaron a crecer. Una vez crecieron se pudo comprobar cuales habían sido aisladas correctamente, cuales no llegaron a crecer (seguramente debido a que se tomó insuficiente material biológico) y cuales se contaminaron (bien por hongos o por otros microorganismos que no Actinobacterias). Para facilitar la comprobación se dispuso de 11 cepas de Actinobacterias ya aisladas de una muestra anterior de una muestra de compost con los códigos C1, Cx6, C7, C12, C13, C17, C19, C24, C25, C26 y C27.

Se procedió a la purificación (o aislamiento en placa individual) de aquellas cepas de Actinobacterias que habían sido aisladas exitosamente. La **purificación de cepas** consiste en la siembra de cada colonia en placas individuales. De esta manera podemos mantener cada cepa en una placa aislada sin riesgo de que se mezcle con otras colonias.

Las placas que se emplearon para la purificación fueron placas de ISP2 preparadas tal y como se comentó anteriormente pero sin antibióticos.

El proceso se realizó dentro de una campana de extracción a fin de evitar la contaminación de las nuevas colonias. Mediante un asa de siembra estéril se tomó todo el material biológico a purificar, prestando especial atención a no arrastrar consigo material biológico de otros organismos, y se sembró en las nuevas placas de ISP2. El tipo de siembra que se utilizó fue la siembra por agotamiento en estría, que consiste en sembrar primero una sección de la placa y después cada nueva sección sembrarla a partir de uno de los extremos de la sección previamente sembrada, de tal manera que se obtienen secciones con menor concentración de colonias respectivamente pudiendo comprobar fácilmente si nuestra cepa está libre de otras colonias contaminantes debido a que las nuevas colonias crecen progresivamente más separadas las unas de las otras.

Las nuevas placas sembradas de esta manera se cultivaron a la misma temperatura a las que fueron cultivadas las cepas desde donde se aislaron. Periódicamente se revisaron los cultivos puros para asegurarnos de que dentro de cada placa nos encontrábamos únicamente una misma cepa de microorganismos.

### 3.2.1. Conservación en glicerol

El paso del tiempo supone la muerte de las cepas conforme los nutrientes de las placas se van agotando y el propio agar se seca. Debido a esto resulta necesaria la conservación de las cepas a baja temperatura para poder conservar nuestros microorganismos durante mucho más tiempo. Sin embargo, el proceso de congelación puede suponer la rotura de las células que se traduce en la muerte de nuestros microorganismos. Por este motivo debemos introducir nuestras cepas en una solución de glicerol previamente a la congelación.

En nuestro caso utilizaremos una disolución de glicerol al 20%. Para la preparación de esta disolución se utilizaron 20 ml de glicerol al 100% que vertimos en una probeta de 100 ml. Una vez tenemos dentro los 20 ml de glicerol enrasamos hasta 100 ml con agua destilada y mezclamos con una varilla de vidrio hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación vertimos el contenido de la probeta en pequeños tubitos de 2mL de capacidad que deberán ser autoclavados el mismo día de su preparación debido a que el glicerol es muy volátil.

Una vez que disponemos de tubitos estériles de glicerol y de que nuestras cepas puras han crecido lo suficiente podremos pasar al almacenamiento en glicerol.

La extracción de material biológico de los cultivos puros se realizó mediante *transfer tubs*, unos instrumentos que nos permitieron la extracción de pequeñas porciones cilíndricas de agar y microorganismos que es lo que fuimos introduciendo en los tubos de glicerol (ver Fig. 4). Se procuró introducir el mayor número posible de estos “bocados” pero procurando que el glicerol los cubriese a todos completamente. Después se etiquetaron con el código de la cepa y la fecha de almacenamiento y se guardaron en cajitas en el congelador a -20°C.

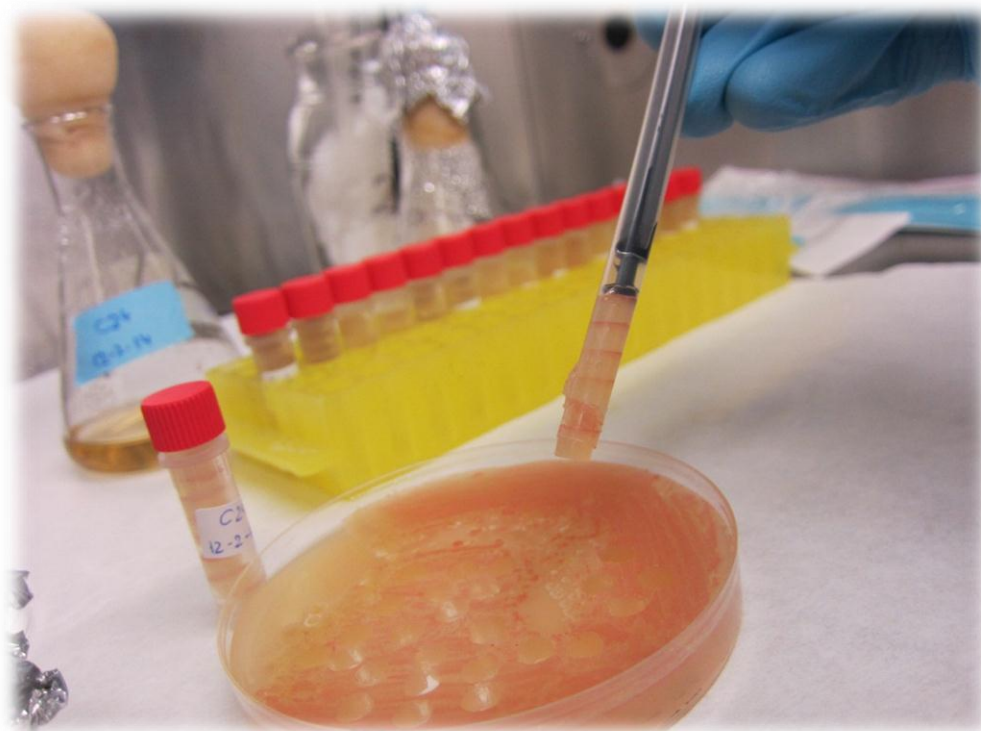


Figura 4. Extracción de material genético con *transfer tubs*

### 3.3. Obtención de metabolitos

Para determinar la capacidad anti-fúngica de nuestras cepas necesitamos obtener los metabolitos producidos por las cepas de Actinobacterias que hayamos logrado aislar para poder probar su capacidad inhibidora frente a hongos. Estos metabolitos podrían ser los responsables de la actividad anti-fúngica que presentó el uso del compost. Los metabolitos de los microorganismos suelen ser más abundantes en las fases de meseta y finales (Prescott, 2004) así que para obtener sobrenadantes con metabolitos presentes recurrimos al cultivo de nuestras cepas en medio líquido ISP2 en agitación durante una semana, tal y como describe en su protocolo Upton (Upton, 1994).

El medio de cultivo que se utilizó fue ISP2 líquido cuya composición ya se describe a continuación.

Medio ISP2 líquido (0,5 L):

- ❖ Glucosa .....2.0g
- ❖ Extracto de levadura .....2.0g
- ❖ Extracto de malta .....5.0g
- ❖ Agua destilada .....0.5L

Los compuestos fueron mezclados con la ayuda del agitador magnético y se midió el pH con un pHímetro. El pH resultó ser 6,23 así que fue considerado correcto conforme a los criterios que establece Wickerham (Wickerham, 1951) para este tipo de medios.

Verteremos aproximadamente 25 ml de este medio en matraces de 250 ml que a continuación llevamos al autoclave para su esterilización a 121°C durante 15 minutos.

Con los matraces de medio ISP2 ya preparados se procedió a la introducción de 4-6 “bocados” tomados de los microorganismos. Estos matraces fueron etiquetados y llevados a un agitador en el que se incubaron a 28°C (solo se extrajeron metabolitos de las cepas de 28°C) en agitación constante durante una semana exacta (7 días). Pasado este tiempo los matraces fueron retirados del agitador. El contenido de cada matraz fue vertido en un tubo de centrífuga, conservando en todo momento el código de la cepa, y se sometieron a centrifugación durante 15 minutos a 100.000 rpm y a 4°C de tal forma que las células quedaron apelmazadas al fondo de los mismos. Mediante una pipeta se extrajo el sobrenadante líquido superior, presumiblemente libre de células, y que contenía los metabolitos producidos por cada cepa. Estos sobrenadantes se recogieron en tubos *Falcom* debidamente etiquetados que se congelaron a -20°C (ver Fig. 5).



Figura 5. Gradilla con tubos *Falcom* con los sobrenadantes de las cepas

### 3.4. Actividad anti-fúngica

Para poder evaluar la actividad anti-fúngica de los metabolitos extraídos se utilizó el mismo protocolo que utilizó Mathew Upton (Upton, 1994).

En primer lugar se seleccionaron las cepas de hongos con los que experimentar. Las especies elegidas fueron *Phytophthora cactorum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* cepas patógenos de diversas plantas, especialmente importante por causar diversas enfermedades en especies de utilidad agrícola. Dichas cepas fueron cedidas por el departamento de Producción vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales y son las mismas cepas sobre las que los miembros de dicho departamento realizaron sus experimentos. Comenzaremos haciendo una breve descripción de ellos:

➤ *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* es un hongo de distribución cosmopolita que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado. Es causante de diversas enfermedades en especies vegetales. Coloniza los conductos xilemáticos de la planta bloqueando y tapando los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y eventualmente necrosis y muerte total de la planta. Fue utilizado por el gobierno de Estados Unidos como pesticida para



la erradicación de la coca en Colombia y otros países andinos. Presenta un tasa de crecimiento rápida en medio PDA (De Granada, 2001).

➤ *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* fue descrito por Julios Kühn en 1858. Este hongo, perteneciente a la clase Basidiomycete no produce esporas asexuales (conidios) y únicamente en condiciones especiales produce esporas sexuales (basidiosporas). Jager *et al.* (1982), mencionó que el fitopatógeno *R. solani* puede atacar 250 especies de plantas y que se presenta tanto en campo como en el sitio de almacenamiento de tubérculos que van a ser usados como material de propagación. Ocasiona una enfermedad conocida como rhizoctoniais o cáncer de raíces o tallo, ocasionando daño considerable en los brotes emergentes del tubérculo cuando las condiciones no favorecen su rápida emergencia (Tuset, 2002).

En España causa diversas enfermedades sobre plantas de especial importancia agrícola como el tomate, la remolacha y la patata.

➤ *Phytophthora cactorum*

*Phytophthora cactorum* es un hongo que causa la podredumbre de los frutos de pomáceas, tanto en las últimas etapas de su desarrollo como en el transcurso de su comercialización, así como la pudrición radicular o la muerte del cuello de la planta, enfermedad que ha sido devastadora en todas las regiones donde se ha presentado, ocasionando graves pérdidas económicos a los fruticultores (Carreño *et al.*, 2006) (ver Fig. 6).



Figura 6. De izq. a der. *F. oxysporum*, *R. solani* y *P. cactorum*.

Los medios de cultivo que se utilizaron para el trabajo con hongos fueron el medio PDA (*seed potato dextrose*) en placa y el medio PDB líquido (*potato dextrose broth*).

Para la preparación del medio PDB líquido se recurrió al polvo de *Difco potato dextrose broth*® cuya composición por litro es:

- Almidón de patata.....4.0g
- Dextrosa.....20.0g

Se suspendieron 9.6g de polvo PDB en 0,4L de agua destilada. Calentamos agitando frecuentemente y dejamos que llegara a hervir durante 1 minuto para disolver correctamente el polvo y nos aseguramos de que el pH final se encontrara en torno a  $5.1\pm 0.2$ . A continuación se vertió la mezcla en matraces pequeños de 250mL de capacidad una cantidad aproximada de 100mL y se llevó al autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para la elaboración del medio PDA se utilizó *Difco Potato Dextrose Agar*® cuya composición aproximada por litro es:

- Almidón de patata.....4.0g
- Dextrosa.....20.5g
- Agar..... 15.0g

De este polvo se suspendieron 39g en un 1L de agua destilada. Se mezcló y se calentó con agitación frecuente y se dejó hervir 1 minuto para disolver el polvo. Se llevó al autoclave a 121°C durante 15 minutos y se sirvió en las placas cuando la temperatura fue suficiente como para su manejo sin riesgo de quemaduras. Se dejó solidificar.

Una vez preparados los medios de cultivo se procedió al cultivo de los hongos en placas de PDA. Para lo cual hubo que extraer 2-3 “bocados” mediante la ayuda de *transfer tubs* de las placas originales que nos fueron cedidas. Las nuevas placas fueron incubadas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Resultó que *F. oxysporum* presentó un rápido crecimiento en comparación con los otros hongos generando esporulación en 24 horas. *R. solani* presentó un crecimiento más tardío con generación de esporulación en 72 horas. *P. cactorum* presentó más dificultades con un crecimiento más pausado de tal manera que más adelante nos propusimos probar su crecimiento en medio líquido directamente.

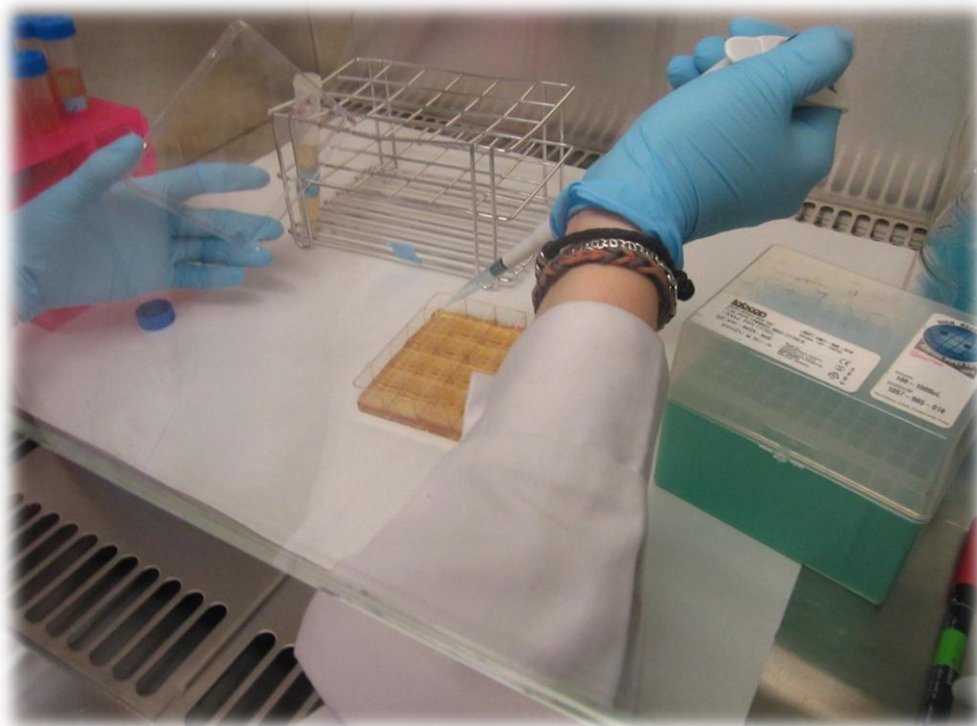
Una vez observadas las velocidades de crecimiento de cada cepa procedimos a su incubación en medio líquido PDB. Se tomaron 2-3 “bocados” de las placas de PDA para *F. oxysporum* y 4-5 “bocados” para *R. solani* conforme a las velocidades de crecimiento que se habían observado en cada uno y se sometieron a incubación en un agitador a 28°C. De esta manera obtuvimos los caldos de los hongos para proceder con los test de bioactividad

#### 3.4.1. Test de bioactividad

Los **test de bioactividad** consisten en pruebas en las que se enfrentan caldos de microorganismos a inhibir con los metabolitos que se supone que generan la inhibición. En este caso se enfrentaron los caldos contenedores de los hongos con los metabolitos (sobrenadantes) extraídos de las Actinobacterias aisladas. Para su realización se necesitaron unas placas especiales conocidas como *Replished* (Sterilin Ltd.) que

consisten en recipientes cuadrangulares y divididos en 25 celdas o pocillos donde verteremos los caldos de cultivo y los sobrenadantes.

Para la preparación de los caldos de los hongos se dispusieron matraces con 100mL de medio PDB estéril donde se vertieron 25mL de caldo de hongo cultivado. A fin de inhibir el crecimiento de Actinobacterias como consecuencia de algún resto biológico que pudiera haber quedado en los sobrenadantes se utilizaron los antibióticos Rifampicina a 5mg/L y Estreptomina a 2,5mg/L así que se añadieron 50µl de Rifampicina y 5 µl de Estreptomina en cada matraz (ver Fig. 7).



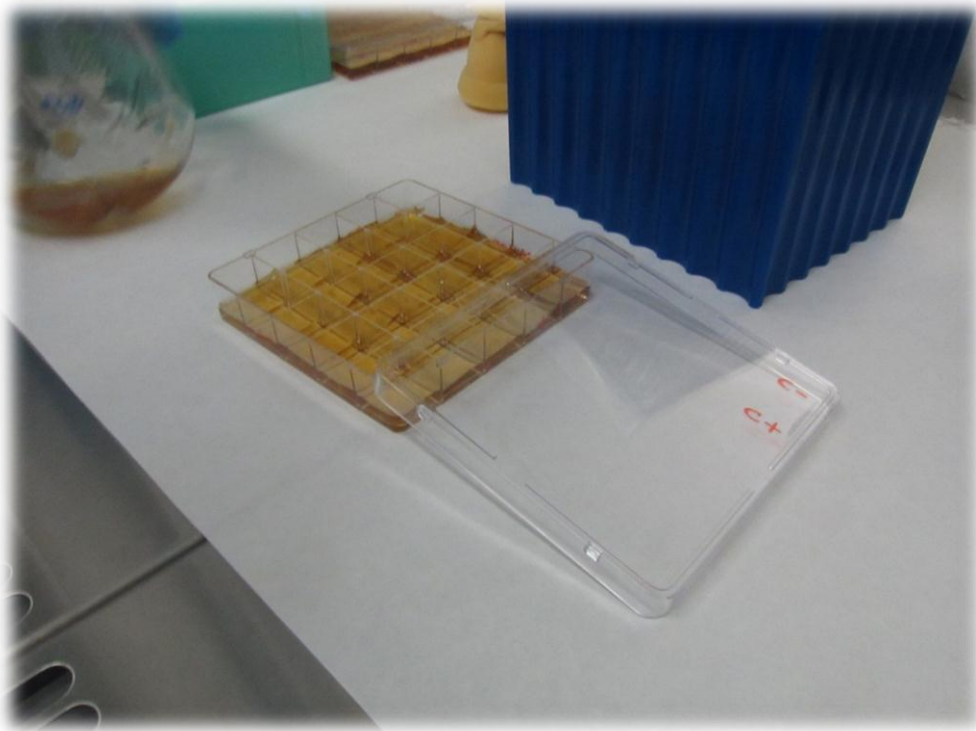
**Figura 7. Inoculación de los sobrenadantes sobre los caldos de los hongos en las placas *Replished*.**

Para confrontar caldos de hongos y sobrenadantes en primer lugar hubo que rellenar cada pocillo de cada placa *Replished* con 2.0mL del caldo del hongo a evaluar mediante ayuda de una pipeta.

En cada placa se probaron 23 sobrenadantes, uno por cada pocillo. Los sobrenadantes se inocularon con una pipeta en su correspondiente pocillo y en un volumen de 0.5mL (anotando en la tapa el código de la cepa de la que procedía).

Se reservaron 2 pocillos para los controles a fin de asegurarnos de que los resultados negativos y positivos que nos aparecieron fueron consecuencia directa de la inhibición o no respectivamente. El control positivo se inoculó el caldo del hongo solo y en él que debería crecer sin problemas el hongo testeado. El control negativo se añadió el caldo del hongo y un anti-fúngico conocido (en nuestro caso Cicloheximida 50mg/L).

Las placas se dejaron incubar 72 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad tras lo cual fueron revisadas a fin de determinar en qué celdas o pocillos que se presentó inhibición del crecimiento de los hongos (ver Fig. 8).



**Figura 8. Placa ya inoculada.**

Después de este paso ya pudimos conocer cuáles de nuestras cepas aisladas eran responsables de la inhibición de los hongos patógenos. Sin embargo, todavía nos quedaba la identificación de las especies o géneros.

### **3.5. Obtención del ADN genómico**

La forma más habitual de identificar una especie en microbiología es mediante la comparación de la secuencia del gen 16S de nuestra muestra con las secuencias del mismo gen que se encuentran en las bases de datos de genomas. El gen 16S es el gen utilizado para este proceso debido a que se trata de un gen bien conservado y que está presente en todos los microorganismos.

Para poder obtener el gen 16S de nuestras muestras en primer lugar debemos extraer el ADN genómico de aquellas cepas que deseamos identificar.

### 3.5.1. Recolección de células

Una vez obtuvimos resultados positivos de inhibición de hongos debida a la acción de los metabolitos seleccionamos aquellas cepas productoras de dichos metabolitos y volvimos a sembrarlas en placas. Estas resiembras se realizaron a partir de las cepas almacenadas en glicerol o de las placas (si aun pervivían en ellas). Se tomaron unos cuantos “bocados” y se extendieron sobre las nuevas placas de medio ISP2 y se cultivan a la temperatura original (28°C porque no se llegó a realizar test de bioactividad con cepas incubadas a 50°C).

Una vez cultivados hay que revisar las placas cada pocos días puesto que para poder obtener el ADN genómico es preferible que las células no lleguen a generar esporas. Así pues, deberemos recogerlas antes de dejar que se empiecen a “blanquear”.

Una vez crecieron de nuevo nuestras cepas procedimos a la recolección de células. En primer lugar se prepararon tubos Eppendorf con 500µL de agua previamente esterilizados en autoclave. Dispusimos de 2 tubos Eppendorf por cada cepa a fin de tener una segunda oportunidad en caso de fracasar la primera extracción del ADN. Después, mediante el uso de palillos estériles se procedió a “rascar” la superficie de la placa donde se observaba crecimiento a fin de extraer las células procurando no arrastrar consigo agar (ver Fig. 9).

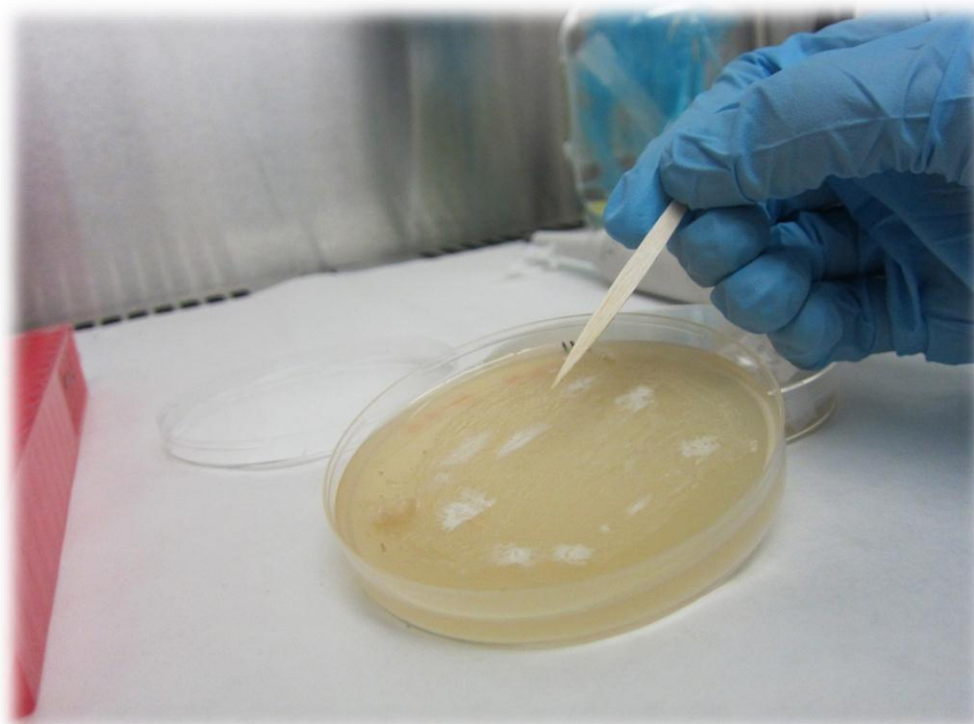


Figura 9. Recolección de células.

Este material biológico se depositó en los tubos Eppendorf con el agua destilada mediante unas leves sacudidas. La cantidad de material recogido por cada cepa en cada Eppendorf fue aproximadamente hasta la marca más inferior del tubo Eppendorf (ver Fig. 10).

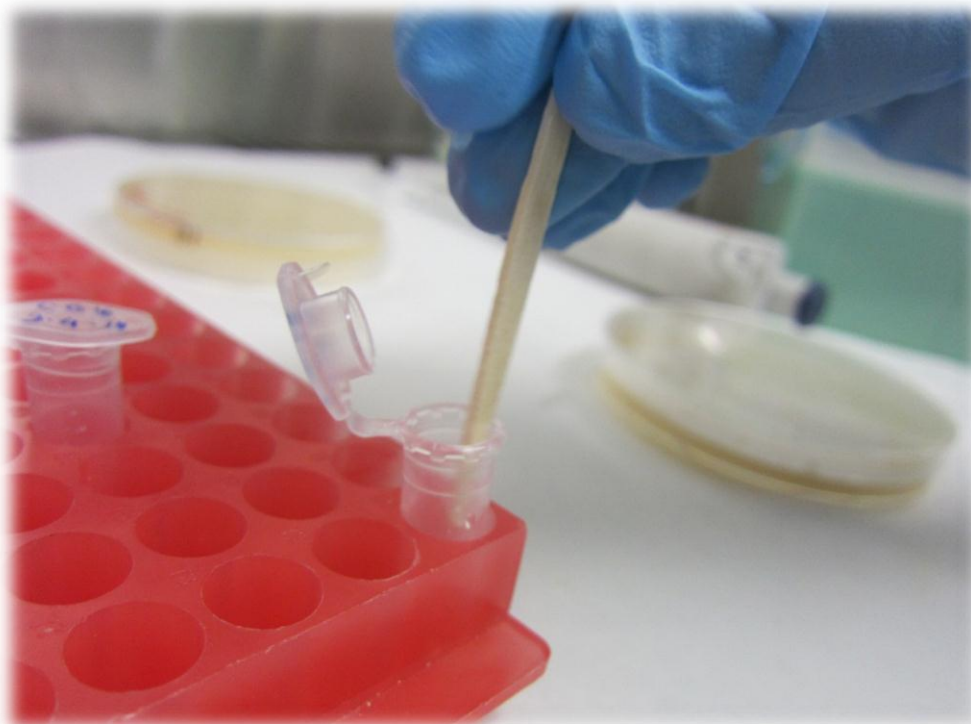


Figura 10. Agitación del palillo para soltar el material genético recogido.

Una vez hemos extraído una cantidad suficiente de células se procedió a la centrifugación de los tubos Eppendorf a 140.000 rpm durante 10 minutos. El resultado fue una masa formada por las células decantadas al fondo y un sobrenadante formado por el agua destilada. Esta agua destilada se retiró mediante la ayuda de una pipeta.

Finalmente los tubos Eppendorf se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el congelador para preservar las células.

### 3.5.2. Extracción y purificación del ADN (mediante el kit de SIGMA)

Para la extracción y purificación del ADN se recurrió al kit SIGMA. El kit de SIGMA consiste en dos soluciones comerciales que nos permitirán la extracción y la purificación del ADN de nuestras células, la *extraction solution* y la *dilution solution*. El protocolo de utilización de ambas soluciones viene dado en las instrucciones del producto.

Para proceder con la extracción se descongelaron los tubos Eppendorf con las células extraídas. Para que el cambio de temperatura sea menos brusco se depositan los tubos Eppendorf sobre hielo en una cubeta.

En primer lugar se añadió 100µL de “*extraction dilution*” en cada tubo Eppendorf y se mezcló bien repipeteando. Sometimos a esta mezcla a agitación suave en el vortex y después a 95°C en el termobloc. En este punto se produce la lisis de las células (ver Fig. 11).

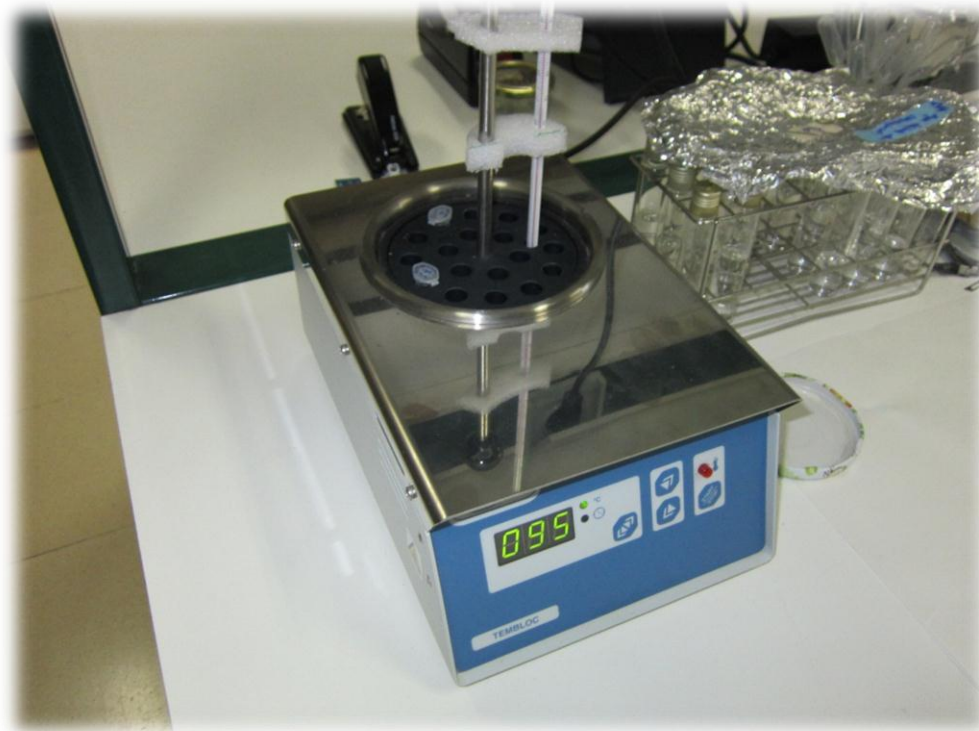


Figura 11. Termobloc a 95°C.

Se añadieron seguidamente 100µL de “*dilution solution*” y agitamos en vortex, esta vez más fuerte.

Después se llevó la muestra a la campana de extracción (debido a que se utilizaron sustancias tóxicas para la purificación) y se procedió a la adición de 100µL de fenol en cada tubo Eppendorf. Mezclamos en vortex hasta obtener una disolución de color lechoso y se procedió a la centrifugación a la máxima velocidad durante 10 minutos. El sobrenadante (interfase superior) se recogió con una pipeta y se pasó a un nuevo Eppendorf donde se añadieron 100µL de cloroformo. Las muestras se agitan en el vortex hasta alcanzar la mezcla de las dos interfases. Finalmente se centrifugaron de nuevo pero esta vez durante 5 minutos y se recogió todo el sobrenadante posible evitando tocar la interfase. Este ADN es llevado a un nuevo tubo Eppendorf que se etiquetará y se almacenará en el congelador a -20°C.

### 3.6. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se realiza mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La **PCR** es una reacción que permite la obtención de multitud de copias de una determinada fracción del ADN o ARN presente en una muestra. Esta técnica fue ideada

por Kary Mullis en 1983 (Mullis y Faloona, 1987), fue presentada a la comunidad científica en 1985 y significó el premio Nobel para su descubridor en 1993. Este hallazgo supuso un impacto espectacular en la biología molecular e inmediatamente surgieron multitud de aplicaciones hasta hacerse indispensable en todas aquellas técnicas que precisen de suficiente cantidad de DNA como para poder ser analizado o manipulado.

En esta reacción se simula el mismo procedimiento que tienen los seres vivos para la replicación de su ADN y que se fundamenta en la complementariedad de bases. Durante la replicación del ADN celular, la doble hélice de ADN se separa enzimáticamente en dos hebras. A continuación, una ARN polimerasa sintetiza una hebra corta de ARN que es complementaria al lugar del ADN donde comenzará la replicación. Una ADN polimerasa comienza entonces desde este punto la polimerización de otra hebra de ADN complementario. En la reacción de PCR, una elevada temperatura separa las dos hebras de la molécula de ADN; mientras que dos secuencias sintéticas de ADN de una única hebra llamadas “*primers*”, sirven de cebadores a la ADN polimerasa. Uno de ellos queda ligado al comienzo de la zona a amplificar y el segundo es complementario de la zona final.

Dos importantes innovaciones hicieron posible el desarrollo de esta técnica. Por un lado el empleo de una ADN polimerasa, la Taq polimerasa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, estable a altas temperaturas; y por otro lado, la posibilidad de conseguir que la reacción se desarrolle en un medio en el que la temperatura varíe de forma rápida y precisa. La reacción de PCR tiene lugar en un termociclador, donde la muestra y los reactivos son sometidos a diferentes temperaturas durante un determinado periodo de tiempo. Tiempo y temperatura definen cada una de las tres fases que tienen lugar en la reacción y que constituirán un ciclo que se repetirá 30 o 40 veces. En una primera fase, o de desnaturalización, las dos hebras del ADN de la muestra se separan. En la segunda fase, llamada de hibridación o de alineamiento, los “*primers*” se unen selectivamente a aquellas porciones de ADN que le son complementarias. En la última fase o de extensión, la enzima polimerasa comienza la reacción de polimerización a continuación del “*primer*”, ensamblando los nucleótidos complementarios de la hebra de ADN.

Los ingredientes se necesitan para realizar la PCR son: ADN molde (que es lo que extrajimos y purificamos de aquellas Actinobacterias que habían resultado inhibitorias de hongos), oligos SF1 y 1522r (que indican el punto a partir del cual se tiene que copiar el ADN, en nuestro caso el objetivo será la amplificación del gen 16S), las bases nitrogenadas Adenina, Guanina, Citosina y Timina (que vendrán como ATP, GTP, CTP y TTP, es decir, como nucleótidos trifosfatos), la ADN polimerasa y una mezcla tampón que simule las condiciones del citoplasma celular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando dos oligonucleótidos universales diseñados para amplificar regiones del gen ribosómico 16S.



Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

SF1, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1525R, 5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'

La ADN polimerasa es la enzima encargada de la reorganización de las bases durante la copia. Debido a su diseño requiere unos *extration – dilution* concretos que son vendidos por el mismo fabricante que nos proporciona la ADN polimerasa.

Cada muestra que preparamos para la PCR debe contener exactamente 25µL de volumen. La relación entre los componentes en una PCR para una muestra de 1 µL de ADN molde es la siguiente:

- PCR mix – 12 µL
- Mezcla *Extration-Dilution* – 2,5 µL
- Oligo SF1 – 0,8 µL
- Oligo 1522r – 0,8 µL
- ADN molde – 1 µL
- Agua Mili-Q – se utiliza suficiente agua Mili-Q para alcanzar los 25 µL por muestra

Debido a que trabajamos con cantidades muy pequeñas siempre se preparó una muestra más a fin de evitar una posible escasez en la preparación de la última muestra.

Para simplificar las operaciones en primer lugar se realizó una mezcla madre con todos los componentes de la PCR a excepción del ADN en un tubo Eppendorf pequeño calculando las cantidades para tantas muestras de ADN que teníamos más un control. Después procedimos a pipetear 24µL de esta mezcla madre a un tubo Eppendorf pequeño por cada muestra y en cada uno le añadimos 1 µL del ADN molde correspondiente.

Una vez tuvimos preparado cada tubito con el mix y el ADN correspondiente únicamente tuvimos que programar el termociclador y esperar a que se realizaran los ciclos de temperatura.

Los ciclos que se utilizan en la PCR contienen las diferentes fases:

- Desnaturalización a 94°C durante 1 minuto.
- Anillamiento a 55°C durante 1.30 minutos.
- Extensión a 72°C durante 2 minutos.

Una vez cumplidos estos ciclos se produce la extensión final a 72°C durante 7 minutos.

En la primera PCR que se realizó se utilizaron 5 muestras, de las cuales 2 pertenecían a este experimento (la C17 y la CG10). Para el cálculo de las cantidades de cada componente de la PCR se supusieron 6 muestras (1 más de margen para evitar quedarnos escasos de material). La proporción de cada componente ya se comentó en la metodología y las cantidades en nuestro caso fueron:

- ❖ PCR mix .....72 $\mu$ L
- ❖ Mezcla Extraction-Dilution .....15 $\mu$ L
- ❖ Oligo SF1.....4.8 $\mu$ L
- ❖ Oligo 1422r.....4.8 $\mu$ L
- ❖ ADN molde .....6 $\mu$ L (solo para el cálculo, en cada muestra solo se utiliza 1 $\mu$ L del ADN.
- ❖ Agua Mili-Q .....47,4 $\mu$ L

En un tubo Eppendorf se procedió a la mezcla de todos los componentes a excepción del ADN molde a fin de obtener lo que conocemos como PCR-mix, de manera que podemos agilizar el proceso puesto que no tenemos que ir añadiendo componente a componente para cada muestra.

Para preparar cada una de las muestras se tomó con una pipeta 24 $\mu$ L del PCR-mix en un tubo Eppendorf pequeño y se añadió 1 $\mu$ L del ADN molde de la muestra a analizar procurando mezclar bien.

Una vez todos los tubos Eppendorf pequeños estuvieron preparados y enumerados se colocaron en el termociclador y se procedió a la programación de la secuencia de la PCR. Pasado el tiempo necesario para que se llevara a cabo el proceso las muestras se extrajeron y conservaron en el congelador a -20°C.

Esta primera PCR hubo de ser repetida ya que se necesitan dos bandas de ADN (la obtención de bandas se explica en el paso de la electroforesis) para la identificación de los microorganismos. La C17 no salió bien así que en este caso la única muestra que aporta este experimento es la CG10. En total se tratan de 4 muestras aunque los cálculos de las cantidades de cada componente se realizaron para 5 muestras (dejando una como control).

- ❖ PCR mix .....60 $\mu$ L
- ❖ Mezcla Extraction-Dilution .....12.5 $\mu$ L
- ❖ Oligo SF1.....4.0 $\mu$ L
- ❖ Oligo 1422r.....4.0 $\mu$ L
- ❖ ADN molde .....5 $\mu$ L
- ❖ Agua Mili-Q .....39.5 $\mu$ L

El proceso de mezclado del PCR-mix y de preparación de cada tubo Eppendorf pequeño fue el mismo que en el caso anterior.

La siguiente PCR que se hizo tuvo como muestras de este experimento la C17, CG4, CG8, CG9, CG16, CG69(1), CG69(2) y otra muestra más ajena a este experimento. En total fueron cuatro muestras, sumando la muestra control estos fueron los cálculos:

❖ PCR mix .....	108μL
❖ Mezcla Extraction-Dilution .....	22.5μL
❖ Oligo SF1.....	7.2μL
❖ Oligo 1422r.....	7.2μL
❖ ADN molde .....	9μL
❖ Agua Mili-Q .....	71.1μL

La realización de esta PCR fue igual que en los casos anteriores. También se realizó una segunda PCR para obtener la segunda banda de ADN. Como ya se verá más adelante durante el proceso de electroforesis las que salieron correctamente fueron la CG4, la CG8, la CG9 y la CG16. El resto por diferentes motivos que se explicarán durante la descripción de la electroforesis no salieron correctamente.

### 3.7. Electroforesis

Llamamos **electroforesis** a la técnica desarrollada por Tiselius en 1937 mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Esta técnica se basa en el hecho de que la mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica (cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran), como consecuencia, se desplazan cuando se ven sometidas a un campo eléctrico (Smithies, 1955).

Esta técnica nos permite analizar los productos de amplificación de la PCR y extraer las bandas mediante un marcador que emite luz al ser sometido a radiación ultravioleta:

Para realizar la electroforesis se siguió el siguiente protocolo:

En primer lugar se preparó una disolución de TAE al 1X. Se dispuso de una disolución de TAE al 50X de la cual se tomaron 10mL con una pipeta que fueron llevados a una probeta de 1L de capacidad. Se vertió agua destilada hasta alcanzar la marca de 500mL y tras una agitación se introdujo en una botella marcada como TAE 1X.

A continuación se prepararon 40mL de gel de agarosa al 1%. Se introdujeron 0,4g de polvo de agarosa en un bote pequeño en el que después se vertieron 40mL de TAE 1X y se calentó en el microondas, varias veces, de escaso tiempo cada, una para evitar que se derramara. Una vez estuvo bien disuelto se dejó reposar para que se enfriara. Una vez estuvo suficientemente frío como para que no lo evaporara, se añadió 1,5μL de bromuro de etidio.

Después se procedió a la preparación de la cubeta de electroforesis. Se colocó cinta adhesiva en los lados vacíos de la cubeta a fin de completar el recipiente. Después se colocó el peine y se procedió a verter el gel de agarosa cuando la temperatura no fue excesivamente caliente pero sin que llegara a solidificar en el bote.

Una vez estuvo solidificada la agarosa se procedió a la retirada de la cinta adhesiva y se colocó la cubeta dentro de la caja de electroforesis. A continuación se rellenó con TAE 1X de tal manera que la agarosa quedó totalmente cubierta por el TAE 1X. En este momento se retira el peine de tal forma que quedan a la vista los pocillos donde se introducirá el material genético.

Una vez preparado todo se procedió a la inoculación de las muestras del gen 16S en su respectivo pocillo. Con una pipeta se tomó cada muestra de los tubos Eppendorf (previamente descongelados) y con mucho cuidado se introdujo la punta en el pocillo procurando no romperlo. Poco a poco se fue soltando la muestra de tal forma que esta bajó y se colocó dentro del pocillo. Este mismo proceso se repite con el resto de muestras en los demás pocillos. De esta forma al final todas las muestras son “cargadas” en los pocillos de la agarosa.

Una vez cargadas todas las muestras se cerró la tapa de la caja de electroforesis, se conectaron los cables con el equipo de control y se seleccionaron los parámetros voltaje a 100V y e intensidad a 400mA. Con todo preparado se pulsa el botón de iniciar el proceso y se esperó a que la electroforesis tuviera lugar (ver Fig. 12).

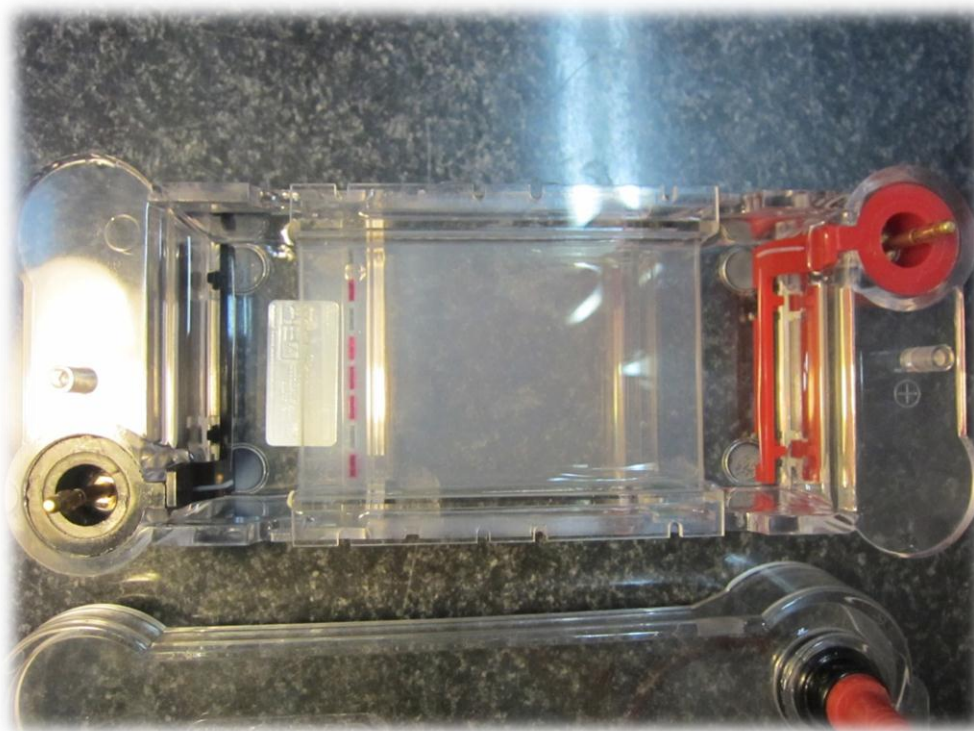


Figura 2. Caja de electroforesis con la cubeta con agarosa y las muestras cargadas.

A partir de ahora solo hay que esperar en torno a una hora en la cual podemos observar como nuestra muestra avanza sobre la agarosa en el sentido de la corriente eléctrica (desde el polo negativo al positivo).

### 3.7.1. Revisión de la electroforesis y extracción del gen 16S

Una vez realizada la electroforesis se comprobó mediante el uso de una lámpara de luz ultravioleta la presencia del gen 16S en nuestras muestras. El PCR-mix que utilizamos contenía un marcador para el gen 16S que lo hacía emitir brillo al ser expuesto a luz ultravioleta. De esta manera podemos comprobar si la reacción en cadena de la polimerasa trascurrió según lo previsto y además nos permite localizar en la agarosa a nuestro gen.

De las muestras realizadas en la primera electroforesis la que presentó brillo al ser expuesta a luz ultravioleta fue la cepa CG10 mientras que la C17 no presentó ningún tipo de iluminación durante la exposición en la lámpara. La banda de la muestra CG10 fue cortada de la agarosa con unas cuchillas estériles y guardada en un tubo Eppendorf a -20°C.

La siguiente electroforesis se realizó sobre la muestra CG10 cuya PCR fue repetida para obtener la segunda banda. De la misma forma que en el caso anterior la banda presentó brillo ante la exposición a la luz ultravioleta y fue cortada y almacenada junto a la anterior en el mismo tubo Eppendorf. La intensidad del brillo de ambas muestras fue moderada (este detalle resultará importante a la hora de purificar las bandas).

La siguiente electroforesis que se realizó fue sobre las muestras CG4, CG8, CG9, CG16, CG69(1), CG69(2) y la CG17 (que fue repetida). Al igual que en el caso anterior la PCR se realizó por duplicado y con ella la electroforesis.

Al igual que en la primera electroforesis la cepa C17 siguió sin presentar brillo y la CG69(1) presentó un brillo muy tenue. La CG4, CG8, CG9, CG16 y la CG69(2) presentaron una respuesta moderada a la luz ultravioleta perfectamente con un brillo moderado. Las bandas de estas últimas fueron recogidas en tubos Eppendorf y almacenadas a -20°C.

La repetición arrojó peores resultados puesto que en este no presentaron respuesta lumínica en la lámpara las cepas C17, la CG69(1) y CG69(2). Debido a falta de tiempo hubo que descartar estas muestras. Sin embargo CG4, CG8, CG9 y CG16 presentaron con intensidad moderada y en ambos casos pudo recogerse la segunda banda.

### 3.8. Purificación de bandas

La purificación de los fragmentos correspondientes al gen 16S para su secuenciación automática se realizó utilizando el sistema de purificación de *Quiagen (Quiaquick spin columns®)* el cual contiene las soluciones incluye los reactivos Buffer QG, Buffer PE y Buffer EB.

Una vez finalizada la electroforesis obtuvimos dos bandas de las cepas CG4, CG8, CG9, CG10 y CG16 y procedimos a su purificación para poder enviar las bandas a secuenciar (el laboratorio del Edificio Departamental encargado de la obtención de las secuencias de las cepas).

En primer lugar lo que se hizo fue sacar los tubos Eppendorf que contenían las bandas y dejarlos descongelando en una cubeta con hielos. De forma paralela se encendió y programó el termobloc para que alcanzara una temperatura de 50°C.

Se pesaron los tubos Eppendorf con las bandas y un tubo Eppendorf vacío a fin de conocer el peso de las bandas que resultó ser el siguiente. Conocido este puede saber cuanta cantidad de Buffer QG necesitamos añadir en cada caso (que será el triple en  $\mu\text{L}$  del valor en mg):

CG4 = 240mg----- 720 $\mu\text{L}$  de Buffer QG

CG8 = 340mg----- 1020 $\mu\text{L}$  de Buffer QG

CG9 = 390mg----- 1170 $\mu\text{L}$  de Buffer QG

CG10 = 250mg ----- 750 $\mu\text{L}$  de Buffer QG

CG16 = 380mg ----- 1140 $\mu\text{L}$  de Buffer QG

Tras añadir estas cantidades a cada tubo Eppendorf, trasladamos cada uno al termobloc programado a 50°C y agitamos cada poco tiempo hasta que la combinación de movimiento y temperatura facilitó la disolución de la agarosa. La disolución resultante se pasó para cada caso una columna de purificación. Para aquellas muestras que sobrepasen los 800 $\mu\text{L}$  solo se añadió dicha cantidad, reservando lo siguiente. Las columnas se sometieron a centrifugación durante 1 minutos a 14000rpm. Después se eliminó el líquido del fondo de la columna que era agarosa disuelta. Para las muestras en la que hubo que reservar parte del contenido hubo que añadirlo a su respectiva columna y repetir la centrifugación y el retirado de agarosa. Para asegurarnos de que toda la agarosa se retira completamente se volvieron a añadir 500 $\mu\text{L}$  de Buffer QG y se volvió a centrifugar y a retirar el sobrante.

El siguiente paso fue la adición de 750 $\mu\text{L}$  de Buffer PE en cada columna. Esperamos 5 minutos para asegurar la mezcla correctamente y se procedió a la centrifugación a la

misma velocidad y mismo tiempo. Se retira el residuo inferior de la columna y volvemos a centrifugar para asegurar la limpieza de la membrana.

Llegados a este punto se separó la parte superior de la columna (la que contiene la membrana con nuestro material genético) y se encajó en un tubo Eppendorf normal. Se añadió el Buffer EB directamente sobre la membrana con mucho cuidado de no romperla. La cantidad utilizada para cada tubo Eppendorf fue de 38 $\mu$ L debido a que el brillo durante la comprobación de la electroforesis no fue demasiado intenso. Esperamos 5 minutos y después centrifugamos el conjunto (parte superior de la columna y el Eppendorf que la contiene) para asegurarnos que el material genético pasa por la membrana y se almacena en el Eppendorf. Una vez realizado esto se retiró la parte superior de la membrana y se etiquetaron los tubos Eppendorf que ahora ya si contienen nuestros genes 16S purificados. Guardamos los tubos Eppendorf en el congelador a -20°C (ver Fig. 13).

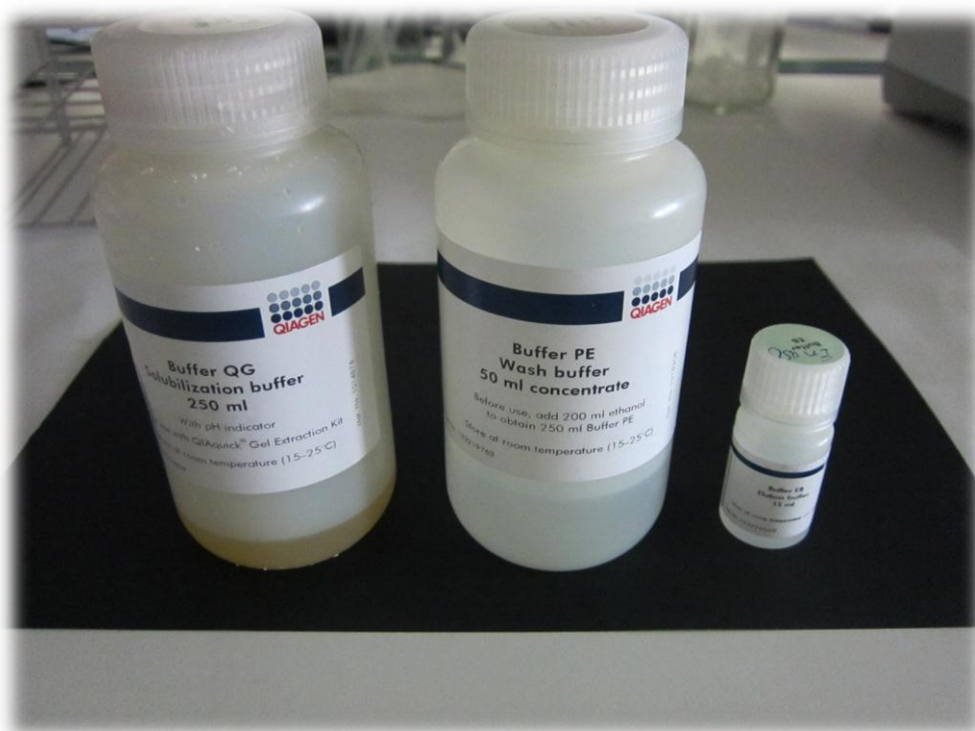


Figura 33. Reactivos *Quiagen* utilizados para la purificación de las bandas.

### 3.9. Cuantificación

Una vez obtuvimos nuestras bandas de gen 16S purificadas el siguiente paso es la secuenciación. La secuenciación fue realizada por personal de un laboratorio anejo al nuestro en el Edificio Departamental. Para poder enviar las muestras a secuenciación debimos prepararlas adecuadamente según los parámetros que no exigían. Se nos pidió un volumen por muestra de 8 $\mu$ L y, que de los cuales, 3 $\mu$ L fueran los cebadores, puesto que para poder realizar la secuenciación se necesitan utilizar cebadores específicos que cortan nuestro ADN por el gen 16R. Así pues, la cantidad de muestra de ADN máxima que se podía añadir eran 5 $\mu$ L y el peso del material genético debía ser de 100ng de ADN. Así pues para poder ajustar este peso molecular el paso que se necesitó realizar es la cuantificación.

La **cuantificación** es un proceso que nos permite estimar cuanto ADN contenido en nuestras muestras vamos a secuenciar.

Para su realización hubo que realizar una electroforesis de manera similar las ya realizamos pero en este caso se utilizó solamente 1  $\mu$ L de ADN por cada muestra. Este ADN se tomó de las bandas purificadas y se le añadió 5  $\mu$ L de un marcador. Como trabajamos con cantidades muy pequeñas la mezcla del ADN con el marcador es un proceso en el que debimos extremar el cuidado a la hora de pipetear las muestras.

Se colocó una pequeña tira de parafilm en la mesa de trabajo y se añadieron pequeñas bolitas de 5  $\mu$ L de marcador por cada muestra que vayamos a cuantificar más una reservada para un plásmido de cantidad conocida. Se añadió 1  $\mu$ L de ADN en su respectiva bolita de marcador y se mezcló con cuidado procurando no generar burbujas para después introducir cada muestra a su respectivo pocillo en la cuba de electroforesis.

El plásmido que se utilizó fue el pGEN (Roche©) equivalente a 100ng de ADN que es utilizado para determinar por comparación la cantidad de material genético de nuestras muestras.



Finalmente se realizó la electroforesis con los parámetros ya utilizado anteriormente (ver Fig. 14).

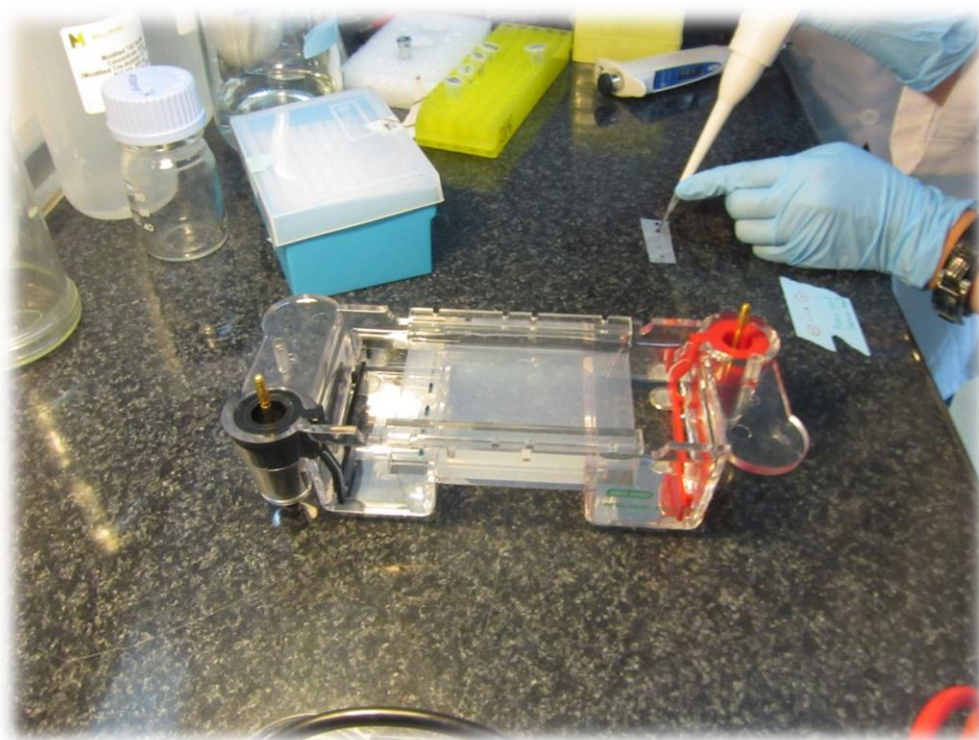


Figura 144. Mezclado del marcador con las muestras de ADN previo a la carga en la agarosa

Una vez finalizada se expusieron las muestras a radiación ultravioleta para comprobar la intensidad de nuestras muestras en relación con la del plásmido pGEN. Para la muestra CG10 el brillo fue moderado mientras que para CG4, CG8, CG9 y CG16 el brillo fue bastante tenue. Se tomó una impresión para poder evaluar mejor esta relación.

En base a estos resultados se optó por utilizar para la preparación de la muestra CG10 3 $\mu$ L de ADN junto con 2 $\mu$ L de agua Mili-Q y para las muestras CG4, CG8, CG9 y CG16 se utilizó 5 $\mu$ L de ADN y nada de agua Mili-Q. A estas cantidades hay que añadir los 3 $\mu$ L de los cebadores y nos resultó que cada tubo Eppendorf final destinado a la secuenciación contiene los 8 $\mu$ L que se nos pedían.

### 3.10. Revisión de las secuencias genéticas obtenidas

Tras la secuenciación obtenemos las secuencias del gen 16S de nuestras muestras. Estas secuencias han de ser corregidas con un programa. En nuestro caso se utilizó el programa *Chroma® Lite version 2.1* para corregir las imperfecciones en la secuenciación de las bases y recortar los extremos de la muestra (ver Fig. 15). Una vez corregido se guarda como archivo *FASTA*.

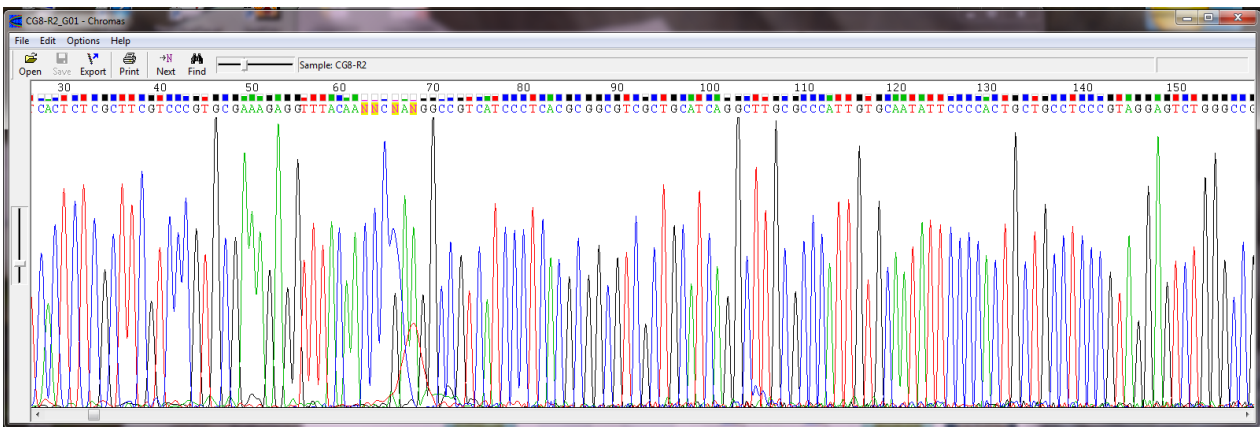


Figura 15. Cromatografía de la secuencia de bases.

Las series de bases que conforman nuestras secuencias son llevada a bases de datos de genomas de microorganismos donde mediante comparación podemos conocer cuales son las especies cuyos genes 16S son más similares a las presentadas.

Existen multitud de bases de datos sobre genomas, algunas son públicas como la de la página NCBI pero otras más profesionales son privadas, como *EZTaxon*, que es la que se utilizó.

Para añadir la base hay que prestar atención a que se coloca en el orden que nos pide el programa (5-3).

El tipo de identificación que logramos mediante comparación se denomina identificación parcial, porque solamente cotejamos una parte del genoma del microorganismo, la correspondiente al gen 16S.

La información que nos aporta *EZTaxón* es una lista de especies descritas (con su correspondiente cepa tipo) y el porcentaje de relación que presentan respecto a nuestra muestra. De esta manera podemos conocer cuál es la especie más próxima a nuestra cepa.

Para poder determinar que nuestra cepa es una especie concreta debe de aparecer como mínimo con un 99% de relación respecto de la cepa tipo que presenta en la base de datos y se deberían hacer estudios de hibridación. Si nos encontramos con una relación de menos del 97% podemos incluso pensar que se trata de un nuevo género.

# 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Aislamiento de Actinobacterias

Tras la incubación de las muestras en diferentes medios se aislaron 76 cepas de microorganismos. En algunos aislamientos se comprobó más adelante la presencia de más de una especie diferente de Actinobacterias (cepas CG13, CG67 y CG69) de tal manera que el número total de cepas aisladas fue 80.

La muestra de Compost fue la que ofreció más aislamientos (70) frente a la muestra de extracto de compost (10). El medio ISP2 fue el medio que más aislamientos ofreció para muestras de compost (42) frente a los medios de ácido húmico (18) y a los basados en extracto de compost (10). El medio de ácido húmico fue el que más aislamientos ofreció para muestras de extracto de compost (6) frente al medio ISP2 (4). El medio basado en extracto de compost en el que se sembró extracto de compost fue el único tipo de medio que no ofreció ninguna cepa (ver Fig. 16).

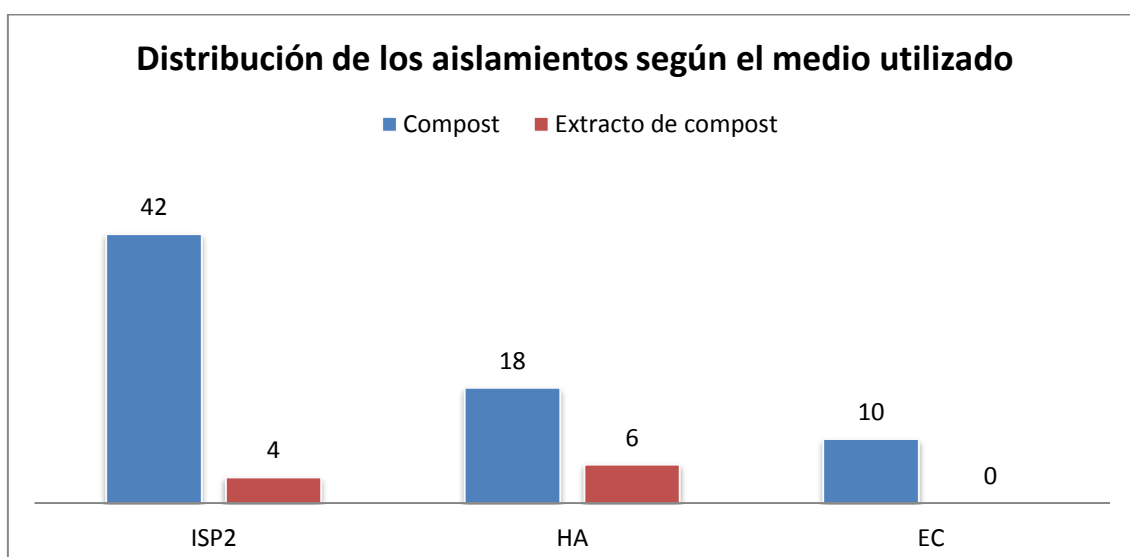


Figura 16. Distribución de los aislamientos según el medio utilizado.

Podemos concluir que en lo referente al medio de cultivo utilizado para el aislamiento de cepas el ISP2 resultó ser el más apropiado en lo referente a muestras de compost mientras que para el aislamiento de muestras de extracto de compost no existieron demasiadas diferencias entre los medios ISP2 y de ácido húmico, si bien es cierto que el número de aislamientos de la muestra de extracto de compost fue notablemente inferior al de la muestra de compost.

En lo referente a la temperatura de incubación, de todas las cepas aisladas 32 correspondieron a cepas aisladas a partir de medios incubados a 50°C (condiciones

termófilas) y 48 de medios incubados a 28°C (condiciones mesófilas). Aunque el número de cepas incubadas en condiciones mesófilas fue mayor que el de cepas incubadas en condiciones termófilas, es cierto que se utilizaron el doble de medios de cultivo para las mesófilas, lo cual podría explicar la diferencia en el número de aislamientos respecto a las condiciones de incubación (ver Fig. 17).

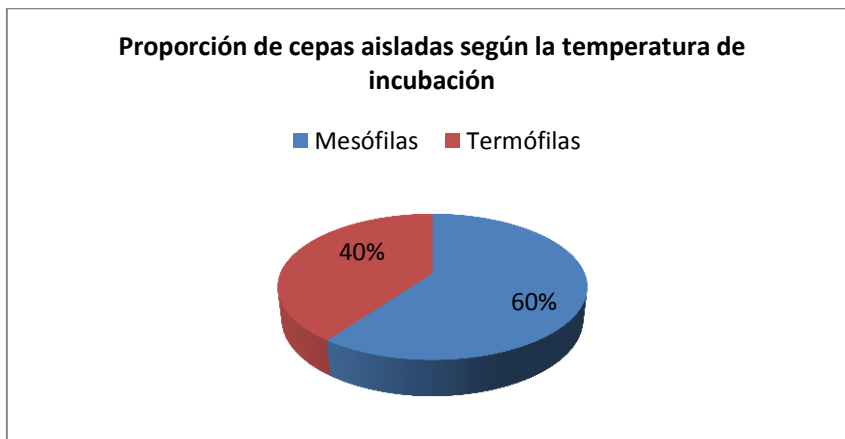


Figura 5. Proporción de cepas aisladas según la temperatura de incubación.

Las Actinobacterias mostraron ser capaces de adaptarse tanto a condiciones mesófilas como termófilas (Prescott, 2004).

A estos 80 aislamientos hay que añadir 11 cepas más aisladas de medios incubados a 28°C en experimentos previos que se utilizaron para la comprobación morfológica de las cepas una vez fueron purificadas.

Se anotó el número de colonias de cada placa siempre y cuando este fuera significativo (valores entre 300 y 30) para poder obtener las **Unidades Formadoras de Colonias** (UFC) cuya fórmula utilizada fue:

$$\frac{UFC}{g \text{ de muestra}} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias significativas}}{\text{Dilución} * 0,2ml \text{ sembrados}}$$

Incubación a 28°C					Incubación a 50°C				
Muestra	Medio	Dilución	Nº de colonias	UFC/g	Muestra	Medio	Dilución	Nº de colonias	UFC/g
Com.	AH	10 <sup>-3</sup>	170	850000	Com.	AH	10 <sup>-4</sup>	75	3750000
Com.	ISP2	10 <sup>-3</sup>	64	320000	Com.	ISP2	10 <sup>-4</sup>	14	700000
Com.	EC	10 <sup>-3</sup>	69	345000	Com.	EC	10 <sup>-4</sup>	49	2450000
Ext.	AH	10 <sup>-1</sup>	170	8500	Ext.	AH	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas	-
Ext.	ISP2	10 <sup>-1</sup>	38	1900	Ext.	ISP2	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas	-
Ext.	EC	10 <sup>-1</sup>	63	3150	Ext.	EC	10 <sup>-1</sup>	Muy pocas	-

Tabla 2. Inventario de UFC.

En la tabla 2 puede observarse que en lo referente a las muestras de compost incubadas a 28°C el mayor valor de UFC/g fue presentado en el medio ácido húmico. Los medios de ISP2 y de extracto de compost mostraron resultados similares. Las muestras de extracto de compost incubadas a la misma temperatura mostraron un resultado similar en lo referente a medio de ácido húmico pero los medios de extracto de compost mostraron mayor número de UFC/g que los medios de ISP2.

En lo referente a las muestras incubadas a 50°C sólo se pudieron hacer estudios de número de colonias en muestras de compost debido a la escasez de las muestras de extracto de compost. Las placas de ácido húmico siguieron mostrando los valores más altos pero en este caso los medios basados en extracto de compost alcanzaron mejores resultados que los medio ISP2

#### 4.2. Purificación de cepas

Tras la purificación hubo que descartar aquellas cepas que resultaron no ser Actinobacterias por su morfología o que bien sufrieron contaminación, especialmente por *Bacillus* (aunque también hubo contaminación por hongos), durante su mantenimiento.

En relación al éxito en la selectividad de los aislamientos podemos resumir que de las 91 cepas confirmamos por rasgos morfológicos la presencia de 68 cepas de Actinobacterias y hubo que descartar las 23 cepas restantes (ver Fig. 18).

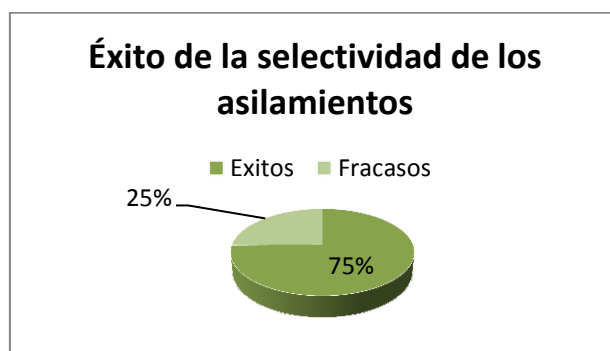


Figura 6. Éxito de la selectividad de los aislamientos.

Uno de los motivos del número de fracasos en la selectividad de los aislamientos puede achacarse a una concentración insuficiente de antibióticos y de anti-fúngicos que hubieran facilitado más la presencia aislada de Actinobacterias.

Las 68 cepas confirmadas morfológicamente como Actinobacterias fueron conservadas en glicerol.

### 4.3. Obtención de metabolitos

Por escasez de tiempo solo pudieron hacerse test de bioactividad con las cepas mesófilas de tal manera que solo de ellas se extrajeron sobrenadantes de metabolitos. En total se obtuvieron 39 sobrenadantes.

### 4.4. Actividad anti-fúngica

Los test de bioactividad sirvieron para probar la actividad anti-fúngica de los metabolitos extraídos de las Actinobacterias aisladas frente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Rhizotocnia solani*. *Phytophthora cactorum* no pudo ser probada porque su velocidad de crecimiento tanto en medio ISP2 líquido como en sólido demostró ser insuficiente para la obtención de caldos durante el periodo de experimentación. Se propone para el futuro buscar otro tipo de medio de cultivo más propicio para este hongo.

➤ Bioactividad de metabolitos frente a *Rhizotocnia solani*:

Se observó inhibición en el crecimiento del hongo en aquellos pocillos en los que se utilizaron los metabolitos de las cepas C17, CG4, CG16 y CG9 (ver Fig. 19).

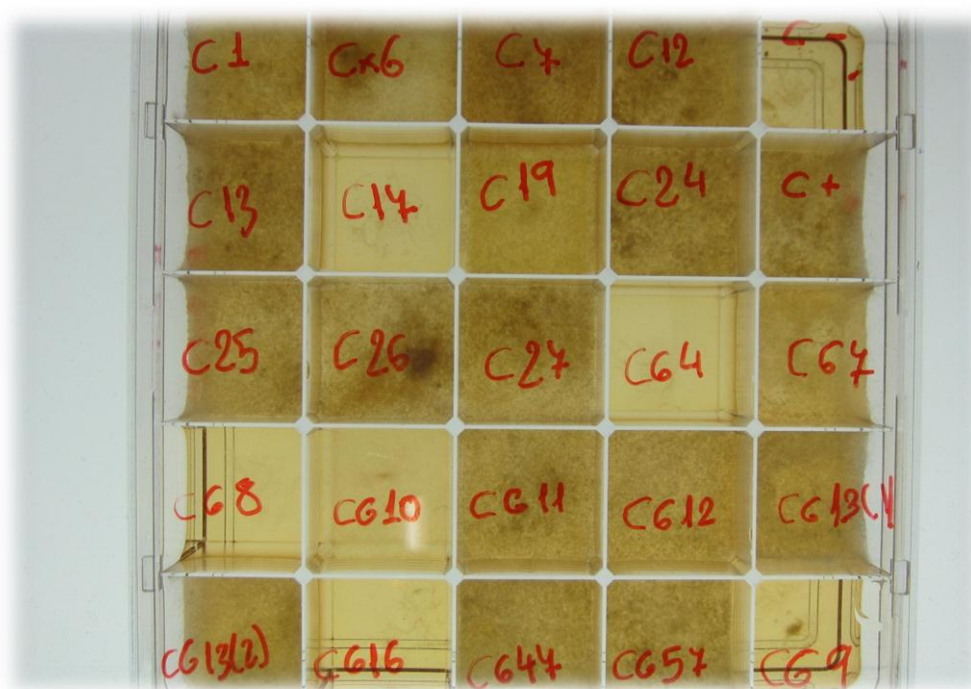


Figura 19. Test de bioactividad frente a *R. solani*.

El experimento se continuó en el tiempo debido a los buenos resultados de inhibición a fin de conocer hasta que punto llegaba el potencial de inhibición.

Tras 2 semanas de prueba se observó que en los pocillos donde se inocularon los metabolitos de C17, CG4, CG16 y CG9 no hubo ningún tipo de crecimiento de *R.*

*solani*, determinando un gran potencial de inhibición contra este hongo. Sin embargo, en la celda donde se inocularon los metabolitos de la cepa CG10 se terminó observando un crecimiento del hongo, si bien este crecimiento fue mucho menor y mucho más retrasado en el tiempo que el resto de celdas donde no hubo ningún tipo de detención del crecimiento de *R. solani* (ver Fig. 20).

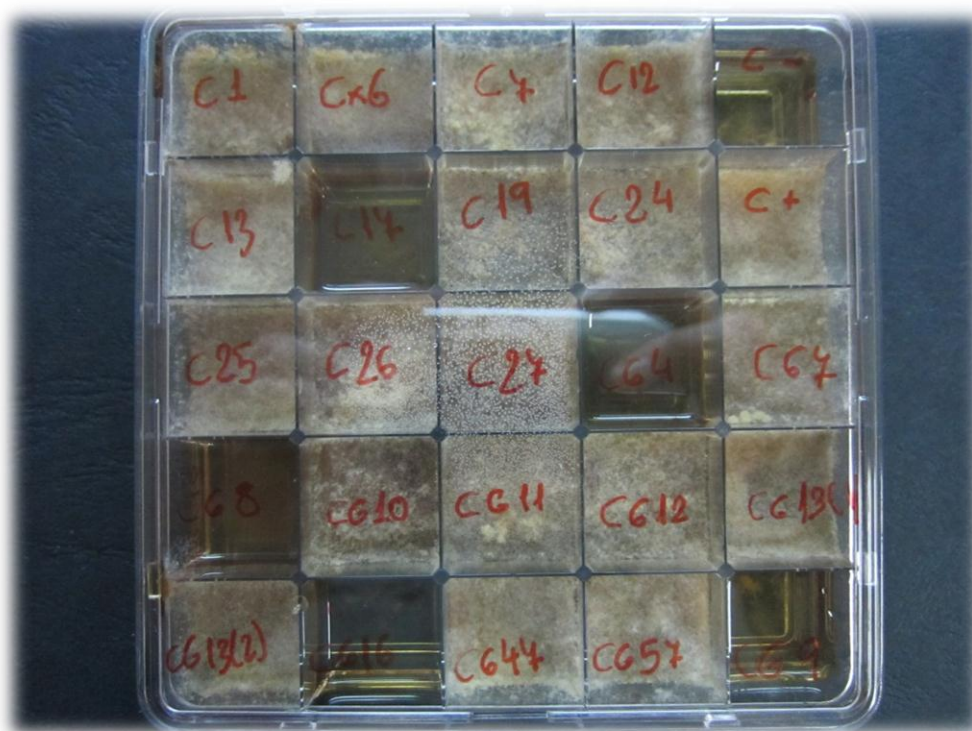


Figura 20. Test de bioactividad frente a *R. solani* 2 semanas después.

Más adelante se realizó una segunda prueba con las cepas en la que se incluyeron aquellos metabolitos de cepas que aun no habían sido probados y se volvieron a probar los metabolitos que nos habían dado resultados positivos para confirmar dichos resultados.

En lo referente a los nuevos metabolitos probados se observó inhibición en los producidos por las cepas CG69(1) y CG69(2). Además pudo confirmarse la capacidad inhibidora de los metabolitos C17, CG4, CG9 y CG16 descartándose en este caso los metabolitos producidos por CG10 (ver Fig. 21).

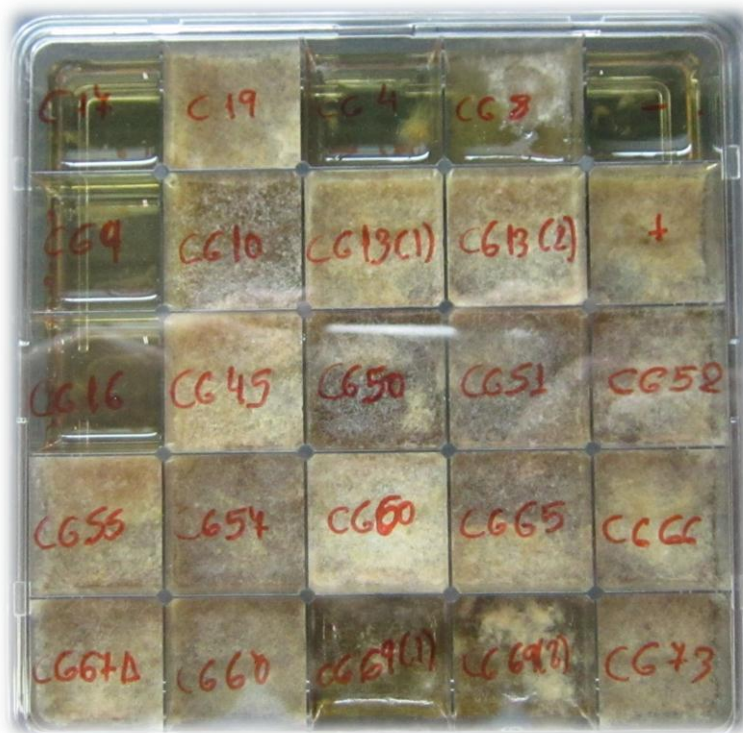


Figura 21. Segundo test de bioactividad con *R. solani*.

De los 31 sobrenadantes de metabolitos probados podemos concluir que los producidos por las cepas C17, CG4, CG9, CG16, CG69(1) y CG69(2) producen inhibición en el hongo *Rhizotocnia solani* (ver Fig. 22).

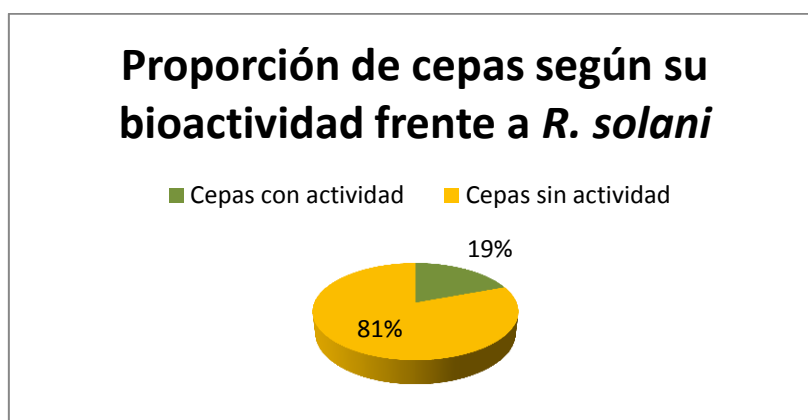


Figura 227. Proporción de cepas según su bioactividad frente a *R. solani*.

➤ Bioactividad de metabolitos frente a *Fusarium oxysporum*:

*Fusarium oxysporum* presentó una velocidad de crecimiento superior a *R. solani* y más problemas en lo referente al control negativo. La concentración original de Cicloheximida resultó ser insuficiente para generar un buen control negativo como pudo apreciarse en los primeros experimentos.

En el primer test de bioactividad con *F. oxysporum* pudo observarse inhibición del crecimiento en aquellas celdas en las que se inocularon los metabolitos de las cepas C17, CG4, CG8 y CG16 (ver Fig. 23)



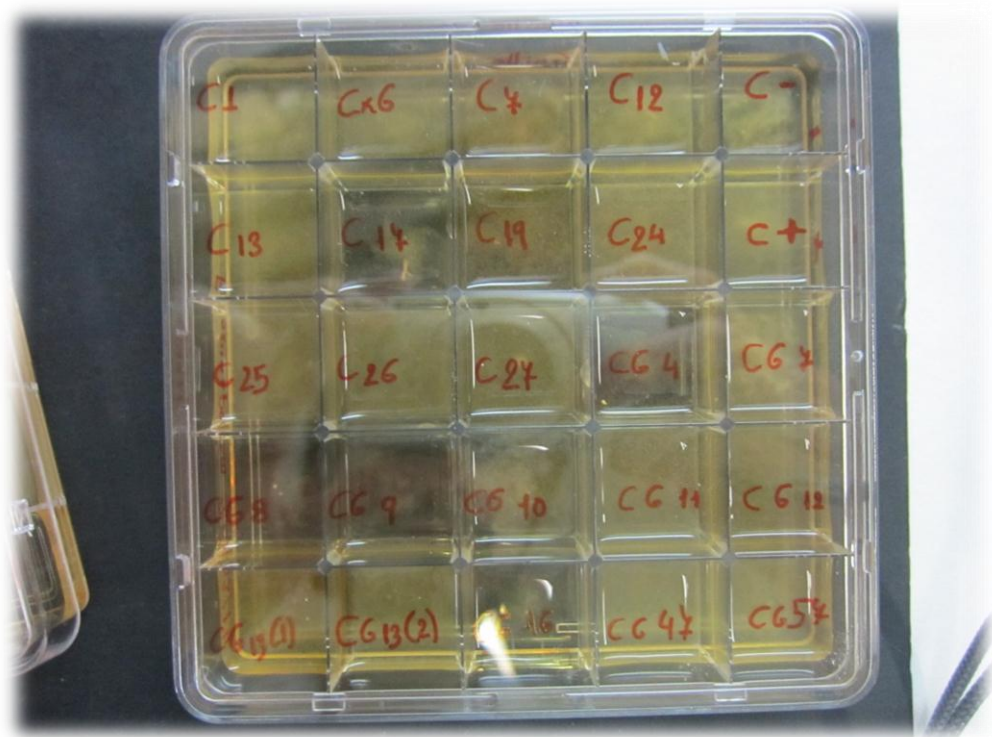


Figura 83. Test de bioactividad frente a *F. oxysporum*.

Se realizó un segundo experimento con los metabolitos de células que no pudieron probarse en el anterior y con aquellos en los que si se había podido apreciar inhibición para poder confirmarla.

No se produjo ningún nuevo resultado de inhibición entre los nuevos metabolitos probados pero si la confirmación como inhibidores los metabolitos de las cepas C17, CG4, CG8, CG9 y CG16 (ver Fig. 24).

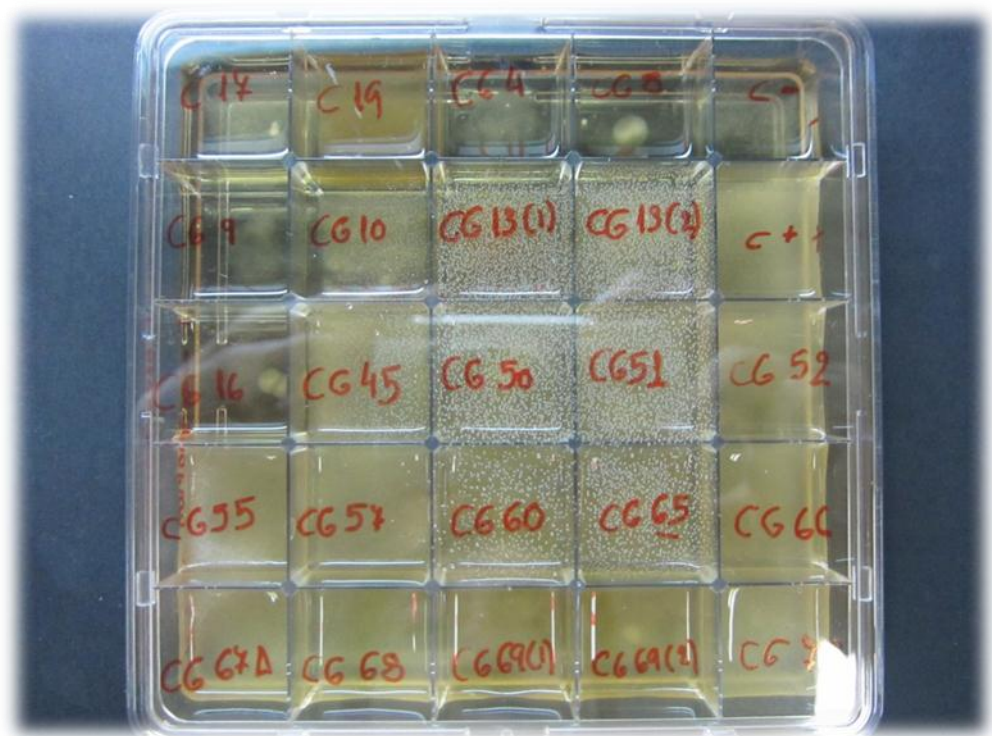


Figura 94. Segundo test de bioactividad frente a *F. oxysporum*.

De los 31 sobrenadantes con metabolitos probados en este experimento se observó inhibición en los procedentes de las cepas C17, CG4, CG8, CG9 y CG16 (ver Fig. 25).

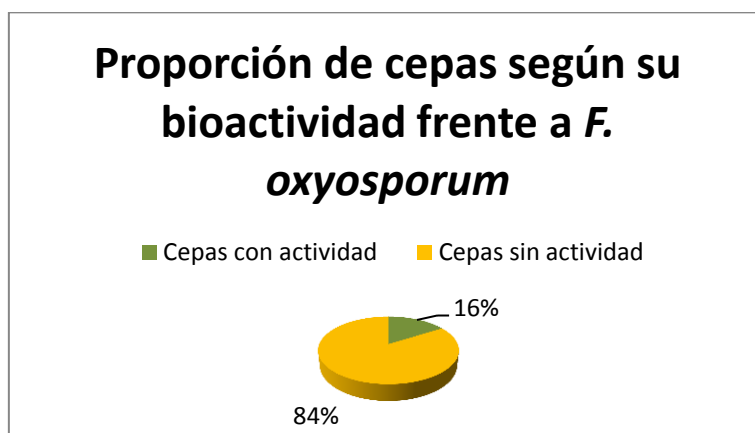


Figura 105. Proporción de cepas según su bioactividad frente a *F. oxysporum*.

En definitiva de los 31 sobrenadantes utilizados en los test de bioactividad los metabolitos de las cepas C17, CG4, CG8, CG9 y CG16 presentaron actividad anti-fúngica en ambos hongos. Los metabolitos de la cepa CG10 solo presentaron inhibición para *Fusarium oxysporum* y los metabolitos de las cepas CG69(1) y CG69(2) presentaron inhibición únicamente para *Rhizotocnia solani* (ver Fig. 26).

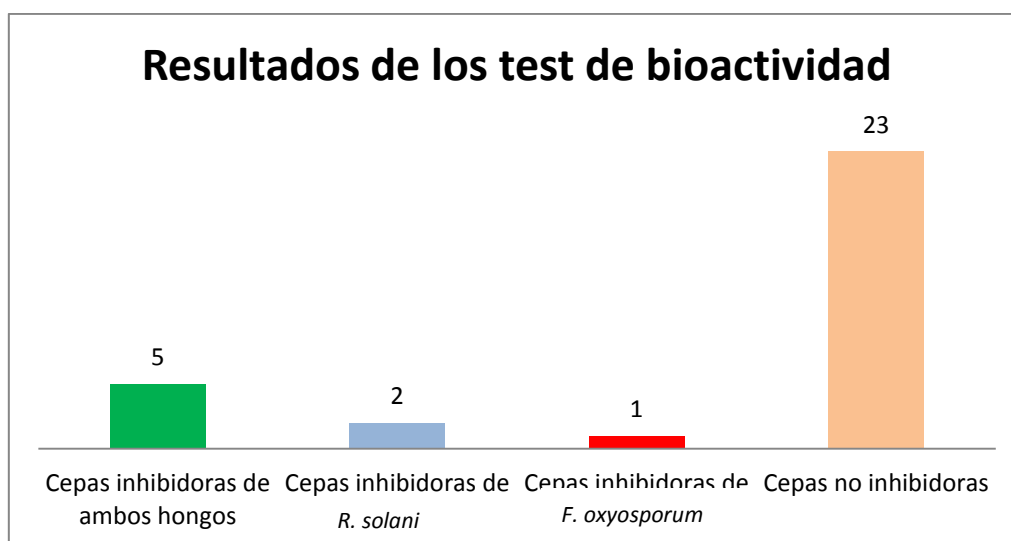


Figura 116. Resultados de los test de bioactividad.

Estos de resultados podrían confirmar la tesis de que son las Actinobacterias las causantes de la inhibición de hongos durante la aplicación del compost estudiado tal y como describen diversos autores (Crawford *et al.*, 1993; El-Tarabily, 1997; El-Tarabily & Soliman, 2000).

#### 4.5. Obtención del ADN Genómico

Se sembraron las 8 cepas que mostraron algún tipo de inhibición: C17, CG4, CG8, CG9, CG10, CG16, CG69(1) y CG69(2) y se recogieron células por duplicado antes de

que las cepas empezaran a esporular. Este material biológico fue extraído y purificado mediante el kit de SIGMA y el resultado fueron 8 tubos Eppendorf, cada uno con el ADN de una de las cepas.

#### **4.6. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa por duplicado sobre las 8 muestras de ADN a fin de obtener el gen 16S de cada una de las muestras en dos bandas.

#### **4.7. Electroforesis.**

La electroforesis se utilizó para determinar si la PCR había resultado exitosa.

La muestra CG10 presentó una iluminación intensa al ser expuesta a la luz ultravioleta tanto en la primera como en la segunda electroforesis.

Las muestras CG4, CG8, CG9 y CG16 presentaron un brillo moderado a la exposición con luz ultravioleta, siendo mayor la intensidad en la primera electroforesis realizada que en la segunda.

Las muestras CG69(1) y CG69(2) presentaron un brillo tenue en la primera electroforesis realizada pero en la segunda la CG69(1) no presentó ningún tipo de brillo y la CG69(2) un brillo tan tenue que debió ser descartado.

La muestra CG17 no presentó ningún tipo de respuesta lumínica en ninguna de las 4 electroforesis en las que se utilizó, imposibilitando de toda manera la secuenciación de dicha cepa.

#### **4.8. Purificación de bandas.**

La purificación de las bandas de CG4, CG8, CG9, CG10 y CG16 se realizó con el sistema de purificación de *Quiagen*. Se obtuvieron las bandas purificadas sin ningún problema.

#### **4.9. Cuantificación**

La cuantificación permitió conocer la cantidad de material genético de cada muestra, previamente a la realización de la secuenciación a fin de conocer cuánta cantidad de material genético de las bandas debíamos incluir en las muestras.

Tras la exposición a luz ultravioleta la muestra CG10 presentó un brillo moderado en relación con el plásmido de 100ng así que se optó por utilizar para la secuenciación 3µL de ADN junto con 2µL de agua Mili-Q.

Las muestras CG4, CG8, CG9 y CG16 presentaron un brillo demasiado tenue así que se utilizaron 5µL de ADN y nada de agua Mili-Q.

#### 4.10. Revisión de las secuencias genéticas obtenidas.

Como resultado de la secuenciación obtuvimos la secuencia de bases del genoma del gen 16S de cada muestra. Este genoma fue llevado a la base de datos de secuencias genéticas EzTaxon a fin de identificar las especies de nuestras cepas.

El resultado obtenido es la especie con la que presenta mayor similitud en lo referente a la secuencia genética del gen 16S y el tanto por ciento de esta similitud (ver tabla 3).

Cepa	Especie próxima genéticamente	Cepa de referencia	% de similitud	Nº de pares de bases
CG10	<i>Amycolatopsis jiangsuensis</i>	KLBM 1262 <sup>1</sup>	95.4%	450
CG4	<i>Saccharomonospora halophila</i>	8 <sup>1</sup>	95.5%	446
CG8	<i>Saccharomonospora halophila</i>	8 <sup>1</sup>	95.5%	451
CG9	<i>Saccharomonospora halophila</i>	8 <sup>1</sup>	95.5%	448
CG16	<i>Saccharomonospora halophila</i>	8 <sup>1</sup>	95.5%	448

Tabla 3. Tabla de cercanías genéticas más próximas.

Al tratarse de cepas con una relación inferior al 99% podemos establecer que se trata de nuevas especies. Incluso, el hecho de que la relación sea menor del 97% indica que podría tratarse de un género nuevo aun sin identificar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se secuenció solo una parte del genoma de las cepas, la relativa al gen 16S, y se necesitarían estudios de comparación del genoma completo para poder establecer una conclusión firme. Además se necesitaría acompañar estos resultados genéticos con estudios morfológicos más profundos.

Lo que no ofrece ninguna duda es el hecho de que las cepas encontradas pertenecen a especies singulares. Los géneros *Amycolatopsis* y *Saccharomonospora* son géneros de relativa moderna descripción sobre los que se han publicado recientemente un buen número de estudios debido a sus potenciales aplicaciones industriales (Al-Zarban *et al.*, 2002; Albarracín *et al.*, 2008; Dávila Costa & Amoroso, 2014; Fleige *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2013).

## 5. CONCLUSIÓN

---

Los aislamientos permitieron comprobar la existencia de diversas Actinobacterias en las muestras de compost y los test de bioactividad demostraron que algunas de esas Actinobacterias producían metabolitos generadores de inhibición de hongos. Aunque para establecer que la inhibición de los hongos es consecuencia directa de los metabolitos de las Actinobacterias aisladas habría que realizar experimentos más complejos en los que se pudiera evaluar la interacción entre las distintas comunidades microbianas, con los resultados de nuestro estudio podemos asegurar que existe una producción de metabolitos con actividad anti-fúngica por parte de las comunidades bacterianas presentes y que, esta actividad biológica, podría ser uno de los parámetros responsables del mejor crecimiento de cultivos abonados con el compost, tal y como establecen Morales-Corts *et al.* (2014).

Lo que no deja lugar a dudas es que, con el aumento en las prohibiciones de los fertilizantes sintéticos por los problemas ambientales que han venido ocasionando desde su introducción, el desarrollo de diversos compost para su uso agrícola cobra mayor importancia cada día, tanto por sus ventajas ambientales como por los posibles efectos biológicos, como en el caso del experimento realizado con la presencia en él de metabolitos con actividad frente a patógenos de los cultivos.

La identificación de especies cercanas a géneros relativamente recientes como son *Amycolatopsis* y *Saccharomonospora* pone de manifiesto la escasez pasada de estudios acerca de este proceso. Así mismo, la presencia de un número tan elevado de publicaciones científicas recientes (gran parte de las publicaciones de este trabajo pertenecen a la última década) explican el creciente interés industrial que está tomando hoy en día el compost.

El compostaje, al tratarse de un proceso fuertemente condicionado por las comunidades microbianas, exige un mayor esfuerzo en lo referente al estudio de las poblaciones de microorganismos presentes en él, a fin de establecer un mejor conocimiento acerca de qué especies son las que producen los efectos beneficiosos sobre el cultivo y poder optimizar el producto final.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

Al-Zarban, S. S., Al-Musallam, A. A., Abbas, I., Stackebrandt, E. & Kroppenstedt, R. M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *IJSEM* (2002), **52**, 555-558.

Albarracín, V. H., Winik, B., Kothe, E., Amoroso, M. J. & Abate, C. M. (2008) Copper bioaccumulation by the actinobacterium *Amycolatopsis* sp. AB0. *J Basic Microbiol* **48**:323–330

Alonso, P. (2010). *Distribución, caracterización e importancia ecológica de Micromonospora en nódulos fijadores de nitrógeno de Lupinus*. Tesis académica de la Universidad de Salamanca. Salamanca.

Álvarez, A., Benimeli, C. S., Sáez, J. M., Fuentes, M. S., Cuzzo, S. A., Polti, M. A. & Amoroso, M. J. (2012) Bacterial bio-resources for remediation of hexachlorocyclohexane. *Int J Mol Sci* **13**:15086–15106

Atlas, M.R. & Bartha, R. (2008). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Education, D.L. 4a ed. Pág.: 467-473.

Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., Arrigo, N. and Palma, R.M. (2003) Chemical and microbiological parameters for the characterisation of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biol Fertil Soils* **37**, 184–189.

Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins, cop. 787 p.

Cai, Z., Chen, Q., Wang, H., He, Y., Wang, W., Zhao, X. & Ye, Q. (2012) Degradation of the novel herbicide ZJ0273 by *Amycolatopsis* sp. M3-1 isolated from soil. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**:1371–1379

Carreño, A. J., Blanco, J. O. & Villegas, B. (2006). Selección de hongos biocontroladores de *Phytophthora cactorum*, agente causal de la pudrición radical y de corona en manzano. *Agron*, **14**(1): 89-96.

Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M. & Ousley, M. A. (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonist of a fungal Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3899-905.

Cross, t & Goodfellow, M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. In *Actinomycetales, Characteristics and Practical Importance*, pp 11-112. Edited by G. Sykes & F. A. Skinner. London: Academic Press Inc.

Dávila Costa, J. S. & Amoroso, M. J. (2014). Current biotechnological applications of the genus *Amycolatopsis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Feb; **30**(7): 1919-26. Doi 10.1007/s11274-014-1622-3.

- De Granada, E. G., De Amézquita, M. O., Bautista, G. R. & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum*. El hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 6 No. 1, 2001. Pp. 7-24.
- Díaz, L. F., Savage, G. M. Eggerth, L. L. & Goleuke, C.G. (1993). *Composting and Recycling: Municipal Solid Waste*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Eiland, F., Klamer, M., Lind, A., Leth, M. and Bååth, E. (2001) Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. *Microb Ecol* **41**, 272–280.
- Eklind, Y., Salomonsson, L., Wivstad, M. and Ramert, B. (1998) Use of herbage compost as horticultural substrate and source of plant nutrients. *Biol Agric Hortic* **16**, 269–290.
- El-Tarabily, K. (1997). The potencial for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol* **137**, 495-507.
- El-Tarabily, K. & Soliman, M. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol* **49**, 573.
- Epstein, E., Wilson, G. B. Burge, W. D. Mullen, D. C. & Enkiri, N. K. (1973). A forced aeration system form composting wasterwater sludge. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **48**: 655-694.
- Fernández, C. R. (2005). *Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de Lupinus angustifolius*. Trabajo de Grado. Departamento de Microbiología y genética. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Finstein, M.S. and Morris, L.M. (1975) Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 113–151.
- Fleige, C., Hansen, G., Kroll, J. & Steinbüchel, A. (2013) Investigation of the *Amycolatopsis* sp. strain ATCC 39116 vanillin dehydrogenase and its impact on the biotechnical production of vanillin. *Appl Environ Microbiol* **79**:81–90
- Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **37**, 189–216.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1984). HV agar, a new selective medium for the isolation of soil actinomycetes. *Abstracts of Papers Presented at the Annual Meeting of the Actinomycetologists held in Osaka, Japan (Japanese)*, p. 6.
- Herrmann, R. F. and Shann, J. F. (1997) Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microb Ecol* **33**, 78–85.

- Hoitink, H.A.J. and Boehm, M.J. (1999) Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu Rev Phytopathol* **37**, 427–446.
- Jager, G. & Velvis, H. (1988). Inactivation of sclerotia of *Rhizoctonia solani* on potato tubers by *Verticillium biguttatum*, a soil-borne mycoparasite. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Volume **94**, Issue 5, pp 225-231.
- Jakobsen, S.T. (1995) Aerobic decomposition of organic wastes 2. Value of compost as fertilizer. *Resour Conserv Recycl* **13**, 57–71.
- Jensen, P. R. & Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria, ecological perspectives. *Ann Rev microbiol* **48**, 559-84.
- Jiang, C. L. & Xu, L. H. (1996). Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 249-53.
- Kim, S. B., Yoon, J. H., Kim, H., Lee, S. T., Park, Y. H. & Goodfellow, M. (1995). A Phylogenetic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Conducted with 16s rRNA Gene Sequences. *IJSEM*. 1995 Apr; **45**(2): 351-6.
- Lechevalier, M. P., Prauser, H., Labeda, D. P. & Ruan, S. (1986) Two New Genera of Nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. doi: 10.1099/00207713-36-1-29 *IJSEM* January 1986 vol. **36** no. 1 29-37.
- Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. & Borders, D. B. (1987). Calicheimicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calicheimicin (gamma 1I). *J Am Chem Soc* **109**, 3464-6.
- Leiva, S., Yáñez, M. & Zaror, L. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Med Chile* **132**, 151-9.
- Maiese, W. M., Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A., Korshalla, J., Kuck, N., Fantini, A., Wildey, M. J., Thomas, J. & Greenstein, M. (1989). Calicheimicins, a novel family of antitumor antibiotics, taxonomy, fermentation and biological properties. *J Antibiot* (Tokyo) **42**, 558-63.
- Mandigan, M. T. (2009) *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson-Addison Wesley, D. L. 1259 p.
- Morales-Corts, M. R., Gómez-Sánchez, M. A. & Pérez-Sanchez, R. (2014). Evaluation of green/pruning wastes compost and vermicompost, slungum compost and their mixes as growing media from horticultural production. *Scientia Horticulturae*. Vol. **172**, 9 June 2014, pp 155-160.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.



- Nonomura, H & Ohara, Y. (1971). Distribution of actinomycetes in soil. XI. Some new species of the genus *Actinomadura* Lechevalier *et al.* *J Ferment Technol* **49**, 904-912.
- Odlare, M. (2005) Organic residues – a resource for arable soils. Doctoral thesis, p. 51. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Palmisano, A. C & Barlaz, M. A. (eds) (1996). *Microbiology of Solid Waste*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Perucci, P. (1990) Effect of the addition of municipal solid-waste compost on microbial biomass and enzyme-activities in soil. *Biol Fertil Soils* **10**, 221–226.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H. and Swings, J. (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol* **53**, 349–410.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J*, **61**, 629, 1955.
- Tiquia, S. M. (2005). Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J Appl Microbiol* **99**, 816–828.
- Tuset, J. J., Hinarejos, C. & Mira, J. L. (2002). Podredumbre de los frutos del peral causada por *Phytophthora cactorum* en el área mediterránea española. *Bol San Veg Plagas*, **28**: 639-645.
- Upton, M. (1994). *Ecological approaches to selective isolation of Actinomycetes for bioactivity screening*. Department of microbiology, The Medical School, University of Newcastle upon Tyne for the Degree of Doctor of Philosophy. November, 1994. 24-38.
- Wang, C., Guo, X., Deng, H., Dong, D., Tu, Q. & Wu, W. (2014) New insights into the structure and dynamics of actinomycetal community during manure composting. *Appl Microbiol and Biotechnol*. April 2014, Vol. **98**, Issue 7, pp 3327-3337
- Wickerham, L. J. (1951). Taxonomy of yeasts. *U.S. Dept. Agric. Tech. Bull.* **1029**, 1-56.
- Williams, S. T., Lanning, S & Wellington, E. M. H. (1983). Ecology of Actinomycetes. In *The biology of actinomycetes*, pp. 481-528. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarsdi & S. T. Williams. London: Academic Press Inc.
- Xing, K., Liu, W., Zhang, Y. J., Bian, G. K., Zhang, W. D., Tamura, T., Lee, J. S., Qin, S., & Jiang, J. H. (2013) *Amycolatopsis jiangsuensis* sp. Nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal plant in Jiangsu, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013 Feb; **103**(2): 433-9 doi: 10.1007/s10482-012-9823-y.

# 7. ANEXO

## 7.1. Inventario de aislamientos (tablas 4 y 5):

Código	Temperatura de incubación	Fecha del aislamiento	Muestra de procedencia	Medio del que se aisló	Dilución 10 <sup>X</sup>	Estado
CG1	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	Contaminado por hongo
CG2	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	No creció nada
CG3	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	No creció nada
CG4	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG5	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	Contaminado por <i>Bacillus</i>
CG6	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	No creció nada
CG7	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG8	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG9	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG10	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG11	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG12	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG13	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	Aparecieron 2 cepas distintas
CG13(1)	28		Compost			En glicerol
CG13(2)	28		Compost			En glicerol
CG14	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	No creció nada
CG15	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	Contaminado
CG16	28	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG17	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG18	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG19	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG20	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG21	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG22	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG23	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG24	45	27/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG25	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG26	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG27	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG28	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG29	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG30	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG31	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG32	45	29/11/2013	Compost	HA	-3	En glicerol
CG33	45	29/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG34	45	29/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG35	45	29/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG36	45	29/11/2013	Compost	ISP2	-3	En glicerol
CG37	45	29/11/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG38	45	29/11/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG39	45	29/11/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG40	45	04/12/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG41	45	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG42	45	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG43	45	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG44	45	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG45	28	04/12/2013	Compost	ISP2	-4	En glicerol
CG46	28	04/12/2013	Compost	ISP2	-4	En glicerol
CG47	28	04/12/2013	Compost	ISP2	-4	No salieron actinos
CG48	28	04/12/2013	Compost	ISP2	-4	Contaminado
CG49	28	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG50	28	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG51	28	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol
CG52	28	04/12/2013	Compost	C.	-4	En glicerol

CG53	28	11/12/2013	Extracto	ISP2	-1	Contaminado
CG54	28	11/12/2013	Extracto	ISP2	-1	No salieron actinos
CG55	28	11/12/2013	Extracto	ISP2	-1	En glicerol
CG56	28	11/12/2013	Extracto	ISP2	-1	No salieron actinos
CG57	28	11/12/2013	Extracto	HA	-1	En glicerol
CG58	28	11/12/2013	Extracto	HA	-1	No salieron actinos
CG59	28	11/12/2013	Extracto	HA	-1	No salieron actinos
CG60	28	11/12/2013	Extracto	HA	-1	En glicerol
CG61	45	11/12/2013	Extracto	HA	-1	No se pudo extraer
CG62	45	11/12/2013	Extracto	HA	-1	No se pudo extraer
CG63	45	11/12/2013	Compost	ISP2	-4	No se pudo extraer
CG64	45	11/12/2013	Compost	ISP2	-4	En glicerol
CG65	28	11/12/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG66	28	11/12/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG67	28	11/12/2013	Compost	HA	-4	Aparecieron 3 cepas distintas
CG67(A)				HA		En glicerol
CG67(B)				HA		En glicerol
CG67(C)				HA		En glicerol
CG68	28	11/12/2013	Compost	HA	-4	En glicerol
CG69	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	Aparecieron 2 cepas distintas
CG69(1)	28			ISP2		En glicerol
CG69(2)	28			ISP2		En glicerol
CG70	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	Contaminación
CG71	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	No salieron actinos
CG72	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	Contaminación
CG73	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	En glicerol
CG74	28	18/12/2013	Compost	C.	-4	Contaminación
CG75	28	18/12/2013	Compost	C.	-4	Contaminación
CG76	28	18/12/2013	Compost	ISP2	-4	No salieron actinos

**Tabla 4. Inventario de aislamientos**

Cepas iniciales ya aisladas:

Código	Temperatura de incubación	Fecha del asilamiento	Muestra de procedencia	Medio del que se asiló	Dilución 10 <sup>X</sup>	Estado
C1	28					En glicerol
Cx6	28					En glicerol
C7	28					En glicerol
C12	28					En glicerol
C13	28					En glicerol
C17	28					En glicerol
C19	28					En glicerol
C24	28					En glicerol
C25	28					En glicerol
C26	28					En glicerol
C27	28					En glicerol

**Tabla 5. Inventario de cepas iniciales**

## 7.2. Inventario fotográfico de las cepas

A continuación se muestran algunas de las cepas aisladas en cultivos puros (ver Fig. 27):

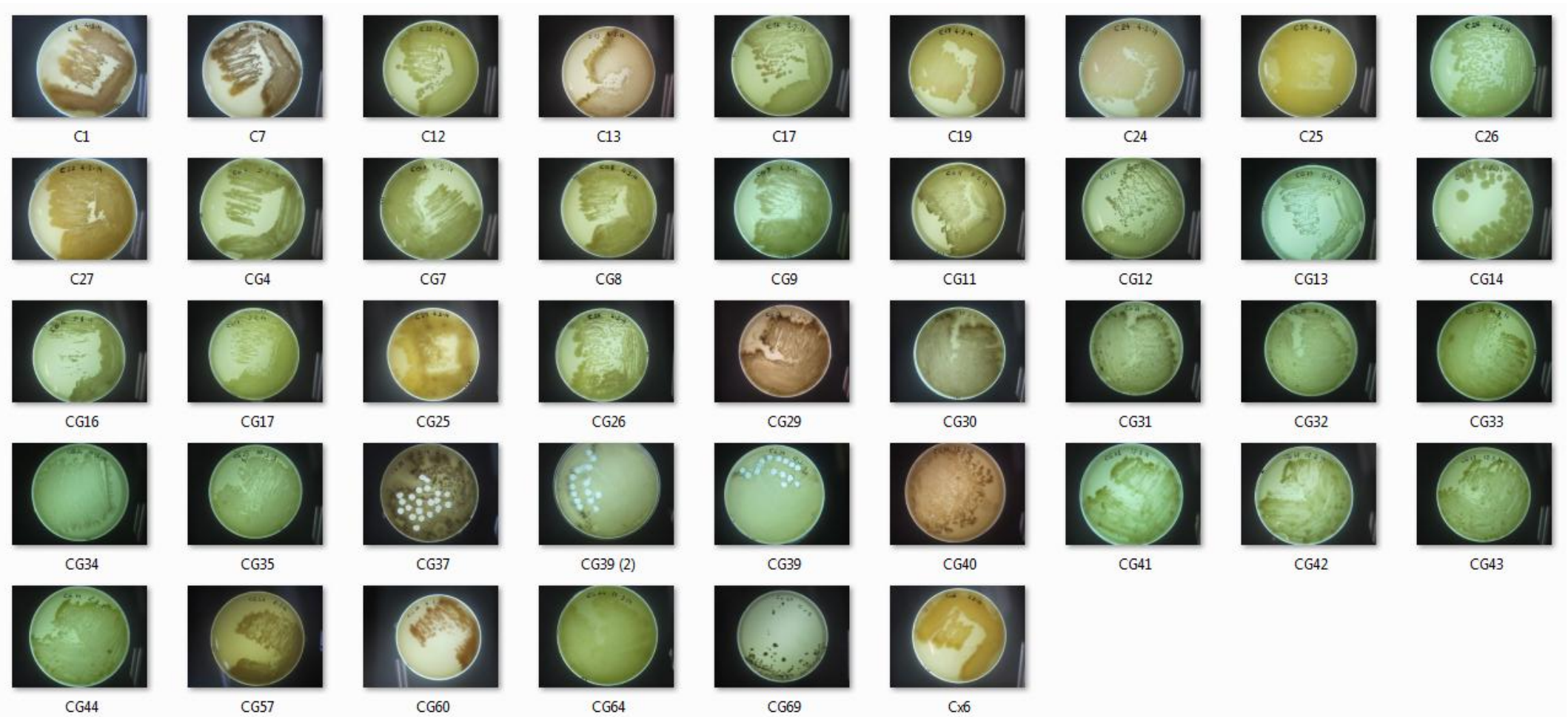


Figura 27. Inventario fotográfico de cepas aisladas