

Actinomyces saprofiticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*

MARIANA SOLANS[✉] & GERNOT VOBIS

Departamento de Botánica, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, ARGENTINA

RESUMEN. Se aislaron 122 cepas de actinomicetes de la rizósfera y rizoplano de la especie *Discaria trinervis* (Hook et Arn.) Reiche. Según criterios morfológicos, fueron agrupadas en seis géneros: *Streptomyces* (54 cepas), *Actinoplanes* (27), *Micromonospora* (20), *Actinomadura* (7), *Pilimelia* (4) y *Streptosporangium* (1), además de una categoría de organismos nocardioformas (9). La población de actinomicetes presentó variaciones en su cantidad y composición según sus dos orígenes. El 62.3% de las cepas fueron aisladas de la rizósfera, principalmente representantes de los géneros *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Pilimelia* y Nocardioformas. El 37.7% restante se encontró en el rizoplano y correspondió a los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura* y *Streptosporangium*. Las cepas de *Streptomyces* fueron distribuidas en igual cantidad en ambas zonas. En todas las cepas se estudió su capacidad de degradar varios biopolímeros. Solamente en 14 cepas no se registraron efectos de degradación de material de origen vegetal. El resto se estimaron como activas, en casos extremos con capacidad para descomponer hasta cinco sustratos diferentes. Un total de 68% de las cepas mostró actividad enzimática para degradar almidón, 65.6% pectina, 59% celulosa, 28.7% hemicelulosa, 3.3% queratina y 15.6% presentó una fuerte afinidad para usar preferiblemente lignina como sustrato. [Palabras clave: actinomicetes saprofiticos, actividad enzimática, rizósfera, rizoplano]

ABSTRACT. **Saprophytic actinomyces associated to the rhizosphere and rhizoplane of *Discaria trinervis*.** A total number of 122 strains of actinomyces were isolated from both rhizosphere and rhizoplane of the plant *Discaria trinervis* (Hook et Arn.) Reiche. By employing morphological criteria, the strains could be arranged into six genera: *Streptomyces* (54 strains), *Actinoplanes* (27), *Micromonospora* (20), *Actinomadura* (7), *Pilimelia* (4), and *Streptosporangium* (1), along with a category of nocardioform organisms (9). The actinomyces population varied in number and composition according to the two different sources. Most of the strains (62.3%) were isolated from the rhizosphere, predominantly belonging to *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Pilimelia*, and nocardioforms. The remaining 37.7% derived from the rhizoplane, belonging to *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, and *Streptosporangium*. Strains of the genus *Streptomyces* were distributed in equal numbers in both habitats. All isolates were examined concerning their ability to degrade various biopolymers. Only 14 strains were recorded without any effect to degrade plant material. The rest of the strains could be estimated as active, in extreme cases being able to decompose up to five different substrates. A total of 68% of strains showed enzymatic activity to degrade starch, 65.6% pectin, 59% cellulose, 28.7% hemicellulose, 3.3% keratin, and 15.6% had strong affinities to use lignin as a preferable substrate. [Keywords: saprophytic actinomyces, enzymatic activity, rhizosphere, rhizoplane]

✉ Dpto. de Botánica, Centro Regional Universitario Bariloche, Univ. Nac. del Comahue, Quintral 1250, 8400 S. C. de Bariloche, Río Negro, ARGENTINA. msolans@crub.uncoma.edu.ar

Recibido: 30 julio 2002; Revisado: 9 diciembre 2002
Aceptado: 5 febrero 2003

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetes se encuentran frecuentemente en el suelo y constituyen un componente sustancial de la microbiota, registrándose hasta más de un millón (10^4 - 10^8) de "unidades formadoras de colonias" en un gramo de tierra fértil (McCarthy & Williams 1992; Khan et al. 2000). Como muchos otros organismos del suelo, son aeróbicos, heterótrofos y saprófitos; la mayoría tiene un máximo crecimiento entre 25-30 °C, aunque también se encuentran representantes termotolerantes y termofílicos. En general, se desarrollan a un pH de 5-9, con un óptimo cerca del neutro. Los actinomicetes saprófitos producen diversos tipos de enzimas extracelulares que degradan macromoléculas complejas (McCarthy 1989). Tanto los representantes mesofílicos como los termofílicos y termotolerantes son abundantes en residuos vegetales donde cumplen un papel importante en la descomposición de biopolímeros y recalcitrantes (Lechevalier 1981; McCarthy & Williams 1992). Entre los biopolímeros que degradan se encuentran el almidón, la celulosa, la hemicelulosa (celulosanas), la lignina, la lignocelulosa, la pectina, la queratina, el humus y la quitina. Al final del proceso de degradación de estos compuestos, los productos se encuentran nuevamente disponibles en el suelo (Vobis & Chaia 1998).

Discaria trinervis (Hook et Arn.) Reiche es una planta leñosa que pertenece a la familia Rhamnaceae. Esta especie arbustiva es nativa del centro de Chile y del norte de la región andinopatagónica en Argentina, y se encuentra frecuentemente en sitios pobres como costas pedregosas e inundadas y áreas perturbadas, pudiendo actuar como pionera en ecosistemas degradados (Tortosa 1983, 1989). *Discaria trinervis* forma nódulos radicales en simbiosis

con el actinomicete endófito del género *Frankia*, constituyendo la simbiosis actinorrílica caracterizada por la fijación del nitrógeno del aire. Otras interacciones entre los vegetales y los microorganismos existen en el suelo en contacto con las raíces (rizósfera y rizoplano); allí la microflora se encuentra bajo la influencia de los exudados radicales orgánicos y de restos de tejidos que favorecen su crecimiento (Frioni 1990, 1999). Los microorganismos de la rizósfera, incluyendo el rizoplano, difieren en composición y cantidad respecto a los del suelo libre de raíces (Marschner 1994). A su vez, los organismos estimulados actúan sobre la planta, poniendo a su disposición moléculas orgánicas que son absorbidas por las raíces, tales como aminoácidos, vitaminas, antibióticos y fitohormonas, contribuyendo a la nutrición mineral de las mismas por los procesos de mineralización y solubilización de ciertos elementos (Thuar et al. 1999).

Hasta ahora se desconocen cualitativamente los actinomicetes saprófitos que viven muy cerca de la zona de influencia del sistema radical de plantas actinorrílicas, aunque se han estudiado los actinomicetes de la rizósfera de plantas comercialmente útiles (Khan et al. 2000). Por este motivo, el objetivo de este trabajo es aislar e identificar las cepas que se encuentran en la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*, caracterizando las mismas por su capacidad fisiológica para degradar material biológico, en especial de origen vegetal, buscando una posible relación entre los tejidos radicales y la microbiota actinomicética asociada.

MÉTODOS

Se trabajó con la raíz principal, las raíces laterales y con el suelo circundante de una planta de *Discaria trinervis* de San Carlos de Bariloche, provincia de

Río Negro, Argentina. Las muestras se secaron a 36 °C en estufa para su conservación y posterior procesamiento. Se utilizó el rizoplano de raíces y el suelo de la rizósfera en diversas técnicas de aislamiento, realizándose un ensayo por cada técnica empleada.

Para aislar las cepas de actinomicetes se aplicaron cinco técnicas diferentes: (1) "diluciones sucesivas", utilizando 0.01 g de suelo rizosférico (Vobis 1992); (2) "distribución de partículas", usando 0.5 g de trozos de raíces y 0.5 g de suelo (Nonomura 1989); (3) "estampado", con 1 g de raíces y nódulos enteros (Hunter et al. 1984); (4) "cebos naturales", utilizando 0.1 g de suelo (Schäfer 1973); y (5) el método de "quimiotaxis", usando 2 g de suelo (Palleroni 1980). Las últimas dos técnicas de aislamiento se usaron en casos de organismos que poseen esporas con movimiento activo.

Se utilizaron cajas de Petri de 5 y 10 cm de diámetro conteniendo distintos medios de cultivos agarizados: medio artificial del suelo (KEHE) (Henssen & Schäfer 1971), agar con extracto de levadura y almidón (YpSs) (Emerson 1958), agar de almidón-caseína y sulfato (SCa) (Palleroni 1980) y agar de solución mineral con leche diluida y harina de cuerno (Ca/20HoSl) (Vobis 1992). El período de incubación fue de 3-4 semanas a 28-30 °C. Las cepas fueron conservadas en tubos de cultivo y depositadas en el herbario del Centro Regional Universitario Bariloche (BCRU).

Para la determinación taxonómica de las cepas al nivel de género, se usaron criterios morfológicos, en especial la formación y tipo de esporas, además de características culturales de las colonias tales como consistencia, tamaño, pigmentación y presencia o ausencia de micelio aéreo (Shirling & Gottlieb 1966; Cross 1989; Lechevalier 1989a; Vobis 1997). Las cepas fueron caracterizadas e identificadas según Shirling & Gottlieb

(1966), Williams et al. (1989) y Miyadoh et al. (1997, 2001).

Para estudiar la degradación de diferentes sustratos, cada cepa fue incubada durante 5-6 semanas a 28 °C en cajas de Petri con el medio KEHE en contacto con los distintos sustratos a probar. Se registró el crecimiento del micelio y se probó la resistencia mecánica del sustrato a la presión con una aguja fina. Finalmente, se realizó un control microscópico. En el caso de la celulosa, se colocó papel de filtro con un orificio central y se inoculó en el centro del mismo. La reacción azul-violeta con ClZnI indica la presencia de celulosa (D'Ambrogio de Argüeso 1986). Para la hemicelulosa (celulosanas) se usaron cortes transversales de 30 µm de espesor de semillas de *Phoenix dactylifera*, ya que las células del endosperma de este tipo de semilla poseen paredes celulares constituidas principalmente por celulosanas (Nultsch 1995). En el caso de la lignina, se utilizaron cortes de 60 µm de espesor de madera de acarreo flotante de *Nothofagus* sp. La reacción roja-violeta con floroglucina/HCl indica la presencia de lignina (Nultsch 1995). Para la pectina se usaron trozos (1 x 2 cm) de hojas secas de *Trisetum* sp. Se determinó la variación de la resistencia. Se utilizó la modificación de la estructura de pelos de ratones blancos como indicadores de actividad enzimática sobre la queratina (Vobis 1992). Para detectar la degradación del almidón se utilizó el medio YpSs, inoculando en el centro. La reacción violeta con solución de lugol indica la presencia de almidón y un halo transparente indica su ausencia (Weber et al. 1998).

Las observaciones se realizaron con un microscopio estereoscópico Olympus SZH con equipo de transiluminación y un microscopio óptico Olympus BH2 con una cámara fotográfica reflex Olympus OM 10. Las colonias se investigaron con la técnica de microscopía directa (Cross

1989) o coloreando las hifas y esporas con fucsina ácida (D'Ambrogio de Argüeso 1986) o con azul de algodón (Gams et al. 1980).

RESULTADOS

Cepas aisladas

Mediante la aplicación de las diferentes técnicas de aislamiento, se obtuvo un total de 122 cepas. Las mismas fueron agrupadas en seis géneros: *Actinomadura* (7 cepas), *Actinoplanes* (27), *Micromonospora* (20), *Pilimelia* (4), *Streptomyces* (54) y *Streptosporangium* (1), mientras que las 9 cepas restantes, con caracteres semejantes a los del género *Nocardia*, fueron agrupadas bajo la denominación Nocardioformas (Tabla 1). El método de aislamiento más exitoso numéricamente fue el de diluciones sucesivas, con un total de 37 cepas: *Streptomyces* (31), Nocardioformas (4) y *Micromonospora* (2). Con la técnica de estampado se obtuvieron 35 cepas con *Streptomyces* (21) y *Micromonospora* (14). Con el método de quimiotaxis se obtuvo un total de 27 cepas: *Actinoplanes* (26) y *Micromonospora* (1), mientras que con la técnica de distribución de partículas se obtuvo un total de 15 cepas: *Actinomadura* (7), Nocardioformas (4), *Micromonospora* (3) y *Streptosporangium* (1). Por el método de cebos naturales se pudo aislar un total de 8 cepas: *Pilimelia* (4), *Streptomyces* (2), *Actinoplanes* (1) y Nocardioformas (1).

Se aislaron 76 cepas de la rizósfera y 46 del rizoplano (Tabla 1). El género *Streptomyces* presentó el mayor porcentaje en ambas zonas, con 43.4% y 45.6%, respectivamente. Las cepas de *Actinoplanes*, *Pilimelia*, *Micromonospora* y Nocardioformas se encontraron principalmente en la rizósfera. En el rizoplano se hallaron las cepas de los géneros *Actinomadura*, *Micromonospora* y *Streptosporangium*. Fue notable el elevado porcentaje de cepas del género

Actinoplanes en la rizósfera (35.5%) y de *Micromonospora* en el rizoplano (36.9%) (Figura 1).

Degradación del material biológico

La mayoría de las cepas (108) presentó capacidad para atacar diferentes sustratos de origen vegetal: almidón (como sustancia principal de reserva), y celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (como distintos componentes de las paredes celulares). Cada cepa presentó diferentes actividades enzimáticas (Tabla 1). La queratina, como material biológico de origen animal, fue degradada solo por las cuatro cepas del género *Pilimelia*, produciendo la destrucción de la estructura del pelo (Figura 2b); estas cepas no atacaron biopolímeros vegetales.

En el caso de la degradación del almidón, se pudo observar la presencia de halos transparentes de disitintos tamaños alrededor de las colonias (Figura 2a). La mayoría de las cepas capaces de degradar

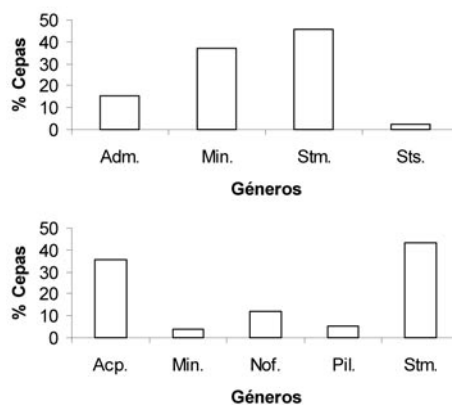


Figura 1. Distribución de frecuencias de los géneros de actinomicetes presentes en rizoplano (arriba) y rizósfera (abajo) de *Discaria trinervis*. Los códigos de los taxa son los mismos que en la Tabla 1.

Figure 1. Frequency distribution of actinomycetes genera present in rhizoplane (above) and rhizosphere (below) of *Discaria trinervis*. Taxa codes are the same as in Table 1.

Tabla 1. Ubicación taxonómica, método de aislamiento, origen y capacidad de degradación de diferentes sustratos, de cepas de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. Stm: *Streptomyces*; Min: *Micromonospora*; Nof: Nocardioformas; Adm: *Actinomadura*; Sts: *Streptosporangium*; Acp: *Actinoplanes*; Pil: *Pilimelia*; A: almidón; C: celulosa; H: hemicelulosa; P: pectina; L: lignina; Q: queratina; +: degradación positiva; -: degradación negativa; s/d: sin datos confiables.

Table 1. Taxonomic affiliation, isolation method, source, and capacity of degradation of various substrates, for actinomycetes strains isolated from rhizosphere and rhizoplane of *Discaria trinervis*. See taxa codes in the legend above. A: starch; C: cellulose; H: hemicellulose; P: pectin; L: lignin; Q: keratin; +: positive degradation; -: negative degradation; s/d: no reliable data.

BCRU Cepa N°	Ubicación taxonómica	Método de aislamiento	Origen	A	C	H	P	L	Q
MM1	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	+	-	-
MM2	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	?	?	?	-
MM3	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM4	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	-	?	-
MM5	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	-	-	-
MM6	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM7	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM8	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM9	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM10	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM11	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM12	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM13	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM14	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	+	+	-	-
MM16	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-
MM18	Min	diluciones	rizósfera	+	+	+	+	-	-
MM19	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	?	?	-
MM20	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	+	-	-
MM21	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	?	?	-
MM22	Stm	diluciones	rizósfera	-	-	-	-	-	-
MM23	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	+	-	-
MM24	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	-	-	-
MM25	Stm	diluciones	rizósfera	-	+	-	-	-	-
MM26	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM27	Stm	estampado	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM28	Stm	estampado	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM29	Stm	estampado	rizoplano	-	-	-	+	-	-
MM30	Stm	estampado	rizoplano	-	-	-	-	-	-
MM31	Stm	estampado	rizoplano	+	+	-	+	-	-
MM32	Stm	estampado	rizoplano	-	+	-	+	-	-
MM33	Stm	estampado	rizoplano	+	-	-	+	-	-
MM34	Stm	estampado	rizoplano	+	+	-	+	-	-
MM35	Stm	estampado	rizoplano	-	+	?	?	?	-
MM36	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	?	?	-
MM37	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM38	Stm	diluciones	rizósfera	-	+	+	+	-	-
MM39	Nof	diluciones	rizósfera	-	-	?	?	?	-
MM40	Stm	estampado	rizoplano	+	+	+	+	+	-
MM41	Stm	estampado	rizoplano	-	+	+	+	-	-
MM42	Stm	estampado	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM43	Stm	estampado	rizoplano	-	-	+	+	+	-
MM44	Stm	estampado	rizoplano	+	-	+	+	-	-
MM45	Stm	estampado	rizoplano	-	-	?	?	?	-
MM46	Stm	estampado	rizoplano	+	-	+	+	-	-
MM47	Min	estampado	rizoplano	-	+	?	+	-	-
MM48	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM49	Stm	estampado	rizoplano	-	-	+	+	-	-
MM50	Stm	estampado	rizoplano	+	-	?	+	-	-
MM51	Stm	estampado	rizoplano	+	+	-	+	-	-
MM52	Stm	estampado	rizoplano	+	+	?	+	?	-
MM53	Stm	estampado	rizoplano	+	-	+	-	-	-
MM54	Stm	diluciones	rizósfera	-	+	-	s/d	-	-
MM55	Stm	diluciones	rizósfera	-	+	+	-	-	-
MM56	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	+	+	-	-
MM57	Nof	diluciones	rizósfera	+	-	?	?	?	-

Tabla 1. Continuación.

Table 1. Continued.

BCRU Cepa N°	Ubicación taxonómica	Método de aislamiento	Origen	A	C	H	P	L	Q
MM58	Stm	diluciones	rizósfera	+	-	-	+	-	-
MM59	Nof	diluciones	rizósfera	-	-	-	-	-	-
MM60	Nof	diluciones	rizósfera	-	-	-	-	+	-
MM61	Min	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM62	Min	estampado	rizoplano	?	?	-	+	-	-
MM63	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM64	Min	estampado	rizoplano	+	+	-	+	-	-
MM65	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM66	Min	estampado	rizoplano	+	-	+	+	-	-
MM67	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM68	Min	estampado	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM69	Min	estampado	rizoplano	+	-	-	+	-	-
MM70	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM71	Stm	diluciones	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM72	Min	estampado	rizoplano	+	+	?	+	-	-
MM73	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM74	Min	estampado	rizoplano	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d	-
MM75	Min	quimiotaxis	rizósfera	+	-	+	+	-	-
MM76	Min	distribución	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM77	Min	distribución	rizoplano	+	+	-	+	-	-
MM78	Adm	distribución	rizoplano	-	+	-	-	+	-
MM79	Adm	distribución	rizoplano	-	+	-	+	-	-
MM80	Adm	distribución	rizoplano	-	+	+	+	-	-
MM81	Adm	distribución	rizoplano	-	-	-	+	+	-
MM82	Sts	distribución	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM83	Adm	distribución	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM84	Nof	distribución	rizósfera	-	+	-	-	-	-
MM85	Nof	distribución	rizósfera	-	+	+	+	-	-
MM86	Nof	distribución	rizósfera	+	+	-	+	-	-
MM87	Nof	distribución	rizósfera	-	+	+	+	-	-
MM88	Min	distribución	rizoplano	+	+	+	+	-	-
MM89	Adm	distribución	rizoplano	-	+	-	+	-	-
MM90	Adm	distribución	rizoplano	-	+	-	+	+	-
MM91	Stm	cebos	rizósfera	-	+	-	+	-	-
MM92	Stm	cebos	rizósfera	+	+	?	?	-	-
MM93	Nof	cebos	rizósfera	+	+	?	?	?	-
ME1	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME2	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME3	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME4	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME5	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME6	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME7	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME8	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME9	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME10	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME11	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	-	-
ME12	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME13	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME14	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME15	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	-	-
ME16	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME17	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	+	+	+	-
ME18	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME19	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	?	-
ME20	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	-	-	-
ME21	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME22	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME23	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME24	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME25	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	-	-
ME26	Acp	quimiotaxis	rizósfera	+	+	-	+	+	-
ME27	Acp	cebos	rizósfera	+	+	+	+	+	-
MK1	Pil	cebos	rizósfera	-	-	-	-	-	+
MK2	Pil	cebos	rizósfera	-	-	-	-	-	+
MK3	Pil	cebos	rizósfera	-	-	-	-	-	+
MK4	Pil	cebos	rizósfera	-	-	-	-	-	+

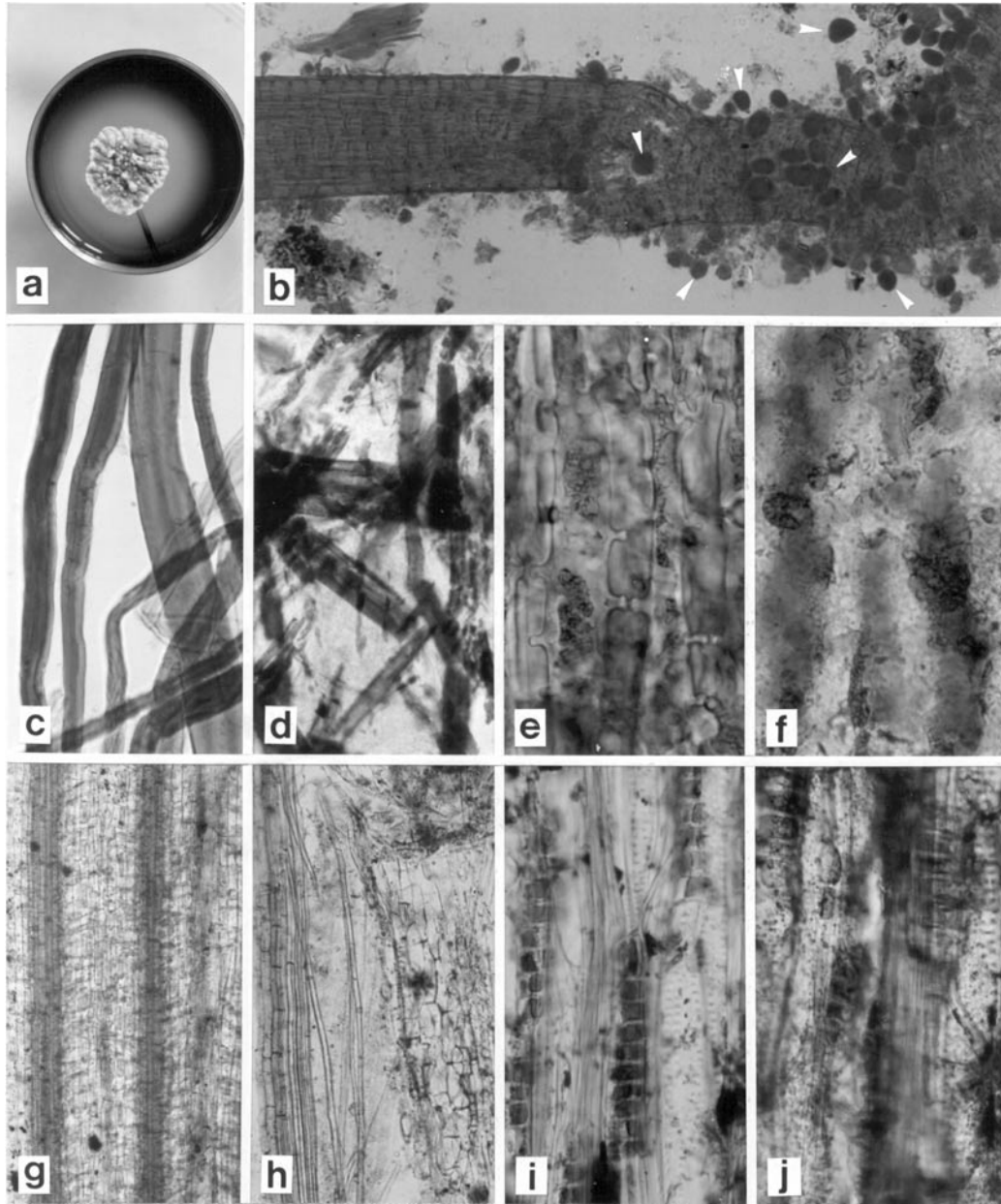


Figura 2. Efectos de la degradación de diferentes sustratos y estructuras biológicas por actinomycetes aislados de la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. (a) Halo claro alrededor de la colonia de *Streptomyces* MM8 indicando lisis del almidón. (b) Pelo colonizado por *Pilimelia* MK1; la parte derecha está destruida, con formación de esporangios (flechas) (360x). (c) Fibras de celulosa intactas (120x). (d) Fibras degradadas por *Streptomyces* MM27 (120x). (e) Paredes de células de endosperma compuestas por hemicelulosa (240x). (f) Paredes descompuestas por *Streptomyces* MM41 (240x). (g) Tejidos intactos de hoja herbácea (60x). (h) Laminillas pectinosas desintegradas por *Streptomyces* MM4 (60x). (i) Tejido leñoso en sección radial (120x). (j) Tejido leñoso densamente colonizado por *Actinoplanes* ME23 (120x).

Figure 2. Effects of degradation on various biological substrates and structures by actinomycetes strains isolated from rhizosphere and rhizoplane of *Discaria trinervis*. (a) Clear halo around the colony of *Streptomyces* MM8; indicating lysis of starch. (b) Hair colonized by *Pilimelia* MK1; the right part is destroyed and sporangia are developed (arrows) (360x). (c) Intact cellulose fibres (120x). (d) Fibres degraded by *Streptomyces* MM27 (120x). (e) Walls of endosperm cells composed by hemicellulose (240x). (f) Walls decomposed by *Streptomyces* MM41 (240x). (g) Intact tissues of grass leaf (60x). (h) Pectinous middle lamella disintegrated by *Streptomyces* MM4 (60x). (i) Wooden tissue in radial section (120x). (j) Wooden tissue densely colonized by *Actinoplanes* ME23 (120x).

dicho sustrato correspondió al género *Streptomyces* (con el 48.2%), seguido por las de los géneros *Actinoplanes* (32.5%), *Micromonospora* (13.3%), Nocardioformas (3.6%) y, por último, las cepas de los géneros *Actinomadura* y *Streptosporangium* (1.2%). *Streptomyces* es el único género en el que 11 cepas produjeron una hidrólisis completa de almidón en la caja de Petri. El resto de los organismos mostró una degradación parcial (Figura 2a), débil o nula de dicho sustrato (Tabla 1).

La actividad enzimática sobre la celulosa se observó macroscópicamente por cambios en la consistencia de las fibras de la celulosa del papel de filtro, y microscópicamente por la destrucción de fibras, inducida a través de fisuras transversales (Figura 2c y 2d). El 37.5% de las cepas del género *Actinoplanes* presentaron actividad, así como el 33.3% de las cepas del género *Streptomyces*, el 12.5% de las del género *Micromonospora*, el 8.3% de las de *Actinomadura* y el 1.4% de las de *Streptosporangium* y Nocardioformas.

La degradación de la hemicelulosa se observó al nivel macroscópico a través del cambio en la consistencia (de dura a blanda) en cortes transversales de la semilla de *Phoenix dactylifera*. Microscópicamente, se pudo detectar la destrucción de las estructuras de las paredes celulares del endosperma (Figura 2e y 2f). Se encontró que el 42.9% de las cepas del género *Streptomyces* presentó actividad sobre la degradación de celulosanas, así como el 25.7% de las cepas de *Actinoplanes*, el 17.2% de las de *Micromonospora*, el 5.7% de las de *Actinomadura* y organismos nocardioformas y el 2.8% de las del género *Streptosporangium*.

La degradación de la pectina se detectó mediante cambios macroscópicos en la consistencia de los tejidos de las hojas de la gramínea *Trisetum* sp., los cuales pudieron ser separados fácilmente

con una aguja quirúrgica. El control microscópico demostró la pérdida del cemento intercelular, que es el elemento principal de la laminilla entre las paredes de las células vegetales (Figura 2g y 2h). Esta maceración, provocada por la actividad enzimática, se encontró en el 38.8% de las cepas del género *Streptomyces*, el 32.5% de las cepas de *Actinoplanes*, el 16.25% de las de *Micromonospora*, el 7.5% de las del género *Actinomadura*, el 3.8% de las cepas de organismos nocardioformas y el 1.2% de las de *Streptosporangium*.

En el caso de la lignina, las cepas se consideraron activamente positivas cuando, al pasar una aguja sobre el corte de xilema de *Nothofagus* sp., se producía la pérdida de su integridad, disgregándose en astillas. Microscópicamente, se detectó la colonización de masas de hifas y/o esporangios en el xilema con presencia de fisuras longitudinales en los vasos, fibras y radios del leño (Figura 2i y 2j). El 68.4% de las cepas del género *Actinoplanes* presentaron actividad, así como el 15.8% de las cepas de *Actinomadura*, el 10.5% de las del género *Streptomyces* y el 5.3% de las de Nocardioformas.

DISCUSIÓN

Mediante la utilización de los cinco métodos de aislamiento, fue posible obtener una gran diversidad taxonómica y fisiológica de los representantes de actinomicetes provenientes de la rizósfera y el rizoplaneo. Si bien estos métodos son selectivos, en conjunto se complementan, permitiendo aumentar el espectro de microorganismos aislados. El actinomicete *Frankia*, que hipotéticamente se encuentra en el suelo, no pudo ser aislado por las técnicas mencionadas, ya que se necesita de métodos específicos para su obtención (Chaia 1997). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, pH neutro, condiciones aeróbicas y medios complejos. Estas

condiciones corresponden, en general, a las exigencias fisiológicas de las bacterias y actinomicetes del suelo (Goodfellow et al. 1984). Las 122 cepas aisladas fueron identificadas hasta género, con excepción de las Nocardioformas, que representan un grupo de organismos morfológicamente parecidos pero muy diversos en su filogenia (Lechevalier 1989b).

Las cepas del género *Streptomyces* se encontraron en un alto porcentaje en ambas zonas y esto se relaciona con que este género es ubicuo, posee un crecimiento rápido y representa a los actinomicetes más importantes y dominantes del suelo (Williams et al. 1984), especialmente presentes en la rizósfera de plantas cultivadas (Korn-Wendisch & Kutzner 1992; Khan et al. 2000). El género *Micromonospora* presentó un alto porcentaje de cepas en el rizoplano, lo cual está relacionado con la producción de esporas con superficie hidrofílica (Goodfellow & Williams 1983) que son más fáciles de dispersar por la abundante humedad producida por la liberación de exudados radicales. En la rizósfera, además de *Streptomyces*, se encontró el género *Actinoplanes* en gran cantidad, debido a que poseen un ciclo de vida aéreo-acuático y esporangios con una envoltura muy resistente para garantizar una enorme distribución en todos los tipos de suelos (Vobis 1987).

Con respecto a la actividad enzimática sobre los diferentes sustratos naturales, los resultados obtenidos demuestran que los actinomicetes tienen un papel importante en el reciclaje del material orgánico del suelo al segregar distintos tipos de exoenzimas. Se podrían esperar también posibles estrategias de preparación de los tejidos radicales para la nodulación mediante la producción de diversas enzimas extracelulares u otros metabolitos bioactivos secundarios y hormonas (Goodfellow et al. 1984;

Strzelczyk & Pokojska-Burdziej 1984). De esta manera, actuarían como rizobacterias del tipo "helpers" al estimular el desarrollo de los microorganismos simbióticos y el de las plantas huéspedes. Es conocido el caso de las cepas de actinomicetes del género *Streptomyces* y *Nocardia* que favorecen el desarrollo de micorrizas arbusculares (Secilia & Bagyaraj 1987).

Entre los sustratos de origen vegetal, el almidón fue degradado por el 68% de las cepas, el 65.6% de las cepas degradaron la pectina, el 59% degradaron la celulosa, el 28.7% la hemicelulosa y el 15.6% la lignina. El género *Streptomyces* presentó el mayor número de cepas con actividad amilolítica. En el caso de la degradación de celulosa, las cepas del género *Actinoplanes* fueron las que presentaron el mayor número de cepas capaces de degradar dicho sustrato a temperatura ambiente; esto concuerda con el hecho que diversas especies de este género pueden utilizar como sustrato celulosa, aunque a mayor temperatura (Coughlan & Meyer 1992). El mayor número de cepas con actividad enzimática sobre la hemicelulosa se presentó en los géneros *Streptomyces* y *Actinoplanes*. Con respecto a la pectina, y a pesar de que se conocen pocos streptomicetes pectinolíticos (Korn-Wendisch & Kutzner 1992), cepas de *Streptomyces*, *Actinoplanes* y *Micromonospora* fueron capaces de producir degradación, observándose la destrucción de la laminilla media entre las paredes celulares en *Trisetum* sp. En cuanto a la lignina, pocas cepas presentaron capacidad para colonizar y atacar el tejido leñoso, a pesar de que diversas especies de *Actinomadura*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces* y *Thermomonospora* degradan este sustrato en numerosos fragmentos de lignina polifenólica y polimérica (Crawford et al. 1983; Lengeler et al. 1999). Es interesante mencionar el gran número de cepas de *Actinoplanes* (13) que mostraron capacidad para usar este último sustrato para su

crecimiento, mientras que las cepas del género *Micromonospora*, a pesar de tener la capacidad de atacar los complejos de lignina (McCarthy & Broda 1984), no mostraron actividad en este caso.

En total, 10 cepas no presentaron actividad sobre los sustratos biológicos probados. Las cepas del género *Pilimelia* mostraron actividad enzimática exclusivamente sobre la queratina, sustrato de origen animal. Por el contrario, la cepa MM40 del género *Streptomyces* y 7 cepas de *Actinoplanes* (ME2, ME3, ME9, ME10, ME12, ME17, ME27) presentaron un alto potencial de actividad enzimática sobre todos los sustratos vegetales estudiados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación 04/B098 de la Secretaría de Investigación de la Universidad Nacional del Comahue. Agradecemos a la Dra. MI Messuti por valiosos comentarios sobre el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- CHAIA, EE. 1997. *La simbiosis actinorrícica en las Rhamnaceas del Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- COUGHLAN, MP & F MEYER. 1992. The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. Pp. 460-516 en: A Ballows; HG Trüper; M Dworkin; W Harder & KH Schleifer (eds). *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications*. Vol. 1. 2da edn. Springer. New York.
- CRAWFORD, DL; AL POMETTO & RL CRAWFORD. 1983. Lignin degradation by *Streptomyces virisporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Appl. Environ. Microb.* **45**:898-904.
- CROSS, T. 1989. The actinomycetes. II: growth and examination of Actinomycetes – some guidelines. Pp. 2340-2343 en: ST Williams; ME Sharpe & JC Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins. Baltimore.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- EMERSON, R. 1958. Mycological organization. *Mycologia* **50**:589-621.
- FRIONI, L. 1990. *Ecología microbiana del suelo*. Universidad de la República. Montevideo.
- FRIONI, L. 1999. *Procesos microbianos. Tomo II*. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto.
- GAMS, W; RA SAMSON & JA STALPERS. 1980. *CBS course of mycology*. 2da edn. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn.
- GOODFELLOW, M; M MORDARSKI & ST WILLIAMS. 1984. *The biology of the actinomycetes*. Academic Press. Londres.
- GOODFELLOW, M & ST WILLIAMS. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
- HENSSEN, A & D SCHÄFER. 1971. Emended description of the genus *Pseudonocardia* Henssen and description of a new species *Pseudonocardia spinosa* Schäfer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**:29-34.
- HUNTER, JC; M FONDA; L SOTOS; B TOSO & A BELT. 1984. Ecological approaches to isolation. *Dev. Ind. Microbiol.* **25**:13-18.
- KHAN, MR; MA BASHAR; ML SAHA & MZ HOSSAIN. 2000. Actinomycetes of white jute (*Corchorus capsularis* L.) rhizosphere in and around Dhaka. *Bangladesh J. Botany* **29**:43-47.
- KORN-WENDISCH, F & HJ KUTZNER. 1992. The family Streptomycetaceae. Pp. 921-995 en: A Ballows; HG Trüper; M Dworkin; W Harder & KH Schleifer (eds). *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications*. Vol. 1. 2da edn. Springer. New York.
- LECHEVALIER, HA. 1989a. A practical guide to generic identification of actinomycetes. Pp. 2344-2347 en: ST Williams; ME Sharpe & JC Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins. Baltimore.
- LECHEVALIER, HA. 1989b. Nocardioform actinomycetes. Pp. 2348-2404 en: ST Williams; ME Sharpe & JC Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins. Baltimore.
- LECHEVALIER, MP. 1981. Ecological association involving actinomycetes. *Zbl. Bakt. Mik. Hyg. I, Suppl.* **11**:159-166.
- LENGELER, JW; G DREWS & HG SCHLEGEL. 1999. *Biology of the prokaryotes*. Thieme, Stuttgart y New York.
- MARSCHNER, H. 1994. Nutrient dynamics at the soil-root interface (rhizosphere). Pp. 3-

- 12 en: DJ Read; DH Lewis; AH Fitter & IJ Alexander (eds). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International. Cambridge.
- MCCARTHY, AJ. 1989. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:145-163.
- MCCARTHY, AJ & P BRODA. 1984. Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against ¹⁴C-lignin labelled wheat lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2905-2913.
- MCCARTHY, AJ & ST WILLIAMS. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene* **115**: 189-192.
- MIYADOH, S; M HAMADA; K HOTTA; T KUDO; A SEINO ET AL. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura. Tokio.
- MIYADOH, S; M HAMADA; K HOTTA; T KUDO; A SEINO ET AL. 2001. *Identification manual of Actinomycetes*. Business Center for Academic Societies Japan. Tokio.
- NONOMURA, H. 1989. Genus *Streptosporangium* Couch 1955, 148^{AL}. Pp. 2545-2551 en: ST Williams; ME Sharpe & JC Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins. Baltimore.
- NULTSCH, W. 1995. *Mikroskopisch-botanisches Praktikum für Anfänger*. Thieme. Stuttgart y New York.
- PALLERONI, NJ. 1980. A chemotactic method for the isolation of Actinoplanaceae. *Arch. Microbiol.* **128**:53-55.
- SCHÄFER, D. 1973. *Beiträge zur Klassifizierung und Taxonomie der Actinoplanaceen*. Dissertation, Marburg.
- SECILIA, J & DJ BAGYARAJ. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with root cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can. J. Microbiol.* **33**:1069-1073.
- SHIRLING, EB & D GOTTLIEB. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**:313-340.
- STRZELCZYK, E & A POKOJSKA-BURDZIEJ. 1984. Production of auxinas and gibberelin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant Soil* **81**:1069-1073.
- THUAR, AM; CA OLMEDO & J ANDRÉS. 1999. Bacterias asociadas a la rizósfera de maíz. *Phyton* **65**:87-90.
- TORTOSA, RD. 1983. El género *Discaria* (Rhamnaceae). *Bol. Soc. Arg. Bot.* **22**:301-335.
- TORTOSA, RD. 1989. Rhamnaceae. Pp. 112-122 en: MN Correa (ed). *Flora patagónica. Parte V*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires.
- VOBIS, G. 1987. Sporangiate Actinoplaneten, Actinomycetales mit aero-aquatischem Lebenszyklus. *Forum Mikrobiol.* **11**:416-424.
- VOBIS, G. 1992. The genus *Actinoplanes* and related genera. Pp. 1029-1060 en: A Ballows; HG Trüper; M Dworkin; W Harder & KH Schleifer (eds). *The Prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications*. Vol. 2. 2da edn. Springer. New York.
- VOBIS, G. 1997. Morphology of Actinomycetes. Pp. 180-191 en: S Miyadoh; M Hamada; K Hotta; T Kudo; T Seino et al. (eds). *Atlas of Actinomycetes*. Asakura. Tokio.
- VOBIS, G & E CHAIA. 1998. El rol ecológico de los actinomycetes en el suelo. Pp. 375-381 en: *Actas XVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Villa Carlos Paz.
- WEBER, RWS; D PITT & J WEBSTER. 1998. Teaching techniques for mycology. 3. Amylase secretion by *Aspergillus oryzae*. *Mycologist* **12**:8-9.
- WILLIAMS, ST; M GOODFELLOW & G ANDERSON. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. Pp. 2452-2492 en: ST Williams; ME Sharpe & JC Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Williams & Wilkins. Baltimore.
- WILLIAMS, ST; S LANNING & EMH WELLINGTON. 1984. Ecology of Actinomycetes. Pp. 481-528 en: M Goodfellow; M Mordarski & ST Williams (eds). *The biology of the Actinomycetes*. Academic Press. Londres.