

Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus sp.* aisladas de suelos tropicales

Selecting native *Bacillus sp.* strains having chitinolytic and proteolytic activity which have been isolated from tropical soils

Beatriz Adriana Rodas Junco¹, Mireya Quero Bautista²,
Héctor Felipe Magaña Sevilla³, Arturo Reyes Ramírez⁴

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la selección de cepas nativas del género *Bacillus* con actividad quitinolítica y proteolítica, en suelo tropical en la costa de Oaxaca, México. Se aislaron 150 cepas, de las cuales 22 fueron seleccionadas por presentar actividad quitinolítica y proteolítica. Dicha actividad se evaluó por la formación de halo de hidrólisis alrededor de la colonia en medios de cultivo suplementados con quitina coloidal al 5% y leche descremada al 1% respectivamente. Las cepas LUM B001, B003, B013, B015 y B065 presentaron mayor actividad quitinolítica y proteolítica, por lo que tienen el potencial para ser evaluadas en control biológico de hongos fitopatógenos. Se encontró al género *Bacillus* distribuido en suelos cultivados y no cultivados, no se encontraron diferencias estadísticas según el cultivo establecido ($P < 0,05$), sin embargo se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las zonas estudiadas, correspondiendo las menores recuperaciones de cepas a los terrenos del municipio de Tututepec, Oaxaca.

Palabras clave: método de hidrólisis, quitina coloidal, quitinasas, proteasas.

Abstract

This work was aimed at selecting native strains from the *Bacillus* genus having chitinolytic and proteolytic activity from soil from the tropical coast of Oaxaca, Mexico. 150 strains were isolated, 22 of which were selected as they presented chitinolytic and proteolytic activity. Such activity was assessed by the formation of a hydrolysis halo around the colony in culture media supplemented with 5% colloidal chitin and 1% skimmed milk. The LUM B001, B003, B013, B015 and B065-chitin strains presented higher chitinolytic and proteolytic activity, thereby having the potential for being evaluated in the biological control of phytopathogenic fungi. The *Bacillus* genus was found in cultivated and uncultivated soils; no statistical differences were found according to established crop ($p < 0.05$); however, significant differences ($p < 0.05$) were found between the areas being studied regarding the smaller amount of strains collected from land in the municipality of Tututepec, Oaxaca.

1 Profesor-Investigador, Instituto de Industrias, Universidad del Mar. Campus Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec, Juquila, Oax, México, brodas@zicatela.umar.mx

2 Pasante de Biología, Universidad del Mar. querony@hotmail.com

3 Profesor-Investigador, Instituto de Industria, Universidad del Mar. hectorms68@zicatela.umar.mx

4 Profesor-Investigador. Instituto de Recursos. Universidad del Mar. areves@zicatela.umar.mx

Key words: Hydrolysis method, colloidal chitin, chitinases, proteases.

Recibido: febrero 28 de 2009

Aprobado: junio 30 de 2009

Introducción

Las especies del género *Bacillus* son un grupo importante con aplicación en biotecnología, ya que tienen interés como fuente de producción de enzimas extracelulares. Se distinguen por ser bacterias Gram positivas, formadoras de esporas, catalasa positivas. Generalmente su hábitat es el suelo formando parte de la rizósfera de plantas (Holt et ál., 2000). Diversos estudios han señalado que el género *Bacillus* produce enzimas hidrolíticas como proteasas y quitinasas lo cual ha permitido su aplicación en la industria y en control biológico respectivamente. El sistema de quitinasas (EC 3.2.1.14) tiene un papel importante en la degradación de quitina, por lo que es crucial en la hidrólisis de la pared celular de hongos (Watanabe et ál., 1990). La quitina es un polímero de residuos de N-acetil-D-glucosamina enlazados por unión β -1-4, y es un componente común de exoesqueleto de insectos, caparazón de crustáceos y pared celular de hongos (Molano et ál., 1980, No et ál., 1989). Se ha determinado la producción de quitinasas por algunas especies de *Bacillus* con potencial en control biológico (Aktuganov et ál., 2007), además, se ha observado que *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, produce quitinasas las cuales son utilizadas contra hongos fitopatógenos ya que atacan su pared celular y, por tanto, inhiben el crecimiento del hongo (Morales de la Vega et ál., 2006). Las quitinasas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* producidas por la fermentación del caparazón de camarón, como fuente de quitina, muestra tener actividad contra hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii* (Reyes-Ramírez et ál., 2004). Las quitinasas producidas por *B. cereus* inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* (Chan et ál., 2003). Por otro lado, existen estudios que señalan al género *Bacillus* con un gran potencial en la producción de proteasas aisladas de sue-

los alcalinos (Saez-Vera, 2006), y en residuos quitino-proteicos como caparazón de camarón (Rojas-Avelizapa, 1999). Las proteasas podrían jugar un papel dentro del proceso antagónico de los organismos, ya que se ha observado que podrían estar involucradas dentro del proceso de patogenicidad de hongos hacia insectos (López-Llorca et ál., 2002). El objetivo de este trabajo fue la selección rápida de cepas nativas de *Bacillus* sp. en diferentes tipos de suelos tipo tropical del centro de la región Costa de Oaxaca, México, que fueran productoras de quitinasas y proteasas, con la finalidad de ser utilizadas en estudios posteriores para determinar su actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos.

Materiales y método

Aislamiento de cepas de *Bacillus*

El trabajo se realizó en la región centro de la Costa de Oaxaca correspondiente a un clima tropical seco con lluvias en verano AW0 (García, 1988). Se tomaron 150 muestras de suelos cultivados y no cultivados, en las siguientes localidades: Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec y San Gabriel Mixtepec, Santa Catarina Juquila y San Pedro Tututepec. Las localidades de San Pedro y San Gabriel Mixtepec se agruparon en una zona por su cercanía. Las muestras de suelo se identificaron según la cobertura vegetal que presentaban, como cultivados, no cultivados, arena y uso ganadero. Se tomaron aproximadamente 20-50 g de muestra de suelo en los primeros 10 cm de profundidad, limpiando previamente la superficie con una pala de madera estéril. El aislamiento de bacterias del género *Bacillus* se llevó a cabo por medio de la suspensión de 1g de muestra de suelo en 9 ml de agua destilada estéril, homogeneizando

la muestra vigorosamente en un vórtex durante 3 min. Se pasteurizó en un baño maría a 82 °C por 20 min. Posteriormente, se colocó en un baño de hielo por 20 min. Se realizó una dilución 1:20 para ser depositada en placas con Agar nutritivo, incubándose a 28 °C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación se seleccionaron las colonias características del género *Bacillus*, tomando en cuenta su aspecto y morfología típica: blanquecinas, opacas, aplanadas de bordes irregulares y características microscópicas típicas: formas bacilares y foadoras de endosporas. Se realizó tinción de Gram, así como la identificación de cepas con producción de cristal paraesporal con Azul de Comassie para determinar si pertenecen al grupo de *Bacillus thuringiensis* (Ammons et ál., 2002), y finalmente se hizo la reacción de la catalasa. A las cepas seleccionadas como *Bacillus sp.* se les evaluó la actividad quitinolítica y proteolítica.

Selección de cepas quitino-proteolíticas

A las cepas seleccionadas como *Bacillus sp.* se les evaluó su actividad quitinolítica en cajas de Petri conteniendo medio mínimo -0,1% de (NH₄)₂SO₄; 0,7% de K₂HPO₄; 0,3 KH₂PO₄; 0,01% de MgSO₄.7H₂O; 0,05% C₆H₅Na₃O₇.2H₂O; 0,2% de extracto de levadura, y 1,5% de Agar, ajustando a pH 7), y adicionando 5% de quitina coloidal. La quitina coloidal fue obtenida a partir de polvo de caparazón de camarón de acuerdo con No et ál. (1998) y Monreal y Reese (1969). Las cajas de Petri con medio mínimo y quitina coloidal inoculadas con las cepas aisladas de *Bacillus sp.* se incubaron a 28° C durante 96 h, detectándose la hidrólisis de quitina por la formación de un halo traslúcido alrededor de la colonia. A las cepas que presentaron 1 mm o mayor de diámetro de los halos alrededor de las colonias a los 4 días de incubación se les calificó con actividad quitinolítica. A las cepas que presentaron actividad quitinolítica se les determinó la actividad proteolítica empleando el método de hidrólisis en Agar (Sánchez et ál., 2004; Shar-

min et ál., 2005; Khosravi-Darani et ál., 2008) utilizando como medio Agar, métodos estándar suplementado con 1% de leche descremada. Las cepas se incubaron a 28-30° C por 48 h. La capacidad hidrolítica de las cepas se reconoció mediante la formación de halos traslúcidos alrededor de las colonias. Se tomó como criterio de selección de cepas con actividad proteolítica aquellas que presentaran más de 1 mm de diámetro en los halos de hidrólisis alrededor de las colonias a las 48 h. Se incluyó a la cepa *Bacillus thuringiensis* svar. *kurstaki* HD1 (Bt HD1) como cepa de referencia.

Análisis estadísticos

Los resultados de la actividad quitinolítica se sometieron a un análisis de varianza con el procedimiento GLM del programa SPSS 15.0, siendo los usos del suelo y las regiones los factores fijos. Se utilizó el test de Bonferroni para las comparaciones entre las zonas y los tipos de suelo, respecto a la actividad quitinolítica, y se realizó una regresión lineal para determinar la relación entre el tamaño del halo de hidrólisis de quitinasa y el de proteasas, con el programa GraphPad Prism version 5.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Resultados y discusión

Aislamiento de cepas de Bacillus sp.

Se colectaron suelos cultivados (maíz, papaya, cacahuate, calabaza, plátano, mango, maguey, ajonjolí, caña, café, limón, yerbabuena, neem, cempasúchil) y suelos no cultivados incluyendo arena de playa. De las muestras procesadas se aislaron 150 cepas, con características que las ubican dentro del género *Bacillus*. La observación al microscopio mostró la presencia de células vegetativas de forma bacilar y formación de esporas a las 72 h. Todas resultaron ser catalasa positivas, y la tinción de Gram las clasificó como Gram positivas. La forma bacilar Gram positiva, formadora de endosporas y catalasa positiva es característica es-

pecial del género *Bacillus* (Holt J.G et ál., 2000) y es utilizada como parámetro para determinar especies del género *Bacillus* (Sosa-López, 2005). Ninguna de las 22 cepas mostró producción de cristal paraesporal por lo que son especies diferentes a *B. thuringiensis*. El aislamiento de *Bacillus sp.* a partir de suelos, realizado en este estudio, concuerda con Travers et ál. (1987) y Sosa-López et ál. (2005) quienes señalan que las especies de *Bacillus* habitan en los suelos como microorganismos saprófitos por lo cual es muy probable aislarlas de este medio. Esto se confirmó ya que se aislaron en el total de las muestras analizadas. El aislamiento de cepas de *Bacillus* es común a partir de suelos, principalmente por la búsqueda de *Bacillus thuringiensis*, sin embargo, se han encontrado cepas de *Bacillus sp.* en residuos de caparazón de camarón (Rojas-Avelizapa et ál., 1999), así como cepas de *Bacillus sp.* aisladas de suelos alcalinos productoras de proteasas (Khosravi-Darani et ál., 2008; Saenz-Vega, 2006). Por esta razón la búsqueda de especies del género *Bacillus* puede realizarse en una amplia gama de tipos y condiciones de suelos.

Microorganismos con actividad quitino-proteolítica

De un total de 150 cepas de *Bacillus sp.* aisladas, 37 formaron un halo de hidrólisis en medio con quitina coloidal, sin embargo, se seleccionaron solo aquellas cepas que presentaron un halo de hidrólisis ≥ 1 mm a los cuatro días de incubación, seleccionando 22 cepas (tabla 1) que fueron catalogadas con actividad quitinolítica. La cepa LUM B003 presentó el mayor diámetro del halo en quitina coloidal, proveniente de suelo cultivado de maíz, sin embargo, presentó un halo de hidrólisis proteolítica de 5 mm de diámetro. Las cepas LUM B001, B013, B015 y B065 presentaron 2 mm de halo de actividad quitinolítica, mientras que los halos de hidrólisis de actividad proteolítica fueron más amplios (8 mm). En la figura 1 se muestran los halos observados de la cepa LUM B013. La cepa referencia *Bacillus thuringiensis* HD1 no mostró un halo de hidrólisis en medio mínimo

con quitina coloidal, a pesar de que variedades de esta especie han mostrado actividad quitinolítica (Barboza-Corona et ál., 1999). En el caso de la actividad proteolítica esta cepa mostró un halo de hidrólisis de 2 mm, siendo de las de menor actividad junto con las cepas LUM B09 y LUM B43. Del total de cepas analizadas solo el 15% mostraron actividad quitinolítica de acuerdo con el halo que presentaron alrededor de la colonia, por lo que estos resultados confirmarían que las enzimas quitinolíticas de las cepas de *Bacillus* juegan un rol nutricional secundario, y que la quitina no es una fuente importante de carbono y nitrógeno (Barboza-Corona et ál., 1999). El aislamiento de cepas quitinolíticas es realizado en ambientes con presencia de residuos con fuente de quitina (Sastoque-Cala et ál., 2007; Barboza-Corona et ál., 1999; Rojas-Avelizapa et ál., 1999). Sin embargo, en este estudio se corrobora que pueden ser recuperadas de ambientes sin aparente presencia de residuos quitinosos. La producción de quitinasas es acompañada con la producción de proteasas, posiblemente como un complejo necesario para degradar compuestos quitino-proteicos. Por otro lado, se espera que las cepas quitinolíticas aisladas de suelo estén mejor adaptadas al ambiente agrícola para su uso. La región de la costa correspondiente a la zona de Puerto Escondido fue la que presentó mayor actividad de bacterias quitinolíticas ($P < 0,05$), la mayor diferencia se presentó con la localidad de Tututepec. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas por el uso del suelo (cultivo, sin cultivar, arena o uso ganadero) o la interacción del uso de suelo y la zona de muestreo. Se observa que los terrenos más cercanos a la costa pueden ser los que presenten más bacterias con actividad quitinolítica (tabla 2). En el análisis de regresión lineal se encontró una relación significativa ($P < 0,05$) entre el tamaño del halo de quitinasas y el de proteasas, siendo la R^2 de 0,2 (datos no mostrados). Se ha reportado que la importancia de aislar cepas nativas de *Bacillus sp.* y que éstas presenten actividad quitinolíticas y proteolíticas, está dirigida a que las cepas sean utilizadas para su evaluación en sustratos de desecho como maíz

Tabla 1. Cepas aisladas de *Bacillus sp.*, tipo de suelo, características y actividad quitinolítica y proteolítica presentada.

Cepas	Tipo de suelo	Gram	Catalasa	Cristal paraesporal	Actividad quitinolítica (mm)	Actividad proteolítica (mm)
LUM-B001	Policultivo	+	+	-	2	8
LUM-B002	Papaya	+	+	-	2	6
LUM-B003	Maíz	+	+	-	3	5
LUM-B004	Ajonjolí	+	+	-	2	5
LUM-B005	No cultivado	+	+	-	2	4
LUM-B013	Milpa	+	+	-	2	8
LUM-B014	Milpa	+	+	-	2	6
LUM-B015	Rizósfera nopal	+	+	-	2	8
LUM-B016	Arena playa	+	+	-	2	4.5
LUM-B019	Arena	+	+	-	1	2
LUM-B022	Papaya	+	+	-	1	5
LUM-B024	Papaya	+	+	-	1	5
LUM-B043	Calabaza	+	+	-	1	1
LUM-B057	Maíz	+	+	-	2	6
LUM-B063	Calabaza	+	+	-	1	5
LUM-B065	Caña	+	+	-	2	8
LUM-B066	No cultivado	+	+	-	1	4
LUM-B107	Maguey	+	+	-	1	3
LUM-B115	Maíz	+	+	-	2	4
LUM-B116	Maíz	+	+	-	1	3
LUM-B128	Suelo con Cempasúchil	+	+	-	1	4
LUM-B129	Suelo con Cempasúchil	+	+	-	2	4
Bt HD1	-	+	+	Bipiramidal	-	2

mm: milímetro del halo de hidrólisis

Bt HD1: cepa de referencia, *Bacillus thuringiensis* svar. *kurstaki* HD1

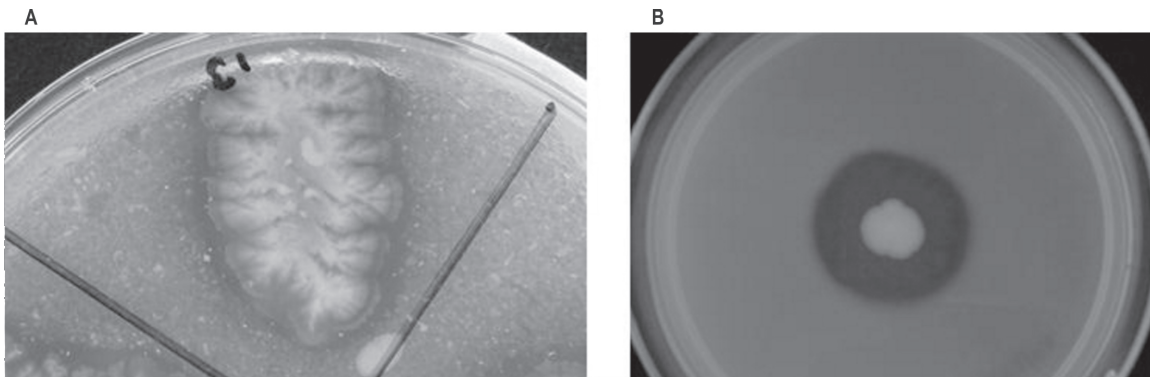


Tabla 2. Efecto de la zona en la recuperación de cepas con actividad quitinolítica. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$)

Zona	Media	Error típ.
Puerto Escondido	0,4979a	0,1088
San Pedro Mixtepec	0,0705b	0,1003
Santa Catarina Juquila	0,0402b	0,1773
San Pedro Tututepec	0,0001b	0,1737

contaminado por aflatoxinas (Saéz-Vega et ál., 2004), residuos quitino-proteicos como caparazón de camarón (Barboza-Corona et ál., 1999) o bien, en la evaluación de actividad antifúngica in vitro contra hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizotocnia solani* y *Pythium aphanidermatum* (Sosa-López et ál., 2005).

Conclusiones

Se identificaron 22 cepas nativas con actividad de quitinasas y proteasas de *Bacillus sp.* de un total de 150 cepas aisladas a partir de diferentes tipos de suelos. El método de hidrólisis en Agar permitió demostrar que dichas cepas aisladas de ambientes de suelo tropical poseen enzimas hidrolíticas como las quitinasas y proteasas. Se seleccionaron cinco cepas: LUM B001, B03, B013, B015 y B065 por su actividad quitinolítica y proteolítica al presentar halos traslúcidos alrededor de la colonia de 2 mm para quitinasas y 8 mm para proteasas. Estas cepas tienen el potencial para ser evaluadas en control biológico de patógenos de suelo que

afecten la raíz o la germinación de semillas en diversos cultivos de interés para la zona Costa del estado de Oaxaca, México. Los resultados de este trabajo indican que la búsqueda de cepas del género *Bacillus* con actividad quitinolítica y proteolítica es afectada por la zona geográfica más cercanas a la costa, mientras que el uso del suelo no tiene efecto alguno sobre su actividad.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto 2IR0710 financiado por el Programa de Mejoramiento del Profesorado de la Subsecretaría de Educación Superior (PROMEP/103.5/07/2784)

Referencias bibliográficas

Aktuganov, G. E., Galimzyanova, N. F., Melent'ev, A. I., Kuz'mina, L. Y. 2007. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus sp.* 739 and their involvement in lysis of

- micromycetes cell walls. *Mikrobiologiya* 76 (4): 413-420.
- Ammos, D., Rampersad, J., Khan, A. 2002. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 203-209.
- Barboza-Corona, J. E., Contreras, J. C., Velázquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gómez Ramírez, M., Cruz-Camarillo, R., Ibarra J. E. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 21: 1125-1129.
- Chan, W. T., Chen, C. S., Wang, S. L. 2003. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr Microbiol* 47: 102-108.
- García, E. 1988. Modificación al sistema de clasificación climática de Köpen, para adaptarlos a las condiciones de la República Mexicana. 4 ed. México: Instituto de Geografía, UNAM.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. USA: Williams and Wilkins.
- Khosravi-Darani, K., Falahatpishe, H. R., Jalali, M. 2008. Alkaline protease production on date waste by an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 isolated from soil. *Afr J Biotechnol* 7 (10): 1536-1542.
- López-Llorca, L. V., Carbonell, T., Gómez-Vidal, S. 2002. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. *Mycological Progress* 1 (3): 249-256.
- Molato, J., Bowers, B., Cabib, E. 1998. Distribution of chitin in yeast cell wall. *J Cell Biol* 85: 199-212.
- Monreal, J., Reese, E. T. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 15: 689-696.
- Morales de la Vega, L., Barboza-Corona, E., Aguilar-Uscanga, M. G., Ramírez-Lepe, M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can J Microbiol* 52: 651-657.
- No, H. K., Meyers, S. P., Lee, S. K. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J Agric Food Chem* 37 (3): 575-579.
- Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P. M., Barboza-Corona, E. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potencial for the Biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J Food Science* 69: 131-134.
- Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vázquez, R., Ibarra J. E. 1999. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal & Biotechnology* 15: 299-308.
- Sánchez, T., León, J., Woolcott, J., Arauco, K. 2004. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev Peru Biol* 11 (2): 179-186.
- Saéz-Vega, A., Montoya, O., Márquez, E. J. 2004. Efecto de la aflatoxina B1 sobre el crecimiento y actividad proteolítica de una cepa nativa de *Bacillus* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* VI (1): 55-57.
- Saéz-Vega, A. 2006. Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp. alcalofílico. *Revista Ingeniería y Ciencia* 2 (3): 29-38.
- Sastoque Cala, L., Mercado-Reyes, M., Santiago-Salgado, M., Quevedo-Hidalgo, Pedroza-Rodríguez, M. 2007. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6 (2): 137-146.
- Sosa López, A., Pazos, V. y Torres Dania. 2005. Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola* 32 (3): 25-30.
- Sharmin, S., Hossain, MD. T., Anwar, M. N. 2005. Isolation and characterization of a protease producing bacteria *Bacillus amovivorus* and optimization of some factors of culture conditions for protease production. *J Biol Sci* 5 (3): 358-362.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J Bacteriol* 172 (7): 4017-4022.