

ACTINOMICETOS AISLADOS DE RIZOSFERA DE NARDO (*Polianthes tuberosa*) DEL ESTADO DE MORELOS, MÉXICO

ACTINOMYCETES ISOLATED FROM THE RIZOSPHERE OF NARDO (*Polianthes tuberosa*) FROM THE STATE OF MORELOS, MÉXICO

Palacios-Arriaga, A. H.¹; Rincón-Enríquez, G.¹; Evangelista-Martínez, Z.¹; Gómez-Leyva, J.F.²; Quiñones-Aguilar, E.E.^{1*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Camino Arriero 1227. Zapopan, Jalisco. ²TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán km 10, Tlajomulco de Zúñiga Jalisco, México.

*Autor de correspondencia: equinones@ciatej.mx

ABSTRACT

The tuberose (*Polianthes tuberosa*) is a cut flower of importance in Morelos for its considerable economic and social impact, however, its production is affected by the bulb rot, caused by phytopathogenic bacteria. Actinomycetes as biocontrol agents are recognized for their ability to produce bioactive compounds with antimicrobial activity. Its isolation can be benefited with treatments such as enrichment of the growth substrate or thermal treatment to the soil. The aim of this work was to isolate actinomycetes in the rhizosphere of tuberose two town of the state of Morelos, México, as potential biocontrol agents of soft rot of tuberose. For the isolation of actinomycetes, the soil samples were treated with CaCO₃ and temperature at 60 °C. The culture media for isolation were ISP2 and AIA. We isolated 280 actinomycetes from Emiliano Zapata and 179 from Mazatepec. We obtained 20 morphologies and 10 unique isolates in both municipalities. These isolates could be used as antagonists for the control of soft rot of the bulb in tuberose.

Keywords: actinobacteria, *Streptomyces*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia* sp., floriculture.

RESUMEN

El nardo (*Polianthes tuberosa*) es una flor de corte de importancia en Morelos por su considerable impacto económico y social. Sin embargo, su producción es afectada por la pudrición del bulbo, causada por bacterias fitopatógenas. Los actinomicetos como agentes de biocontrol, son reconocidos por su capacidad para producir compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana. Su aislamiento puede ser beneficiado con tratamientos como enriquecimiento del sustrato de crecimiento o tratamiento térmico al suelo. El objetivo de este trabajo fue aislar actinomicetos de la rizosfera de nardo de dos municipios del estado de Morelos, México, como potenciales agentes de biocontrol de la pudrición blanda del nardo. Para el aislamiento de actinomicetos, las muestras de suelo se trataron con CaCO₃ y temperatura a 60 °C. Los medios de aislamiento fueron ISP2 y AIA. Se aislaron 280 actinomicetos de Emiliano Zapata y 179 en Mazatepec. Se obtuvieron 20 morfologías y 10 aislados únicos en ambos municipios. Estos aislados podrían ser empleados como antagonistas para el control de la pudrición blanda del bulbo en nardo.

Palabras clave: Actinobacterias, *Streptomyces*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia* sp., floricultura.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 8, agosto. 2018, pp: 61-67.

Recibido: enero, 2018. **Aceptado:** junio, 2018.



INTRODUCCIÓN

El nardo (*Polianthes tuberosa*) es una flor de corte en el estado de Morelos, México, con un considerable impacto económico y social, actividad que es afectada por diversas enfermedades que disminuyen su productividad. Una de las principales afecciones es la pudrición del bulbo, que genera mermas en alrededor del 50% de las parcelas. Los principales agentes bacterianos causantes de la enfermedad pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Dickeya* y *Pectobacterium*, las cuales se asocian al picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) identificado como el transmisor del patógeno. La rotación de cultivos y el uso de cobre y antibióticos son prácticas insuficientes para el control y mitigación de las pérdidas en diversos cultivos de bulbo florícola. En la búsqueda de alternativas que ayuden a controlar a los patógenos que producen enfermedades de tipo bacteriano, se han considerado a los actinomicetos como agentes de biocontrol por su capacidad para producir compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana (Basilio *et al.*, 2003; Bredholdt *et al.*, 2007). Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas que comprenden un amplio rango de morfologías, con una amplia distribución en diferentes ambientes, en su mayoría son saprófitos y descomponedores de diversas materias orgánicas (Goodfellow y Williams, 1983). Con base en la facilidad de crecer aprovechando diversos sustratos, se les puede aislar adicionando diferentes fuentes de carbono simples, también es posible adicionar otros componentes que favorecen su crecimiento como el extracto de suelo, quitina y ácidos húmicos (Bredholdt *et al.*, 2007; Hayakawa y Nonomura, 1987). Se ha visto que factores como el pH y la presencia de diversas sales pueden favorecer el aislamiento de los actinomicetos; por ejemplo, algunas sales solubles de calcio favorecen la producción de esporas en algunas especies de estreptomicetos, mientras que en otras puede llegar a inhibirla (Basilio *et al.*, 2003). Las cantidades de calcio que se adicionan al suelo o a los medios de cultivo varían de entre el 1 al 50%; comúnmente se emplea CaCO_3 como la fuente principal, pero el efecto suele ser poco evidente con compuestos de baja solubilidad (El-Nakeb y Lechevalier, 1962; Natsume *et al.*, 1989; Oskay, 2009; Yi y Amsaveni, 2012). Por otra parte, un tratamiento térmico a las muestras de suelo con un intervalo de temperaturas que no superen los 70 °C de manera previa al aislamiento de estreptomicetos, ha sido utilizado para disminuir la aparición de otros grupos de microorganismos (Bollen, 1969). Este efecto benéfico de un trata-

miento térmico cercano a los 55 °C ha sido comprobado *in vitro* para el aislamiento de *Streptomyces* spp. y su efecto sobre la germinación de las esporas (Hirsch y Ensign, 1976). El efecto benéfico de la aplicación de calor y la adición de compuestos con calcio al suelo ha mostrado buenos resultados durante el aislamiento de actinomicetos (Oskay, 2009). Con el objetivo de obtener actinomicetos potencialmente antagonistas a *Pseudomonas aeruginosa* y *Dickeya dadantii* causantes de pudrición en bulbos de nardo, se evaluaron tratamientos físicos y químicos aplicados a las muestras para el aislamiento de actinomicetos. Asimismo, se evaluaron diferentes condiciones de crecimiento empleando dos medios de cultivo y su influencia en el número y tipo de actinomicetos aislados de dos municipios productores de nardo del estado de Morelos, México.

MATERIALES Y METODOS

Se colectaron muestras de suelo rizosférico de nardo en dos parcelas de los municipios de Emiliano Zapata (EZ) y Mazatepec (MA) en el estado de Morelos, México. Las muestras de suelo se sometieron a 12 tratamientos conformados de la combinación de los niveles de tres factores propuestos. Factor procedencia de la muestra: 1) EZ y 2) MA; Factor tratamiento de la muestra: 1) Térmico a 60 °C; 2) CaCO_3 y 3) Sin tratar; y Factor medio de cultivo: 1) ISP2) y 2) AIA. El tratamiento con adición de CaCO_3 , consistió en realizar una mezcla en proporción 1:1 (peso/peso) suelo rizosférico: CaCO_3 y se almacenó a temperatura ambiente en tubos Falcon™ de 50 mL una semana; el suelo con tratamiento térmico se sometió dos horas a 60 °C antes del aislamiento, como testigo se utilizó la muestra de suelo sin tratar. Los medios de cultivo empleados para el aislamiento fueron: ISP2 (International Streptomyces Project) y AIA: Actinomycete Isolation Agar de Sigma-Aldrich™, con Cicloheximida de Sigma-Aldrich™ a $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$. El aislamiento de actinomicetos se realizó con el método de diluciones decimales seriales y siembra en placa de agar. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar a 25 °C. Las colonias que presentaron un aspecto morfológico característico de los actinomicetos fueron contadas, seleccionadas y sembradas en medio papa dextrosa agar (PDA, Difco™) pH=7 hasta la obtención de aislados puros. Los actinomicetos se clasificaron según su macromorfología (coloración durante las distintas etapas de desarrollo). Las características descritas fueron morfología colonial, coloración del medio de cultivo por metabolitos excretados, coloración de micelio de sustrato y micelio aéreo y presencia o no de esporulación y su coloración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 280 aislados a partir de EZ y 179 de MA. Para EZ se obtuvieron 117, 133 y 30 aislados y para MA 102, 67 y 10 aislados en suelo sin tratamiento, tratamiento a 60 °C y con CaCO₃, respectivamente. El mayor número de actinomicetos se obtuvo en los tratamientos testigo y térmico y el menor número en el suelo con CaCO₃. En los medios de aislamiento no hubo diferencias dentro de un mismo tratamiento con inductor de selección, a excepción de EZ con CaCO₃, donde la mayor cantidad se obtuvo en el AIA (28 aislados) y la menor cantidad en ISP2 (2 aislados). Los factores que permitieron un mayor aislamiento de actinomicetos en EZ fueron la combinación de AIA con 60 °C (74 aislados) e ISP2 en el suelo sin tratar (60 aislados). Los suelos con CaCO₃ presentaron menor cantidad de aislados que tratamientos testigo a 60 °C y con respecto a los medios de aislamiento, se obtuvo un mayor número en AIA (diseñado para el aislamiento de actinomicetos) que en ISP (diseñado para *Streptomyces*). En los suelos de MA, el medio ISP2 y control fueron más efectivos para la obtención de actinomicetos (55 aislados) que los tratamientos AIA y 60 °C (33 aislados) la menor cantidad de actinomicetos para el MA se encontró en tratamientos con CaCO₃ en ambos medios. El porcentaje de actinomicetos aislados en los dos medios de cultivo fueron en ISP2: 43 y 53% y en el medio AIA: 56 y 46% para EZ y MA respectivamente (Cuadro 1).

Los datos sugieren respuestas ligeramente diferentes entre lugares de aislamiento y medios de cultivo, como lo encontrado por Basilio et al. (2003). En este trabajo se muestra que no existe coincidencia en el comportamiento que tienen los tratamientos a la muestra y los medios de cultivo en cuanto al porcentaje de aislados obtenidos; pues un mismo tratamiento en EZ y MA en combinación con medios de cultivo distintos se comporta diferente (Os-kay, 2009; Malek et al., 2014), pudiendo haber variaciones en el número poblacional de estos microorganismos aun cuando el tratamiento sea similar, pues la cantidad de propágulos depende de las características del sitio. En cuanto a los aislados obtenidos en ISP2 y AIA, diversos autores mencionan resultados diferentes, al respecto, Hayakawa y Nonomura (1987), evaluaron ocho medios de aislamiento y obtuvieron un bajo número de aislados en AIA para suelos de ecosistemas forestales contrario a lo reportado por Malek et al. (2014) quienes observaron mejores resultados con AIA (24.1% del gran

total) que con ISP2 (5.8%) para suelos de mangle, por lo que la procedencia de diferentes ecosistemas es un factor a considerar, dado que algunos géneros de actinobacterias pueden predominar más en un sitio que en otro, además de presentar diferencias en diversidad. Otra diferencia entre suelos y tratamientos a la muestra fue el tratamiento térmico, mientras que en EZ, la temperatura a 60 °C parece estimular el número de aislados, en MA disminuye su conteo total. Al respecto, Hirsch y Ensign (1976) informan que la aplicación de calor puede acelerar la germinación de esporas de actinomicetos *in vitro* no obstante, Bollen (1969) observó que no había diferencia numérica entre los tratamientos testigo y el tratamiento a 45 °C (10⁶ UFC) y que a partir de este punto empezó a descender progresivamente conforme se incrementaba la temperatura cada 5 °C hasta alcanzar un conteo de 10⁵ g⁻¹ suelo UFC a 60 °C, este resultado coincide con la disminución de aislados en MA. Malek et al. (2014) observaron que la aplicación de calor seco reduce el número de aislados comparado con el tratamiento de calor húmedo. En este trabajo, no se evaluó el efecto del calor húmedo o seco, no obstante, se obtuvo un menor número de aislados con el tratamiento a 60 °C comparado con el testigo sin calor en MA. Con respecto al tratamiento con adición de CaCO₃, Hirsch y Ensign (1976), sometieron esporas de *Streptomyces viridochromogenes* a tratamientos con cloruro de calcio y sulfato de magnesio, además de que les proporcionaron un tratamiento térmico de 55 °C por 10 minutos y encontraron que la aplicación de calor y de cloruro de calcio di-hidratado al 0.002% *in vitro* aceleró la germinación de

Cuadro 1. Efecto de medios y tratamientos al suelo sobre el porcentaje de actinomicetos aislados; estimado con base en el total de actinomicetos aislados de todos los tratamientos.

Procedencia de la muestra	Tratamientos a la muestra	Número de aislados		Porcentaje del total de aislados	
		Medios de aislamiento			
		ISP2	AIA	ISP2	AIA
Emiliano Zapata	Testigo	60	57	21	20
	60°C	59	74	21	26
	CaCO ₃	2	28	1	10
Mazatepec	Testigo	55	47	31	26
	60°C	34	33	19	18
	CaCO ₃	6	4	3	2

entre 6 y 15%. La cantidad de esporas en desarrollo, determinada por densidad óptica aumenta, cuando la muestra es sometida calor y CaCO_3 (+17% respectivamente comparados con el testigo). Dicho fenómeno podría explicar el mayor número de aislados en EZ a 60 °C en frente al testigo. No obstante, la adición de CaCO_3 dio como resultado un menor número de aislados tanto en EZ, como en MA. Esto puede deberse a que el desarrollo de esporas de actinomicetos es favorecido por sales solubles y disminuye ante la presencia de sales poco solubles de calcio como lo mostraron Natsume *et al.* (1989) *in vitro*, además de que el efecto promotor depende de las especies presentes, lo cual puede justificar que se hayan aislado actinomicetos de diferente apariencia y cambie la frecuencia de aparición de otros aislados entre tratamientos evaluados. El tratamiento de CaCO_3 favoreció un mayor número de actinomicetos en EZ en AIA, situación que no se presenta en el suelo de MA. La adición de CaCO_3 puede ser un estimulante aun en altas concentraciones, 50% en la muestra de suelo (El-Nakeb y Lechevalier, 1962). El efecto estimulante del calcio depende de la procedencia de la muestra y del medio de cultivo como lo demuestran Yi y Amsaveni (2012), quienes obtuvieron mayor cantidad de actinomicetos en suelos de doce municipios agrícolas; además la cantidad de CaCO_3 que comúnmente se emplea para tratamiento de muestras de suelo es 1% (p/p) (Oskay, 2009; Yi y Amsaveni, 2012). Las morfologías pueden clasificarse por la coloración predominante durante las etapas de desarrollo de los actinomicetos como formación de micelio de sustrato, micelio aéreo y esporulación en el

medio empleado. De acuerdo con los tipos de actinomicetos obtenidos se propusieron ocho grupos y un total de 20 morfologías basadas en su coloración en sus distintas etapas de desarrollo, así como en la intensidad (+, -) de metabolitos excretados al medio de cultivo. Las morfologías clasificadas por color fueron las siguientes: Azul (1+); 2); Rojo (2+); Morado (3++); Gris (4-, 5+); Verde (6+, 7++ y 8+++); Amarillo (9-, 10+, 11++, 12+++, 19); Naranja (13-, 14+, 15++, 20+); Café (16+, 17+ y 18+++). Con respecto a la clasificación de aislados, se encontraron 11 morfologías comunes entre los dos sitios de muestreo y 9 diferentes entre ellos. Con relación a la macromorfología observada en los actinomicetos aislados de EZ se obtuvieron 16 morfologías y seis aislados sin clasificar, por su parte, en MA, se encontraron 15 morfologías y tres aislados diferentes. Se generó un banco de 29 aislados potencialmente diferentes; 11 morfologías similares de ambos municipios, nueve diferentes y seis y tres aislados sin clasificación de EZ y MA respectivamente. Cuatro morfologías no se observaron en EZ: café (no. 16, 17), rojo (no. 2) y naranja (no. 20), mientras que en MA estuvieron ausentes cinco morfologías: morado (no. 3), verde (6, 7) y naranja (14, 15). En promedio y como tendencia general, tres morfologías sumaron aproximadamente el 50% de los aislados por tratamiento, es decir, los tratamientos favorecían la obtención de cierto tipo de actinomicetos. El número de morfologías obtenido fue mayor a 60 °C que en el testigo en EZ y viceversa, por lo que en EZ existe mayor diversidad de actinomicetos cuyo ciclo biológico es favorecido por las altas temperaturas comparado con MA. El número de morfologías de los tratamientos con CaCO_3 fue menor a las obtenidas en el tratamiento testigo y a 60 °C. Para EZ, la variedad de actinomicetos obtenidos fue menor en ISP2, en cambio en AIA, la variación fue mayor que en tratamientos con CaCO_3 : EZ-ISP2, MA-ISP2 y MA-AIA (Figura 1). Los compuestos de calcio pueden inducir desarrollo selectivo entre especies de actinomicetos (Natsume *et al.*, 1989), esto explica la diferencia entre los aislados con CaCO_3 con respecto a los otros tratamientos. Los resultados obtenidos revelan que se aisló menor número y menor variedad de actinomicetos en el tratamiento con CaCO_3 , los cuales podrían tener una menor capacidad de solubilizar el calcio (Natsume *et al.*, 1989). Sin embargo, no se emplearon otros compuestos como CaCl_2 para comprobar esta hipótesis.

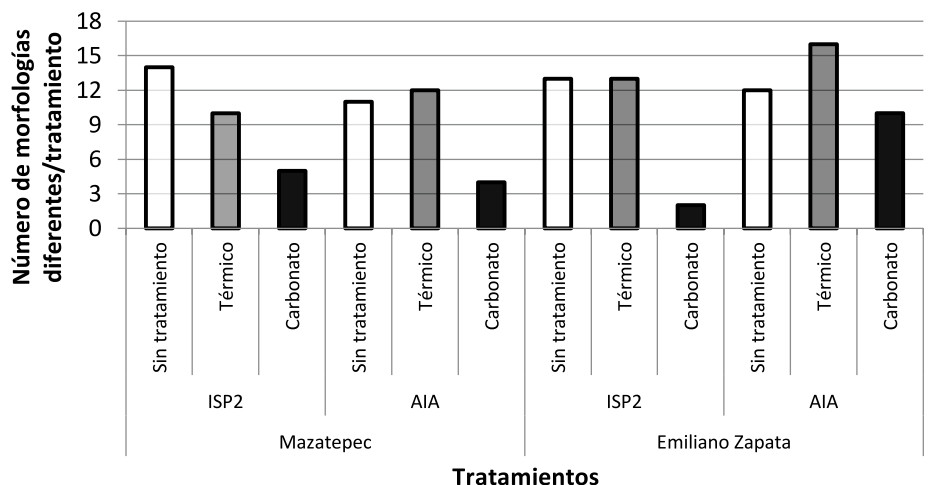


Figura 1. Número de morfologías de actinomicetos aislados por tratamiento: medio de cultivo y tratamiento físico al suelo en dos municipios del estado de Morelos, México.

El número de morfologías de actinomicetos en EZ fue de 13 en los tratamientos testigo y térmico en medio ISP2; por otro lado, se obtuvieron 16 en el tratamiento térmico y 12 en el control en AIA, el menor número de morfologías diferentes se obtuvo en el tratamiento con CaCO_3 (10). El número de morfologías obtenido en MA y con los tratamientos control y térmico fue de 12 y 10 respectivamente en ISP2 mientras que en AIA se obtuvieron 11 para ambos tratamientos (Figura 1). Los actinomicetos con morfología tipo amarilla no.10 son los que más abundaron en las muestras de suelo de MA (24%) y EZ (18%) de los aislados, se obtuvieron 97 de un total de 459 aislados (21% del total). Su micelio de sustrato fue amarillo que evolucionaba a crema, su micelio aéreo fue blanco y gris al esporular, oscureciendo gradualmente. La coloración amarilla en el medio se

considera moderada a fuerte. Las colonias con esporulación gris son los que se aislaron con mayor frecuencia, por ejemplo, Oskay (2009) obtuvieron un 30% del total de suelos agrícolas y un 38% de suelos no agrícolas, por otra parte, Malek et al. (2014) encontraron un gran porcentaje de sus aislados (48%) a partir de muestras de sedimentos de mangle con micelio aéreo blanco y esporulación gris. No se utilizaron técnicas especiales para la obtención de actinomicetos "raros", por lo que este fenotipo se esperaba (Hayakawa et al., 1987; Oskay, 2009). Las morfologías aisladas con mayor frecuencia en EZ después de la no.10, fueron las morfologías amarillo (no. 12) y café (no. 18) para el control y para el suelo tratado a 60°C fue naranja (no. 15) en ISP2. Los colores amarillos (no. 9) y naranja (no. 14) fueron mayormente aisladas en ISP2 con CaCO_3 , mientras que en AIA fueron más frecuentes las morfologías naranja y café (no. 13 y 16) (Figuras 2 y 3).

El color café (no. 16) fue sensible al calor y al CaCO_3 , debido a que este tipo solo se aisló del tratamiento testigo, mientras los aislados de color naranja (no. 13) se observaron con mayor frecuencia al adicionar CaCO_3 . Por su parte, los aislados amarillos (no. 9) se presentaron en los tratamientos testigo y a 60°C , lo cual indica que el calor puede beneficiar el aislamiento de este tipo de actinomicetos. Se encontraron dos aislados sin poder agruparse en morfologías en el tratamiento testigo y tres en el térmico; son susceptibles a altas concentraciones de calcio y al calor, debido a que solo se obtuvieron en el tratamiento testigo. Los tratamientos permitieron obtención de actinomicetos distintos en apariencia, siendo esta situación más acentuada en el medio AIA para el municipio de EZ (Figura 3). En el caso del municipio de MA

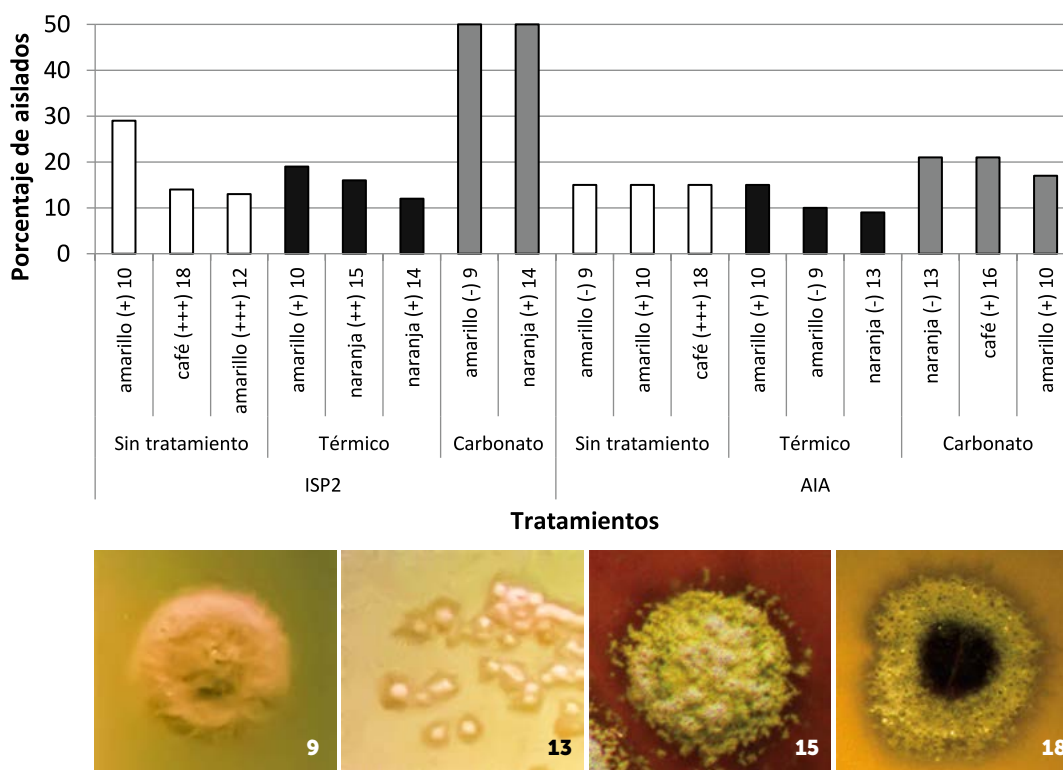


Figura 2. Morfologías predominantes por efecto de diferentes tratamientos a las muestras de suelo de EZ en medios ISP2 y AIA. El porcentaje de aislados se calculó con el número total de aislados por tratamiento y con base en su morfología. El número en la imagen de la colonia del actinomiceto corresponde al color de esta según clave en el eje de tratamientos de la gráfica.

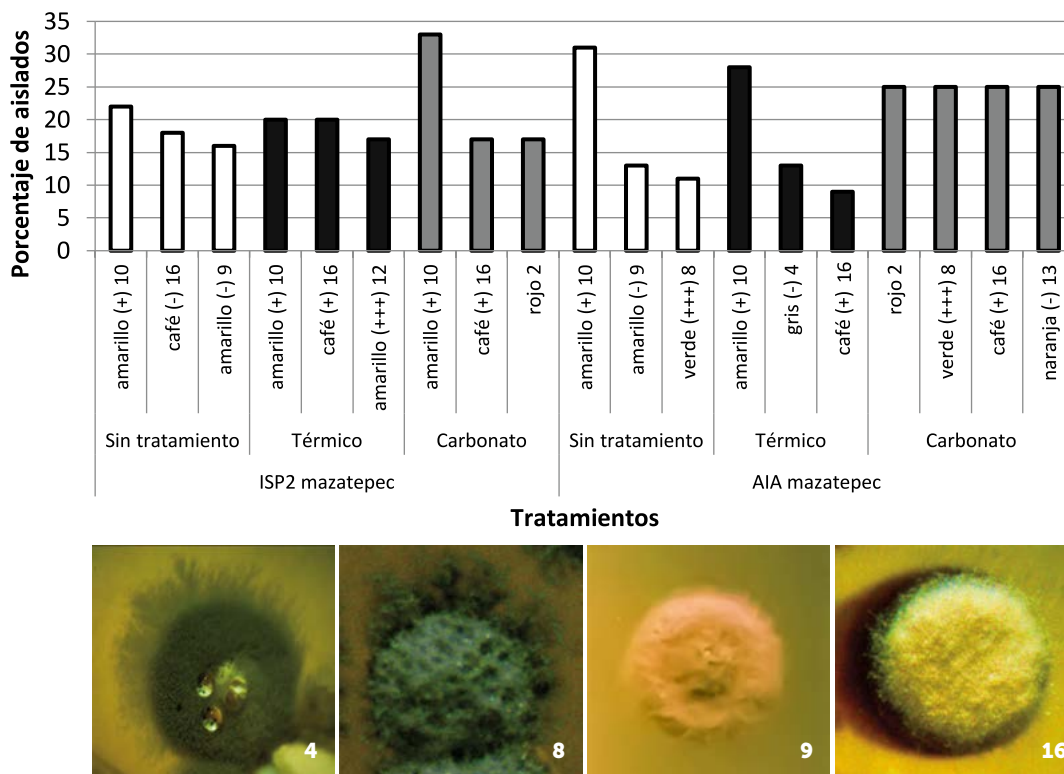


Figura 3. Morfologías predominantes en frecuencia de aislamiento por efecto de diferentes tratamientos a muestras de suelo proveniente de Mazatepec y crecidos en medios ISP2 y AIA.

y el tratamiento al suelo con carbonato, se obtuvo una menor cantidad de morfologías distintas (cuatro y cinco para ISP2 y AIA respectivamente) con un aislado representativo por morfología en el tratamiento.

La morfología café (no. 16) fue la segunda más abundante después de la no. 10 en los tres tratamientos al suelo en ISP2. Las morfologías más abundantes después de la no. 10 en el tratamiento control fue la amarilla (no. 9) y gris (no. 4) para el tratamiento térmico en AIA. Los aislados únicos o sin clasificación proceden de los tratamientos control y con CaCO_3 en medio ISP2, se observó una tendencia de mayor variedad de actinomicetos aislados en medio de cultivo ISP2 que en AIA (Figura 2). El número de morfologías de actinomicetos como respuesta a los tratamientos aplicados y medios de cultivo se comporta de manera diferente entre municipios. Las condiciones donde se obtuvieron mayor diversidad fueron tratamiento térmico a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y AIA, así como testigo y medio ISP2 en los dos municipios del estado de Morelos. A pesar del bajo número de morfologías y de actinomicetos diferentes obtenidos en el con CaCO_3 , se obtuvieron aislados diferentes a los de los tratamientos testigo y térmico, lo cual sugiere un carácter selectivo en los actinomicetos y que estos difieren del encontrado en los otros dos tratamientos.

Se obtuvo un mayor número de morfologías en el tratamiento con CaCO_3 y medio AIA para EZ, resultado que no se observó en MA. La morfología de color amarillo (no. 10) fue la más abundante en los dos municipios y dichos actinomicetos presentan capacidad de ser afines al CaCO_3 y desarrollarse bajo exposición al calor. Se obtuvieron ocho aislados sin clasificación o únicos de los dos municipios, cinco de ellos, se obtuvieron en medio ISP2 y tres en medio AIA, cinco en el tratamiento testigo y tres en el tratamiento térmico.

CONCLUSIONES

La adición del 50% de CaCO_3 a la muestra de suelo redujo el número de actinomicetos aislados en comparación con el número de aislados obtenidos en los tratamientos testigo y temperatura a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y el efecto de este tratamiento en la proliferación de actinomicetos dependió del medio de cultivo y del origen de la muestra. El suelo rizosférico de nardo procedente de Emiliano Zapata (EZ) presentó mayor número de actinomicetos (280) que Mazatepec (MA) (179) y la morfología predominante de estos aislados fue de color amarillo con una tenue coloración amarilla en el medio, este tipo de aislados presentó micelio aéreo blanco y esporulación gris, estos aislados representan el 21% del total de actinomicetos

obtenidos. Se encontró mayor cantidad de actinomicetos únicos en EZ que en MA. Las combinaciones de tratamientos térmico con AIA y testigo en ISP2 permitieron obtener un mayor número de morfologías en los dos municipios de Morelos. Los tratamientos testigo y con CaCO_3 sugieren que se pueden obtener aislados de diferente morfología.

AGRADECIMIENTOS

A proyectos: MOR-2009-C02-120296; AGS-2011-C02-181930, CONACYT 293362 (PLANTECC). AHPA agradece al CONACYT beca para estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Basilio A., González I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology* 95: 814-823.
- Bollen G. J. 1969. The selective effect of heat treatment on the microflora of a greenhouse soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 75: 157-163.
- Bredholdt H., Galatenko O. A., Engelhardt K., Fjaervik E., Terekhova L. P., Zotchev S. B. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology* 9: 2756-2764.
- El-Nakeb M. A., Lechevalier H. A. 1962. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology* 11: 75-77.
- Goodfellow, M. and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review in Microbiology* 37: 189-216.
- Hayakawa M., Nonomura H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* 65: 501-509.
- Hirsch C. F., Ensign C. 1976. Heat activation of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *Journal of Bacteriology* 126: 24-30.
- Malek N.A., Chowdhury A.J.K., Zainuddin Z., Abidin Z.A.Z. 2014. Selective isolation of actinomycetes from mangrove forest of pahang, Malaysia. *International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences (ICABES'14)* Dec. 8-9. Bali, Indonesia.
- Natsume M., Yasui K., Marumo S. 1989. Calcium ion regulates aerial mycelium formation in actinomycetes. *The Journal of Antibiotics* 18: 440-448.
- Oskay M. 2009. Comparison of *Streptomyces* diversity between agricultural and nonagricultural soils by using various culture media. *Scientific Research and Essay* 4: 997-1005.
- Yi N.Z., Amsaveni S. 2012. Isolation, screening and characterization of antibiotic-producing actinomycetes from rhizosphere region of different plants from a farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. *Journal of Advanced Biomedical and Pathobiology* 2: 96-107.

