



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA  
DE LOS METABOLITOS EXTRAIDOS DE  
DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus* sp. AISLADAS  
DEL SUELO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**MARÍA DOLORES LÓPEZ RAMÍREZ**

**DIRECTORA:**

**D.C. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO**

**PUEBLA, PUE.**

**FEBRERO DEL 2016**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por el camino que me ha permitido recorrer y las grandes personas con las que me ha bendecido.

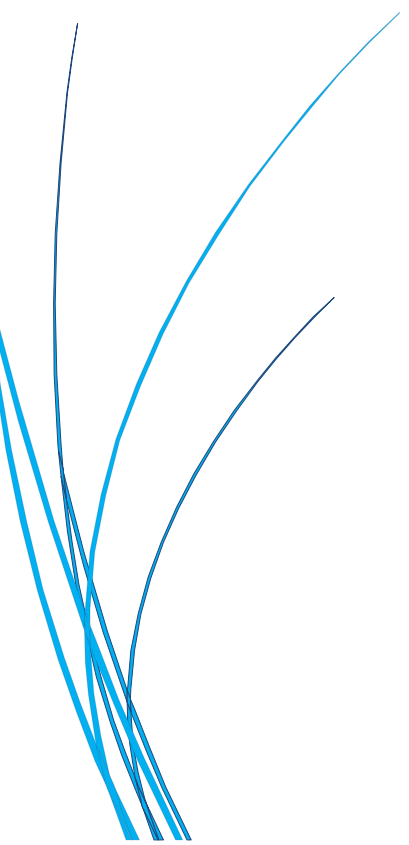
A mis padres, Margarita Ramírez Albino y Doroteo López Hernández por su infinito amor, apoyo y paciencia.

A mis hermanos, Gregorio y Néstor Noé por apoyarme siempre y confiar en mí.

A mi tía, María Alejandra por su gran ayuda y amor.

A mis amigos, Gabriela, Mauro, Luis Víctor, Lizbeth, Berenice, César, Abigail, Demetrio, Itzel y Anahí, por compartir conmigo grandes momentos.

A Runy y Alberto, por quererme tanto.



## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por recibirme y darme la formación durante los años que duró la carrera.

Al laboratorio de Biotecnología microbiana por brindarme las instalaciones y material necesario para el desarrollo de este proyecto; además de permitirme conocer a grandes personas.

A la Vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado por darme su apoyo económico a través del proyecto VIEP 2015.

A la D. C. Estibaliz Sansinenea Royano quien fue asesora en este proyecto, por permitirme trabajar con ella, por su apoyo, comprensión y paciencia.

Al D.C. José Aurelio Ortiz Márquez y al laboratorio de orgánica por su apoyo en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Mauro Israel Almaraz Rosas, Jessica Vaca Calderón, Melanie Ramírez Rojano, Francisco Fidel Salazar de la Luz, Leonor Jazmín Ramos Santos, Ana Celia Juárez Rabanales y Gustavo Rojas Cuatzo.

## ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 GÉNERO <i>Bacillus</i> spp. COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	8
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Bacillus</i> spp.	9
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> COMO ESPECIE BIOCONTROLADORA	12
2.4 <i>Bacillus cereus</i> COMO ESPECIE BIOCONTROLADORA	14
2.5 CONTROL DE FITOPATÓGENOS	14
2.6 HONGOS FITOPATÓGENOS	16
2.7 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO	16
3. MARCO DE REFERENCIA	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. OBJETIVOS	24
7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	25
8. METODOLOGÍA	26
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
10. CONCLUSIONES	52
11. BIBLIOGRAFÍA	54

### 3.- RESUMEN

Diferentes estudios a nivel mundial han demostrado que organismos como las bacterias, hongos, plantas, corales y algas tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios con propiedades biológicas interesantes como la antibacteriana, antifúngica, antitumoral, hipocolesterolémica, inmunosupresora, antiparasitaria, herbicida, insecticida, entre otras. La diversidad bacteriana en particular, ha resultado bastante prometedora, pues los metabolitos secundarios producidos por algunas especies presentan actividad frente a patógenos de plantas y animales y, por tanto, representan una alternativa biotecnológica para la industria, la medicina y la agricultura.

El género bacteriano *Bacillus* spp. es uno de los que más han llamado la atención de la investigación científica debido a su capacidad para producir toxinas, enzimas y metabolitos secundarios con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, estimuladora de crecimiento vegetal y activadora de mecanismos de resistencia en plantas. Por tanto, en este proyecto el objetivo fue extraer metabolitos secundarios de cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* aisladas de diferentes suelos de la República Mexicana, con la finalidad de evaluar su actividad antifúngica frente a los hongos *Bipolaris* sp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp., todos ellos descritos en la literatura como fitopatógenos. Tal actividad antifúngica se evaluó mediante el ensayo de difusión en agar, y los resultados obtenidos evidenciaron que sólo algunas cepas de las especies de *B. thuringiensis* y *B. cereus* son productoras prolíficas de metabolitos secundarios con actividad antifúngica frente a fitopatógenos.

## 2.- MARCO TEÓRICO

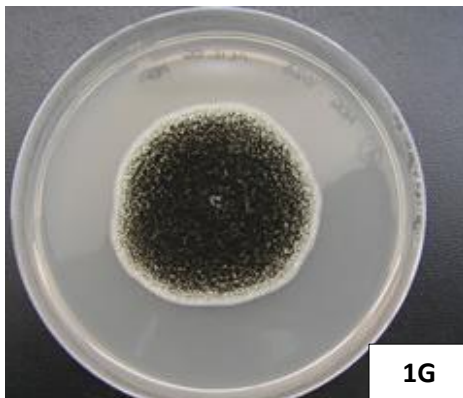
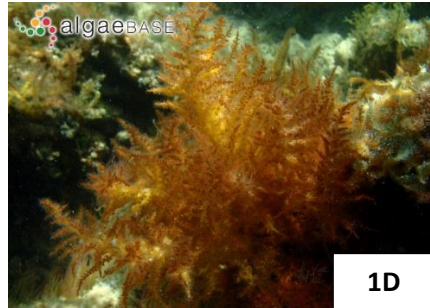
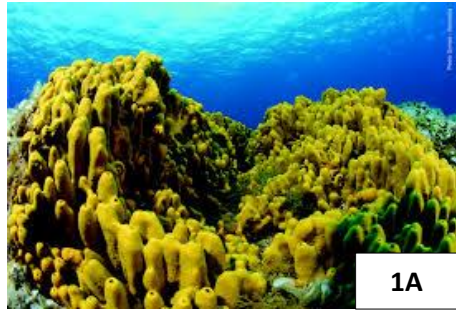
México cuenta con una diversidad biológica que lo hace figurar dentro de los 17 países “megadiversos” del mundo, sin embargo, sólo una pequeña porción de su biodiversidad ha sido explorada con el objetivo de identificar sustancias biológicamente activas como los metabolitos secundarios<sup>1</sup>.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por un grupo muy reducido de organismos terrestres y marinos que incluyen a las bacterias, hongos, plantas, corales, esponjas, ascidias, briozoo y algas<sup>2</sup> (Figura 1). Su producción se lleva a cabo en el metabolismo secundario que inicia con intermediarios metabólicos comunes que pasan por vías enzimáticas codificadas en genes específicos del organismo (de ahí que su síntesis tienda a depender del género, especie e incluso la cepa a la que pertenece). Los metabolitos secundarios se caracterizan también por poseer estructuras sofisticadas, mecanismos de acción complejos y vías de síntesis energéticamente caras; sin embargo, su producción resulta una inversión por parte del organismo productor, pues éstos le pueden servir como un mecanismo de defensa frente a otros organismos o como reguladores de los procesos de diferenciación celular<sup>3</sup>.

La exploración de algunas especies vegetales originarias de México ya ha permitido el aislamiento de metabolitos secundarios con actividades biológicas interesantes, pero es la diversidad microbiana la que ha resultado más atractiva de explorar debido a que organismos como las bacterias y hongos han mostrado un gran potencial como agentes de control biológico y como productores de metabolitos secundarios a los que se les ha dado una aplicación en el campo de la medicina, la industria o la agricultura<sup>4</sup>.

Desde el siglo pasado algunas subdisciplinas de la biotecnología han centrado su atención en la identificación de nuevas especies microbianas que posean la capacidad de sintetizar compuestos bioactivos<sup>5</sup> con los que se puedan crear productos como los siguientes:

- Nuevos antimicrobianos. Antibacterianos, antimicóticos, antivirales y antiparasitarios que atiendan al emergente desarrollo de patógenos multirresistentes y ofrezcan una alternativa a los antimicrobianos actuales que poseen efectos adversos severos<sup>6</sup>.
- Nuevos fármacos distintos a los antimicrobianos. Varios compuestos bioactivos producidos por organismos bacterianos y fúngicos son utilizados actualmente como



**Figura 1.** Ejemplos de organismos productores de metabolitos secundarios. **1A.** *Aplysina aerophoba* (esponja); **1B.** *Bugula neritina* (briozoo); **1C.** *Simularia arborea* (coral); **1D.** *Laurencia grandulifera* (alga); **1E.** *Styela clava* (ascidia); **1F.** *Taraxacum officinale*; **1G.** *Aspergillus niger*; **1H.** *Bacillus licheniformis*.

fármacos antitumorales, antimigrañosos, inmunosupresores, hipocolesterolémicos e inhibidores enzimáticos<sup>7</sup>; sin embargo, es necesario continuar aislando nuevas moléculas que pudieran tener mecanismos más específicos o nuevas propiedades farmacológicas.

- Sustancias de origen natural que puedan utilizarse para la preservación de los alimentos y bebidas. Siendo una alternativa para contrarrestar el uso de conservadores químicos y antibióticos en la alimentación<sup>8</sup>.
- Bioplaguicidas. Altamente específicos contra plagas agrícolas objetivas y que representen el menor riesgo para el medio ambiente y las personas<sup>9</sup>.

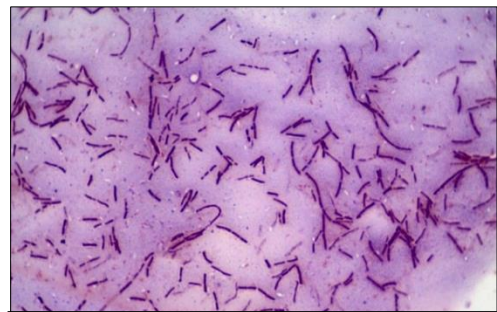
Los bioplaguicidas son unos de los productos más importantes a desarrollar puesto que las enfermedades de las plantas continúan siendo una gran preocupación para la humanidad al afectar la producción agrícola, la industria (alimentaria, cosmética, farmacéutica), la floricultura, el medio ambiente y la economía de los países. Estos productos se desarrollan con base en los agentes microbianos de control biológico o sus derivados como son toxinas y metabolitos secundarios, los cuales pueden ser más eficientes, biodegradables y con menor toxicidad para el ambiente y los organismos que no son blanco<sup>10</sup>.

Diversas investigaciones realizadas a nivel nacional han encontrado ya varias alternativas de control biológico de plagas. Entre los microorganismos que figuran dentro de estas alternativas están los baculovirus, hongos del género *Trichoderma* spp. y especies bacterianas rizósferas. Dentro de estas últimas están algunas pertenecientes al género *Bacillus* spp. como *B. thuringiensis* y *B. cereus*<sup>10,11</sup>.

## 2.1 Género *Bacillus* spp como agente de control biológico

El género bacteriano *Bacillus* spp. incluye a un gran número de especies de bacilos grampositivos, aerobios, móviles, catalasa positiva, de hemólisis variable y con capacidad para formar endosporas de morfología esférica, ovalada, elipsoidal o cilíndrica<sup>12,13</sup> (Figura 2).

Dentro del género *Bacillus* spp. se encuentran especies consideradas buenas candidatas como agentes de control biológico (*B. brevis*, *B.*



**Figura 2.** Tinción de Gram de *Bacillus* sp.

*subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. liqueniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens*, entre otras) debido a que poseen características como las siguientes:

- Son microorganismos altamente ubicuos pues se distribuyen ampliamente en el ambiente, siendo encontrados principalmente en suelos agrícolas, raíces de las plantas, agua dulce y salada, además de materia vegetal en descomposición.
- Poseen la capacidad de esporular que les confiere una alta viabilidad y capacidad de diseminación, pues las esporas pueden transportarse por largas distancias a través de corrientes de aire, hasta encontrar las condiciones óptimas para su crecimiento<sup>14</sup>.
- Presentan potencialidad como solubilizadores de fosfatos y fijadores de nitrógeno atmosférico. Además de que se ha demostrado su utilidad como promotores del crecimiento vegetal<sup>15</sup>.
- Son productores de antibióticos, toxinas, quitinasas, proteasas y metabolitos secundarios. Estos últimos ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana, antiviral, antitumoral, herbicida, insecticida y antiparasitaria; además de que constituyen moléculas estimuladoras de crecimiento vegetal y activadoras de mecanismos de resistencia en plantas<sup>12</sup>.

El potencial de algunas especies del género *Bacillus* spp. consideradas agentes de control biológico de fitopatógenos, recae principalmente en su capacidad para secretar una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana<sup>14</sup>.

## **2.2 Metabolitos secundarios de *Bacillus* spp.**

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por especies de *Bacillus* spp. se encuentran cuatro familias: bacteriocinas, lantibióticos, lipopéptidos y policétidos<sup>12</sup>.

La producción de estos metabolitos es muy sensible a factores ambientales o a las condiciones de cultivo, y por tanto, su producción *in vitro* depende de la composición del medio de cultivo en el que se hace crecer al microorganismo productor<sup>16</sup>.

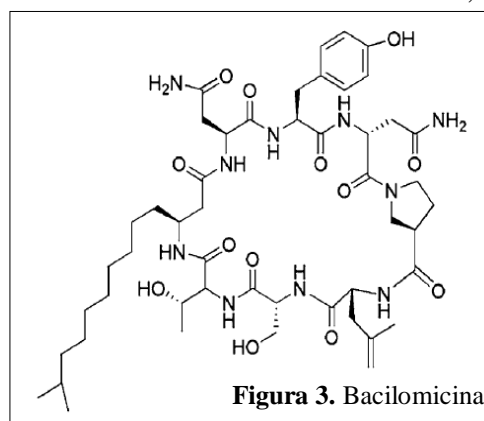
Las bacteriocinas son péptidos con actividad bactericida que son producidos por síntesis ribosomal y segregados por un gran número de especies bacterianas como un mecanismo para inhibir el crecimiento de otras bacterias con las que compiten por el espacio y la fuente de nutrientes<sup>17</sup>. Pueden presentar pesos moleculares, propiedades bioquímicas, espectros y mecanismos de acción variables<sup>12</sup>. Diversas especies del género *Bacillus* spp. producen bacteriocinas como la liquenina, megacina, coagulina y cereina. Algunos de estos péptidos y

otros producidos por bacterias ácido lácticas, han mostrado una gran capacidad para el control de bacterias patógenas de los alimentos, hecho que ha permitido su empleo como bioconservadores de alimentos y bebidas. Las bacteriocinas también han sido empleadas como agentes de control biológico de bacterias fitopatógenas y como precursores de antibióticos<sup>18</sup>.

Los lantibióticos son péptidos antibióticos dentro de los que se encuentran a la subtilina y bacilisina. La primera es un lantibiótico pentacíclico de 32 aminoácidos producido por *B. subtilis*. La segunda, por su parte, es un dipéptido compuesto de L-alanina y el aminoácido inusual L-anticapsina en el que recae su actividad antibiótica, pues éste es liberado por acción de las peptidasas y entra a las células susceptibles a través de permeasas, siendo conocida por su actividad antibacteriana y antifúngica. Existen otros lantibióticos tales como mersacidina, sublancina, subtilosina A y ericina<sup>12</sup>.

Los lipopéptidos son compuestos anfifílicos sintetizados no ribosómicamente que exhiben un amplio espectro antimicrobiano debido a su actividad surfactante. Comparten una estructura cíclica común que consiste en un ácido graso  $\beta$ -amino o  $\beta$ -hidroxilo integrado a un residuo peptídico. Las diferencias en la secuencia aminoacídica y la ramificación del ácido graso permiten la clasificación de los lipopéptidos en tres familias llamadas iturinas, fengicinas y surfactinas<sup>19</sup>.

- Iturinas: Son un grupo de heptapéptidos unidos a ácidos grasos  $\beta$ -amino que se caracterizan por exhibir una alta actividad antifúngica y moderada actividad antibacteriana. Dentro de esta familia están la iturina A, la micosubtilina y la bacilomicina (Figura 3). Su mecanismo de acción consiste en interactuar con las membranas



fúngicas, creando canales transmembrana que permiten la liberación de iones vitales e impiden el crecimiento de los hongos. La iturina A muestra específicamente una fuerte actividad antibacteriana y un amplio espectro antifúngico, haciéndolo un ideal y potente agente de control biológico. La bacilomicina y micosubtilina poseen una actividad antifúngica poderosa y la capacidad de suprimir el crecimiento de hongos fitopatógenos<sup>20</sup>.

- Fengicinas: Son decapeptidos con un ácido graso  $\beta$ -hidroxilo que muestra propiedades inusuales como resultado de la presencia de ornitina en la porción peptídica. Presentan actividad antifúngica principalmente frente a hongos filamentosos<sup>19</sup>.

- Surfactinas: Consisten en heptapeptidos que contienen un ácido graso  $\beta$ -hidroxilo con un número de carbonos que va de los 13 a los 15 (Figura 4). Muestran amplia actividad antiviral y anti-micoplásmica pero moderada actividad antifúngica. Poseen una actividad biosurfactante excepcional que provoca daños subletales a nivel de la membrana de

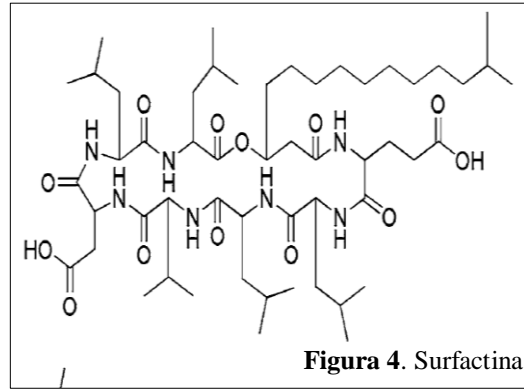


Figura 4. Surfactina

los microorganismos sensibles, permitiendo así, un acceso más fácil a las iturinas; por lo anterior se dice que las surfactinas e iturinas muestran una actividad sinérgica<sup>20</sup>.

Los policétidos forman otra familia de los metabolitos secundarios que poseen relevantes actividades biológicas. Su síntesis es de tipo no ribosomal mediante vías que inician con precursores del acetyl-CoA<sup>12</sup>. Dentro de los policétidos se encuentran la difigidina y las macrolactinas. La difigidina presenta una amplia actividad antibacteriana debido a que inhibe la síntesis proteica. Las macrolactinas son otros metabolitos con actividad antibacteriana; se han descrito al menos 17 de ellas, siendo la macrolactina A una de las más importantes

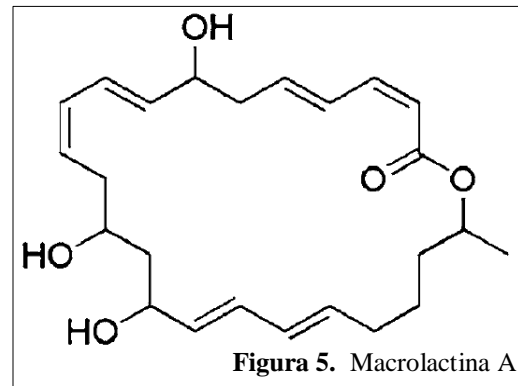


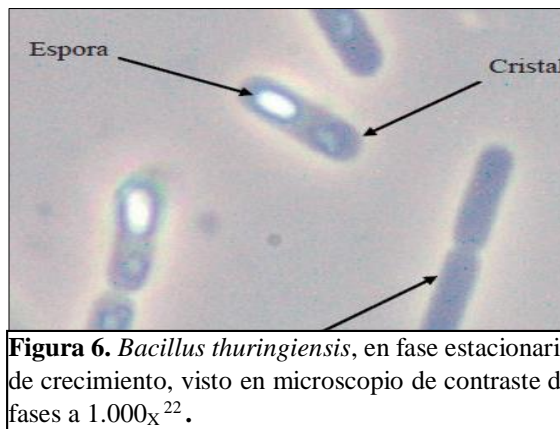
Figura 5. Macrolactina A

debido a su efectividad contra patógenos Grampositivos<sup>21</sup> (Figura 5).

Una de las especies del género *Bacillus* spp. más reconocidas por su potencial como agente de control biológico es *B. thuringiensis*. Esta propiedad recae principalmente en su capacidad para sintetizar toxinas, enzimas y metabolitos secundarios que actúan contra otras bacterias, hongos, insectos y nemátodos. *B. cereus* es también una especie poseedora de propiedades como las de *B. thuringiensis* pero no muy aplicada como agente de control biológico<sup>14</sup>.

### 2.3 *Bacillus thuringiensis* como especie biocontroladora

*B. thuringiensis* es un ejemplo de agente de control biológico, cuyo hábitat principal es el suelo, donde es considerado parte de la población bacteriana zimógena, aunque también ha sido aislada de superficies de plantas y cadáveres de insectos<sup>12</sup>. Su ciclo de vida es relativamente sencillo. Cuando los nutrientes y las condiciones ambientales son suficientes para crecer, las esporas germinan produciendo células vegetativas que crecen y se reproducen por fisión binaria. Las células continúan multiplicándose hasta que uno o más nutrientes se vuelven insuficientes para continuar su crecimiento vegetativo. Bajo esas condiciones, la bacteria esporula produciendo una endospora y un cuerpo parasporal o cuerpo de inclusión (cristal) en donde radica su actividad bioinsecticida (Figura 6).

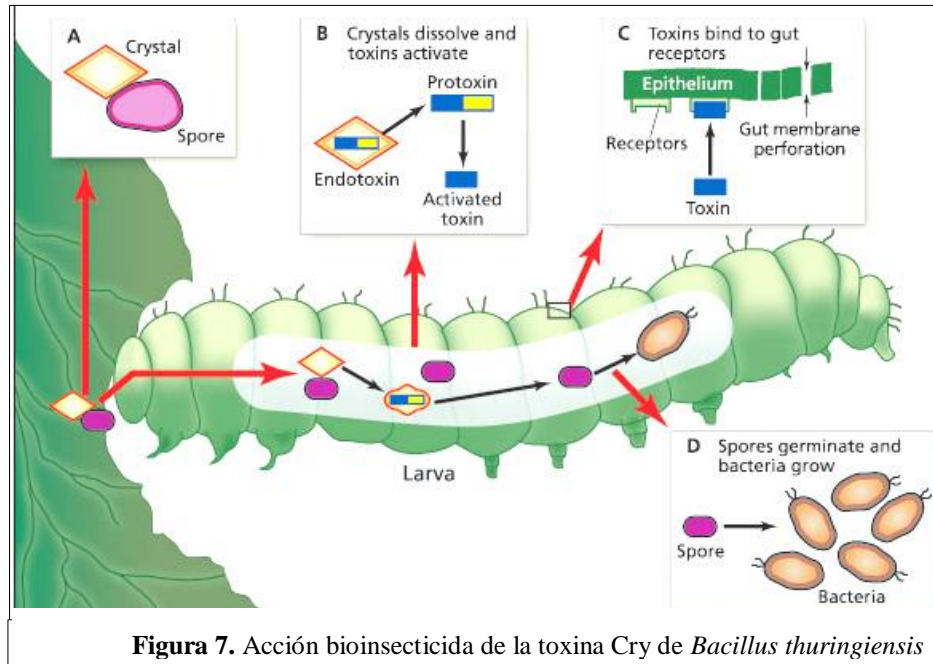


**Figura 6.** *Bacillus thuringiensis*, en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de contraste de fases a 1.000x<sup>22</sup>.

Como ya se había mencionada, *B. thuringiensis* es una especie bien conocida por su actividad bioinsecticida frente a estadios larvarios de algunos organismos pertenecientes al orden de los lepidópteros, dípteros, coleópteros e himenópteros<sup>22</sup>.

Un mecanismo de acción bioinsecticida de *B. thuringiensis* consiste en la ingesta de los cristales formados durante su fase de esporulación. Estos cristales están formados por unas pro-toxinas llamadas Cry, los cuales se solubilizan en el ambiente alcalino del intestino medio, y esto da paso a la activación de las pro-toxinas mediante su digestión proteolítica. Las toxinas Cry ya activas se unen a los receptores (glicoproteínas o glicolípidos) localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio<sup>23</sup>. Para algunas toxinas se han descrito al menos cuatro diferentes sitios de unión en diferentes insectos del orden lepidóptero: una proteína tipo caderina (CADR), una *N*-aminopeptidasa (APN) anclada a glicosil fosfatidil-inositol (GPI), una fosfatasa alcalina anclada a GPI (ALP) y una proteína glicoconjugada<sup>24</sup>. Después de la unión, la toxina adopta una conformación que permite su inserción en la membrana celular y su posterior oligomerización que da paso a la formación de poros<sup>25</sup>. Los poros formados permiten el paso de diversos cationes monovalentes hacia el interior de las células intestinales provocando la despolarización de la membrana plasmática

y la entrada de agua hasta la lisis celular. Cuando un número suficiente de células se han destruido, el epitelio del intestino medio pierde su integridad, se da una colonización de los tejidos del insecto y éste muere a causa de una septicemia<sup>23</sup> (Figura 7).

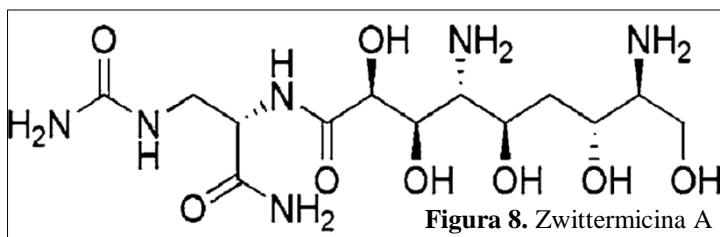


**Figura 7.** Acción bioinsecticida de la toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*

Otro mecanismo bioinsecticida de *B. thuringiensis* comienza cuando sus esporas son ingeridas por las larvas y llegan al intestino para comenzar su proceso de germinación. Las células vegetativas resultantes modifican su superficie celular y sintetizan péptidos antimicrobianos (PAMs) para protegerse de las sustancias antibióticas sintetizadas por la propia larva y por las bacterias habitantes de su intestino<sup>26</sup>. Frecuentemente la presencia de *B. thuringiensis* en el intestino puede producir la parálisis del intestino medio que detiene la alimentación y evita su salida por acción del movimiento peristáltico. Posteriormente, da paso al ataque de la integridad de la larva mediante la producción de fosfolipasas, sideróforos, enterotoxinas, proteasas como la metaloproteasa InhA2 y quitinasas<sup>27, 28</sup>.

Las quitinasas de *B. thuringiensis* además de producir la degradación de la quitina que forma parte de la membrana que recubre al intestino medio de las larvas<sup>28</sup>, también ejercen su efecto degradante sobre la quitina componente del exoesqueleto de insectos y la pared celular de los hongos. Por tanto, estas enzimas desarrollan funciones de defensa, nutrición y patogénesis<sup>29</sup>.

*B. thuringiensis* es también una cepa productora de metabolitos secundarios como la melanina, zwittermicina A (Figura 8), bacteriocinas y sideróforos. La zwittermicina A es un poderoso antibiótico y antifúngico, y un potenciador de la actividad insecticida de las proteínas Cry. La turicina, toquicina, entomocina y bacturicina son ejemplos de las bacteriocinas que produce, las cuales presentan variados espectros de actividad antimicrobiana. Por otro lado, la bacilibactina y petrobactina son ejemplos de sus sideróforos que actúan como quelantes del ion hierro y lo introducen a su interior<sup>12</sup>.



#### 2.4 *Bacillus cereus* como especie biocontroladora

Al igual que otras especies del género *Bacillus* spp. *B. cereus* se encuentra en el suelo y se puede aislar de paja y arroz. De hecho, es fenotípica y genotípicamente similar a *B. thuringiensis*<sup>30</sup>, la única diferencia establecida entre ambas bacterias es el contenido en sus plásmidos, por ejemplo, la presencia de plásmidos que codifican las toxinas insecticidas de *B. thuringiensis*<sup>31</sup>. Es por esto que *B. cereus* no tiene la capacidad de sintetizar toxinas con actividad insecticida pero sí tiene la capacidad de producir enzimas proteasas y quitinasas con actividad sobre la quitina componente de insectos y paredes celulares de hongos<sup>32</sup>; asimismo, puede producir metabolitos secundarios como la zwittermicina A, sideróforos como bacilibactina y petrobactina, bacteriocinas como turicina y entomocina, además de toxinas involucradas en los procesos infecciosos que producen a nivel gastrointestinal<sup>12</sup>.

Como ya se ha mostrado anteriormente, las enzimas, toxinas y metabolitos secundarios secretados por especies del género *Bacillus* spp. las hacen aptas para su uso como agentes de control biológico de organismos fitopatógenos<sup>14</sup>.

#### 2.5 Control de fitopatógenos

Se estima que anualmente, al menos el 10% de la producción agrícola mundial se pierde debido a enfermedades pre y pos-cosecha<sup>33</sup>. Patógenos como los virus, bacterias, nemátodos, insectos y hongos son los principales causantes de las enfermedades pre-cosecha; mientras que en la post-cosecha están involucrados factores como la senescencia, la transpiración, infecciones fúngicas, daños mecánicos, estado fisiológico e inadecuado almacenamiento<sup>20</sup>.

Los problemas fitosanitarios causados por patógenos son los que más causan preocupación para la humanidad, pues acarrear consecuencias como las siguientes: 1) el compromiso de la seguridad alimentaria de los países, principalmente la de aquellos en vías de desarrollo donde hay un rápido crecimiento de la población, una pobreza endémica y, por tanto, una escasez de recursos dirigidos al estudio y tratamiento de estas enfermedades; 2) incremento de los costos de producción agrícola, pues existe la necesidad de implementar estrategias adicionales para el control de los organismos patógenos y la disminución de su efecto sobre las cosechas; 3) pérdidas posteriores a la cosecha por afección durante el almacenamiento y la comercialización; 4) daño a materias primas de origen vegetal usadas en la producción de fármacos, cosméticos y alimentos; 5) daños ambientales pues el tratamiento químico convencional de estos patógenos afecta a la vida silvestre, polinizadores, enemigos naturales de los patógenos; la calidad del agua y el suelo, además de que genera especies altamente resistentes a los tratamientos convencionales; 6) daños sociales, ya que el uso de plaguicidas se asocia a intoxicaciones y muerte de agricultores así como a efectos cancerígenos y teratogénicos<sup>10,34</sup>.

Actualmente, con el objetivo de prevenir las enfermedades producidas por organismos patógenos en los cultivos, se ha recurrido a medidas como el aislamiento de las plantas, la selección de prácticas de cultivo apropiadas, el uso de variedades resistentes a enfermedades, así como el uso de agentes de control químico (aún con sus consecuencias), físico y biológico<sup>35</sup>. El control biológico es una práctica amigable con el ambiente, pues consiste en enfrentar al patógeno directamente con su “enemigo” natural y/o sus metabolitos secundarios, para así generar su eliminación en el cultivo<sup>36</sup>. Otro beneficio de los agentes de control biológico es que no sólo actúan sobre la planta viva, sino que mantienen sus efectos durante la etapa de post-cosecha del producto y su almacenamiento<sup>34</sup>. Los estudios con bacterias para el control biológico de enfermedades y la estimulación del crecimiento vegetal se han enfocado a especies rizósferas, especialmente algunas pertenecientes al género *Bacillus* spp. debido a su capacidad para producir toxinas, enzimas hidrolasas y metabolitos secundarios con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, estimuladora de crecimiento vegetal y activadora de mecanismos de resistencia en plantas.

Es por ello que se debe aprovechar el potencial de los agentes de biocontrol para la contención de los organismos fitopatógenos, pues estos son los organismos responsables del

50% de las enfermedades pre y post-cosechas, y su incidencia va en aumento debido a que su control se dificulta como resultado de su variabilidad genotípica, además del desarrollo de mecanismos de patogenicidad y de resistencia<sup>35</sup>.

## **2.6 Hongos fitopatógenos**

Los hongos fitopatógenos son aquellos que causan daño a los productos agrícolas antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento<sup>37</sup>. Su alta proliferación y propagación, así como su periodo corto de latencia y su capacidad para secuestrar nutrientes y producir compuestos fitotóxicos, son algunas de las razones por las que causan daño a las plantas y sus productos<sup>33</sup>. Es preciso mencionar que hay otros factores ajenos a los hongos que también favorecen las infecciones, como son las condiciones ambientales (climáticas y de almacenamiento) y la ausencia de resistencia a patógenos por parte de las plantas<sup>34</sup>.

Los hongos fitopatógenos pueden ser clasificados en dos tipos según su sitio de infección: aquellos que infectan a las hojas, tallos y productos, y aquellos que proliferan en la raíz de la planta<sup>38</sup>. Los síntomas que producen las infecciones causadas por hongos en las plantas pueden ser manchas foliares, putrefacción y tumoraciones de la raíz. Estos síntomas a largo plazo pueden llevar a la atrofia de la planta, disminución de su vitalidad, improductividad y su muerte<sup>39</sup>.

Una amplia gama de hongos ha sido caracterizada como causante del deterioro de productos agrícolas, siendo los más comunes los integrantes de los géneros *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Diplodia* spp., *Monilinia* spp., *Penicillium* spp., *Colleototrichum* spp., *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., y *Mucor* spp<sup>39</sup>.

Los hongos patógenos de las plantas normalmente no causan enfermedades a los humanos y animales; sin embargo, les pueden ser peligrosos debido a que producen unos metabolitos tóxicos llamados micotoxinas que se pueden acumular en materiales o alimentos de origen vegetal y de esta manera estar en contacto con ellos y producirles algún daño<sup>34</sup>. La producción de las toxinas puede ocurrir durante el cultivo, la cosecha o el almacenamiento de los granos y forraje cuando las condiciones ambientales son favorables (temperaturas altas y humedad). Las micotoxinas más significativas son las aflatoxinas (AFT), cratoxinas A y B (OT), deoxinivalenol (DON), zearaleone (ZEN), toxina T-2 y las fumonisinas (FBs)<sup>40</sup>.

## **2.7 Descripción de los hongos utilizados en el estudio**

***Mucor* spp.**

Las especies de *Mucor* habitan el suelo pudiendo sobrevivir como esporangiosporas en los cinco centímetros más altos del suelo. Son conocidas por ser patógenos post-cosecha de frutos como la manzana, pera, fresa, durazno, nectarina, guayaba y jitomate (Figura 9). Estos organismos actúan como parásitos de macro y micro heridas causadas en el fruto principalmente durante la manipulación anterior al almacenamiento. Se ha descrito la posibilidad de que sus esporas se propaguen por el agua de los tanques a nivel del suelo, haciendo de ellos otra fuente importante de infección.

La temperatura óptima de crecimiento de las especies de *Mucor* spp. es de 20°C; sin embargo, sus esporangiosporas tienen la capacidad de tolerar bajas temperaturas y por tanto germinan y crecen a temperaturas iguales o inferiores a 0°C, lo que da paso a la pudrición de la fruta aún en almacenamiento frío. Las especies más importantes de este género son *M. piriformis*, *M. mucedo*, *M. hiemalis*, *M. strictus*, *M. racemosus* y *M. circinelloide*<sup>41</sup>.

En México se ha reportado también qué especies del género *Mucor* causan daño al silage de maíz y por tanto disminuyen su valor nutricional<sup>40</sup>.



**Figura 9.** Pudrición de durazno por *Mucor* sp.

### ***Fusarium* spp.**

Las especies de *Fusarium* han sido aisladas de una gran variedad de suelos en muchas regiones climáticas del mundo. Dentro de este género existen diversas especies que son consideradas patógenas pre y post-cosecha de cereales (como el trigo, triticale, sorgo, mijo), tubérculos como la papa y hortalizas<sup>42, 43</sup>. En México causan daño al silage de maíz al igual que las especies de *Mucor* spp<sup>40</sup>.

Las especies de *Fusarium* son conocidas también por producir una amplia variedad de micotoxinas como los tricotecenos, dentro de los que se encuentra al DON (deoxinivalenol), que es el más frecuentemente detectado en granos a nivel mundial. La toxina T-2, así como el tricoteceno A, también forman parte de este grupo y son considerados los más tóxicos. Algunas otras micotoxinas de *Fusarium* son zearalenona, fusacromanona, wormanina y moniliformina<sup>44</sup>. Dentro del género *Fusarium* encontramos a especies de importancia agrícola como: *F. avenaceum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.



**Figura 10.** Marchitez vascular en jitomate (*Solanum lycopersicum*) por *Fusarium oxysporum*

- *Fusarium avenaceum*: es una especie común que habita plantas vivas o muertas y que está ampliamente asociada a la pudrición de las raíces de una gran variedad de cereales. Posee la capacidad de sintetizar micotoxinas como moniliformis, bauvericina y enniantinas<sup>45</sup>.
- *Fusarium oxysporum*: es una especie saprófita abundante en suelo y materia orgánica, además de que se encuentra alrededor del mundo en la rizósfera de muchas especies de plantas. Este hongo tiene numerosas formas especializadas (f.sp.) que pueden ser patógenas o no. Las formas patógenas infectan a un gran rango de plantas causando enfermedades como marchitez vascular y la pudrición de la raíz y bulbos. Entre las plantas que a las que afectan están la de jitomate (*Solanum lycopersicum*)<sup>46</sup>(Figura 10), romero (*Rosmarinus officinalis*)<sup>15</sup>, plátano (*Musa paradisiaca*)<sup>47</sup>, lechuga (*Lactuca sativa*) etc. Las formas no patógenas están presentes en la rizósfera de la planta pero no invaden al sistema vascular<sup>46</sup>.

- *Fusarium equiseti*: es una especie saprófita del suelo asociada a enfermedades que afectan a frutos y tejidos de plantas de importancia económica<sup>48</sup>. En la lista de organismos a los que afecta están cereales (trigo, triticale, maíz, arroz), espárragos, algodón, jitomate, cebolla, melón, comino, ginseng, entre otros<sup>49</sup>. Este hongo infecta a la raíz y corona de las plantas; además de que puede causar deterioros al fruto, tubérculos y semillas. Se sabe también que esta especie es productora de metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) que exhiben actividad cito y fitotóxica<sup>48</sup>.

### ***Penicillium spp.***

Este género cuenta con una variedad de especies consideradas saprófitas del suelo. Su alta ubicuidad lo hace una amenaza para la sanidad de los alimentos, pues algunas especies producen la podredumbre verde y azul en cítricos y la podredumbre azul en manzanas, uvas y peras (Figura 11). De hecho, a escala mundial *Penicillium spp.* es una de las principales causas de podredumbre en cítricos como la naranja. Otra de las características de sus especies es su capacidad para producir toxinas<sup>50</sup>.



**Figura 11.** Podredumbre azul en limón (*Citrus limon*) por *Penicillium sp.*

### ***Bipolaris spp.***

El género *Bipolaris spp.* está formado por especies habitantes del suelo, de las cuales algunas pueden ser fitopatógenas de cereales como el arroz (*Zizania palustris*) y el trigo<sup>51</sup>. Patógenos como *B. zoroquiniana* (Figura 12) pudren a las raíces, causan manchas en las hojas, decaimiento de plántulas y daños a los granos<sup>52</sup>.



**Figura 12.** Conidióforo de *Bipolaris zoroquiniana*

### ***Paecilomyces spp.***

Las especies de *Paecilomyces spp.* se han aislado a partir de suelo, restos vegetales y frutas. Usualmente se le ha considerado como contaminante pero puede infectar tejidos vegetales comprometidos por factores de estrés. Algunas especies de éste género han mostrado también la capacidad de actuar como agentes de control biológico.

Para combatir de manera eficiente estas enfermedades pre y post-cosecha y todas sus consecuencias, es necesaria la identificación rápida y precisa del organismo causal, la

estimación de la severidad de la enfermedad y su efecto en el cultivo, así como la identificación del mecanismo de daño del patógeno<sup>53</sup>.

El control biológico o el uso de microorganismos antagónicos como las bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades pre y post-cosecha<sup>53</sup>. El género *Bacillus* spp. es uno de los que más se han utilizado para el control biológico de fitopatógenos debido a que, como ya se ha mostrado anteriormente, cuenta con el potencial para sintetizar metabolitos con diversas actividades. Asimismo, las características de resistencia de sus endosporas permiten su fácil formulación en productos estables<sup>20</sup>.

### 3.- MARCO DE REFERENCIA

Demain en 1999 comentó que la diversidad bacteriana es una fuente importante de metabolitos secundarios con actividades biológicas interesantes como la antibacteriana, antifúngica, hipocolesterolemica, inmunosupresora, antiparasitaria, herbicida e insecticida, asimismo, indicó que era necesario utilizar estos metabolitos secundarios ya identificados para crear productos con los cuales cubrir diferentes necesidades en el área médica, alimenticia y agrícola<sup>7</sup>. En ésta última área es en donde Strange y Scot en 2005 afirmaron que gran parte de la producción agrícola mundial se pierde debido a enfermedades pre y post-cosecha, siendo los hongos los responsables del 50% de ellas<sup>33</sup>. Sin embargo, Mari y colaboradores, reportaron en 2007 que a nivel mundial es muy importante reducir el uso de fungicidas químicos, de tal manera que es preciso desarrollar métodos de control alternativos que sean compatibles con el medio ambiente y la salud humana<sup>9</sup>.

En 2009 Sherma y colaboradores reportaron que el control biológico o el uso de microorganismos antagónicos como las bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades pre y post-cosecha<sup>48</sup>. Desde 2002, estudios como los de Wulff y colaboradores reportaron que el género *Bacillus* spp. cuenta con el potencial para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana que han utilizados en control biológico de fitopatógenos<sup>55</sup>. Su capacidad para formar endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables<sup>20</sup>.

Romero y colaboradores en el 2006, utilizando la resina adsorbente de Amberlita XAD 16®, lograron extraer, aislar y caracterizar metabolitos secundarios con actividad antibacterial como el compuesto 7-O-malonyl macrolactin A activo contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, y con actividad antifúngica<sup>21</sup>. Seis años después, en 2012, Sierra y colaboradores extraen los metabolitos secundarios de varias cepas bacterianas para evaluar su efecto antibacteriano, antifúngico e insecticida, concluyendo que las cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp. son productoras prolíficas de diversas sustancias bioactivas<sup>4</sup>.

#### 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México, a pesar de ser considerado uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo, no ha enfocado suficientes esfuerzos a la exploración de la diversidad microbiana con el objetivo de identificar cepas productoras de metabolitos secundarios a los que se les pueda dar una aplicación biotecnológica.

La identificación e investigación de metabolitos secundarios con actividades interesantes contribuirá al desarrollo de investigaciones cuya finalidad sea generar productos como antibióticos u otros medicamentos, bioconservadores y bioplaguicidas. El desarrollo de estos últimos es uno de los objetivos más importantes de alcanzar debido a que gran parte de la producción agrícola nacional se ve comprometida por el ataque de organismos patógenos (principalmente hongos).

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta científica:

¿Será posible identificar cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* con la capacidad para producir metabolitos con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp., *Bipolaris* sp. y *Penicillium* sp.?

## 5.- JUSTIFICACIÓN

La pérdida de la producción agrícola debida principalmente al ataque de hongos fitopatógenos es un aspecto que debe ser tratado de manera urgente debido a la importancia que tiene la agricultura en nuestro país en cuanto al cubrimiento de la demanda alimentaria de la población, así como la de exportación. Es necesario entonces el desarrollo de nuevos productos basados en la aplicación de agentes de control biológico de fitopatógenos. El uso de estos productos permitirá sustituir paulatinamente el uso de los plaguicidas químicos tradicionales, lo que dará paso a la protección ambiental y social, así como un aumento en la productividad y la exportación de nuestros productos a otros países por estar libres de contaminantes.

La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y enfermedades de las plantas resulta una alternativa atractiva, pues su aplicación directa, la de sus derivados o sus metabolitos secundarios ya han demostrado ser eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños graves al ambiente. Por lo tanto, en este proyecto se buscó obtener extractos de metabolitos de diferentes cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* y posteriormente evaluar su efecto antifúngico sobre hongos reportados como fitopatógenos.

## 6.- OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

- Evaluar el efecto antifúngico de los diferentes extractos obtenidos de una colección de cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* aisladas de muestras de suelo.

### **Objetivos particulares:**

- Aislamiento e identificación de hongos filamentosos mediante morfología macroscópica y microscópica (microcultivo), de muestras vegetales.
- Obtener extractos secos de una colección de cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* mediante la resina adsorbente Amberlita XAD-16®.
- Evaluar el efecto antifúngico de los diferentes extractos obtenidos de una colección de cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* sobre *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Mucor* sp. y *Bipolaris* sp.

## 7.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- a. Tipo de estudio: Descriptivo, transversal, experimental y prospectivo.
- b. Universo de estudio: Cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* aislados del suelo de diferentes regiones de la República Mexicana.
- c. Tamaño de muestra:
  - 27 cepas de *B. thuringiensis*
  - 23 cepas de *B. cereus*
  - 7 cepas de hongos filamentosos
- d. Sede y lugar de estudio: Laboratorio de biotecnología microbiana. Edificio 105B, ciudad universitaria de la BUAP.
- e. Criterios de selección:
  - Inclusión:
    - Aquellas cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* que mostraron tener un efecto antagónico previo contra las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*.
    - Hongos filamentosos de tipo fitopatógenos necrotróficos no especializados.
- f. Recursos humanos:
  - María Dolores López Ramírez
  - Mauro Israel Almaraz Rosas
  - Estibaliz Sansinenea Royano
- g. Recursos financieros: Beca de Proyecto VIEP 2015
- h. Diseño estadístico: No paramétrica

## 8.- METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el presente proyecto se siguió el diagrama 1.



Diagrama 1. Diagrama general de trabajo

### Organismos bacterianos utilizados

Los organismos bacterianos empleados en este trabajo fueron 27 cepas de *B. thuringiensis* y 23 cepas de *B. cereus*; todas ellas aisladas a partir de muestras de suelo de diversas regiones de la República Mexicana.

Los siete hongos filamentosos utilizados en este estudio son del tipo de los necrotróficos no especializados aislados de diferentes tejidos vegetales.

### Producción y extracción de metabolitos secundarios de las cepas bacterianas

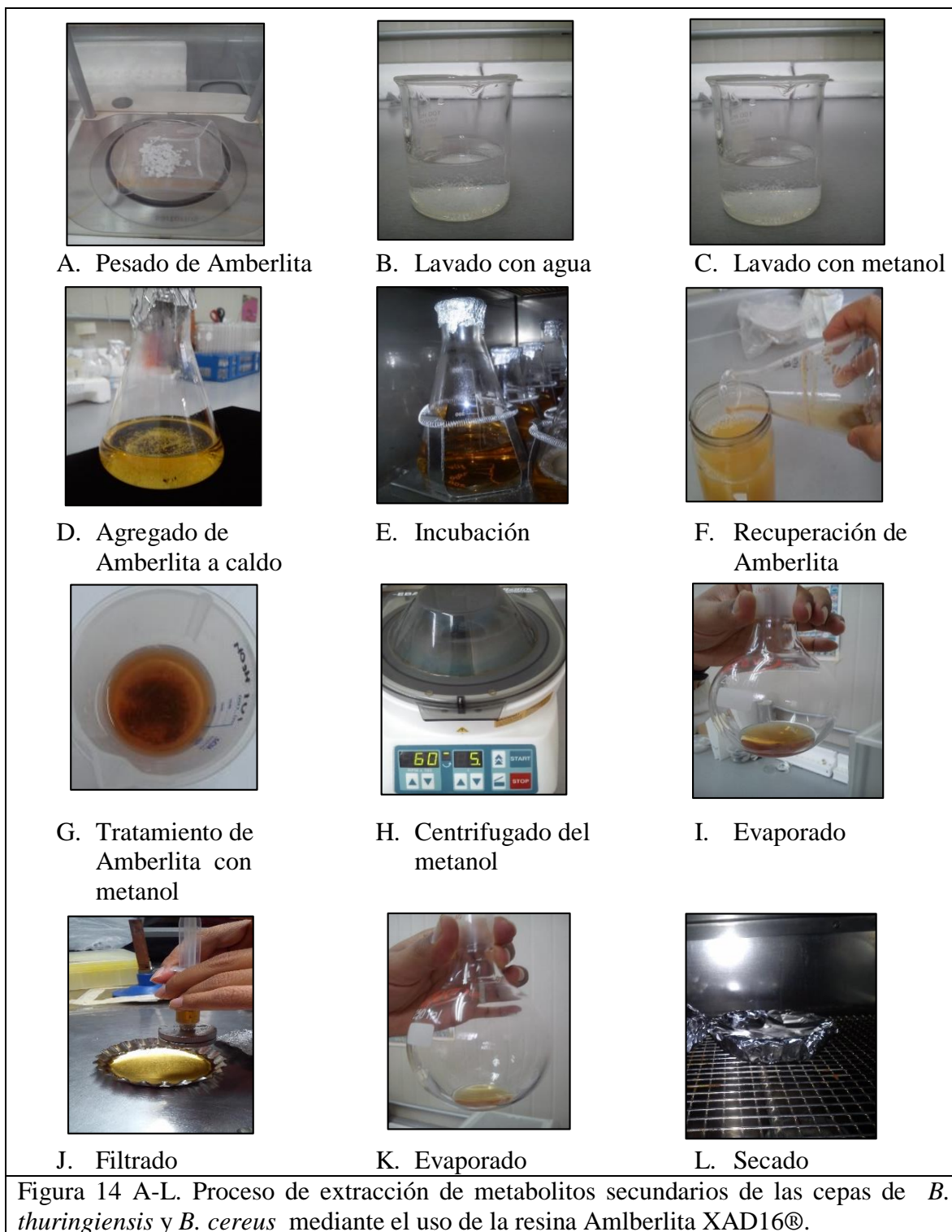
La extracción de los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus* spp. en estudio, se llevó a cabo mediante el uso de la resina Amberlita XAD16N® (Figura 13), la cual es un polímero no iónico e hidrofóbico en forma de pequeñas perlas blancas. Su estructura entrecruzada, su fase continua y porosa, así como su gran área superficial y naturaleza aromática le confieren la capacidad de adsorber moléculas hidrofóbicas de bajo y mediano peso molecular a partir de solventes polares. Las



**Figura 13.** Resina Amberlita XAD16N

resinas adsorbentes han ganado una importancia significativa en el área de recuperación de compuestos y particularmente antibióticos debido a las ventajas durante procesos de producción y recuperación de bioproductos<sup>49</sup>, siendo utilizadas con éxito en la identificación y caracterización de antibióticos<sup>21</sup>. En este estudio se utilizaron 0.5 g de amberlita por cada 100 mL de caldo de cultivo tripticaseína de soya. La resina se lavó con 50 mL de agua destilada y agitó constantemente durante 30 minutos con el objetivo de retirar las sales que contiene como conservadores. Posteriormente, la resina se lavó con 50 mL de metanol y agitó por media hora más para activarla y poder así introducirla en el caldo al que previamente se inoculó con una asada de la cepa de *B. thuringiensis* o *B. cereus* (Figura 14 A-D). El cultivo se incubó a 29°C durante 7 días con una agitación de 200 rpm, esto con el objetivo de que la cepa llegara a su fase estacionaria y excretara los metabolitos secundarios. Después de este tiempo, se recuperó la Amberlita por decantación y se colocó en un vaso de precipitado con 60 mL de metanol, se agitó continuamente durante 20 minutos aproximadamente, hasta que la Amberlita quedó de color blanco nuevamente y el metanol se hubiera coloreado. Este metanol se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm con el propósito de obtener un sobrenadante casi libre de células bacterianas. El sobrenadante, se colocó en matraz de bola para evaporar hasta tener aproximadamente 10 mL del extracto, el cual se filtró con membranas de 0.45 µm para eliminar esporas y células. Se evaporó nuevamente hasta obtener aproximadamente 4 mL del extracto y éste se colocó en recipientes individuales etiquetados que fueron llevados a la estufa de secado durante 24 horas a 29 °C. Pasado este tiempo se verificó que los residuos estuvieran completamente secos. Se rasparon los residuos del

recipiente para obtener el sólido del extracto y una vez obtenidos, se guardaron en tubos rotulados (Figura 14 E-L).



### Muestreo de hongos filamentosos:

Se recolectaron muestras de origen vegetal como antófilos (pétalos), cubiertas de frutos y vegetales que presentaran zonas infectadas con crecimiento miceliar y que pudieran ir acompañados de síntomas como manchas cloróticas (de color diferente al normal), marchitez, sequedad o putrefacción. Estas muestras se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético y rotularon para su transporte al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se tomó una pequeña parte del micelio con una asa micológica y se depositó en una placa de agar papa y dextrosa (APD) para su incubación a 25°C por 5 días. En los siguientes días se observó si hubo crecimiento de hongos. Posteriormente se realizaron las resiembras necesarias hasta lograr el aislamiento de colonias.

### Identificación de hongos filamentosos

La identificación de los hongos a nivel de género requirió de la observación de su morfología macro y microscópica, para ello los hongos se cultivaron en APD a 25°C por 7 días. Después de este tiempo, se identificaron las características de las colonias, como son el aspecto, pigmentación, difusión del pigmento al medio, bordes, diámetro, forma de crecimiento y micelio vegetativo.

Para la observación de la morfología microscópica del hongo fue necesario realizar un microcultivo (técnica de Ridell modificada). Esta técnica requiere de colocar dos palitos de madera estériles en forma de “V” dentro de una placa petri vacía. Posteriormente colocar un portaobjetos estéril sobre los palitos de madera, y proceder a cortar un cubo (1 cm<sup>2</sup> de superficie y 20 mm de espesor) de a ADP. Éste último se coloca sobre el portaobjetos, y con un asa micológica se inocular una pequeña porción del hongo en cada uno de los lados del cubo de agar. Se coloca un cubreobjetos sobre el agar y se verifica que se haya adherido. Finalmente se agregan 5 mL de glicerol estéril al 10% en el fondo de la placa y se incuba a 25°C hasta observar crecimiento.

Cuando ya se observa crecimiento miceliar debajo del cubreobjetos, este se desprende y se coloca sobre un portaobjetos al que previamente se le ha colocado una gota de azul de lactofenol. Esta nueva preparación se sella y se observa a microscopio con los objetivos de 10x y 40x, procediendo a observar estructuras fúngicas como hifas y esporas.

### Preparación de las soluciones de extractos

Se prepararon soluciones de 30 mg de extracto seco con 100  $\mu$ L de agua destilada estéril (Figura 15). Antes de someter las soluciones a las pruebas de difusión en agar, es preciso realizarles control de calidad para observar que no estén contaminadas aún con esporas bacterianas. Para esto se empaparon discos de papel filtro estéril con cada una de las soluciones y se colocaron en una placa de agar LB (Luria Bertani) para incubarlas a 29°C por 24 horas. En caso de observarse crecimiento bacteriano alrededor de los discos, se procedió a preparar nuevamente la solución y someterla al mismo procedimiento de control de calidad. Cuando las nuevas soluciones mostraban crecimiento bacteriano, esto indicaba que el extracto seco era el contaminado, por lo que era necesario agregar aproximadamente 4 mL de metanol, disolver el extracto y repetir el proceso de filtrado y secado.



**Figura 15.** Pesado de extracto y preparación de solución acuosa del extracto.

#### Preparación de suspensión de esporas

Se sembró un pequeño fragmento del hongo en el centro de una placa con medio ADP y se incubó a 25°C por 5 días. Con un asa micológica se tomó una pequeña porción de la superficie miceliar del hongo y se colocó en un tubo Falcon con 6 mL de caldo LB. La fracción de hongo inoculada al tubo se desintegró suavemente con ayuda del asa. Se agitó vigorosamente por 30 segundos en un ángulo de 45° y se dejó en reposo en una gradilla para conseguir que las esporas se separaran de las hifas y se mantuvieran en el sobrenadante.

#### Evaluación del efecto antifúngico de los metabolitos extraídos de las cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus*

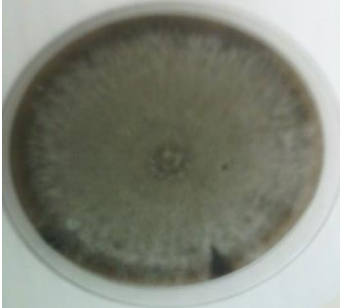

La actividad antifúngica se determinó con el método de difusión en agar. Con un asa de vidrio se esparcieron 100  $\mu$ L de la suspensión de esporas de un hongo sobre la superficie de una placa de medio ADP de 100 x 15 mm. Por otro lado, con las soluciones preparadas con los extractos de cada cepa de *B. thuringiensis* o *B. cereus* se impregnaron discos de papel filtro


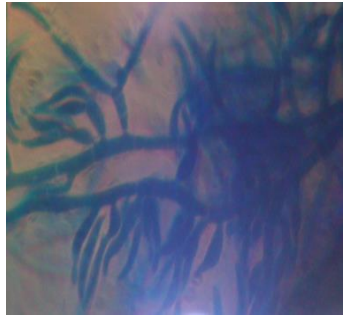

estéril. Estos discos se colocaron en las placas que fueron esparcidas con las suspensiones de esporas de los diferentes hongos. Las placas se incubaron a 29°C durante 48 horas. Como control negativo se puso un disco de papel filtro con metanol y como control positivo un disco impregnado con una solución de miconazol. En los días siguientes se observó si había crecimiento del hongo, y en tales casos, se registró el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos.

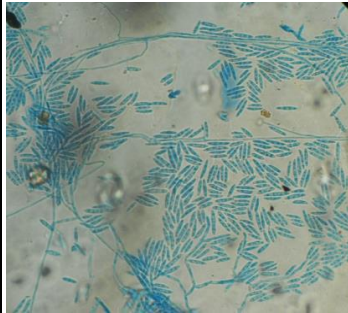


## 9.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS


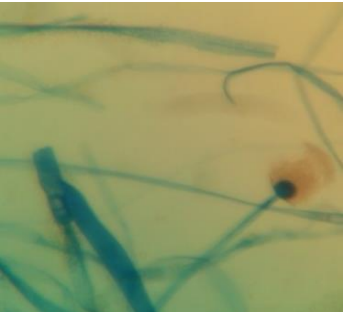
### Aislamiento e identificación de hongos filamentosos



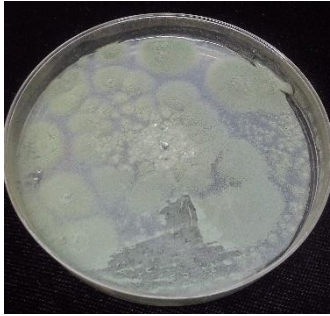
Se identificaron siete hongos filamentosos aislados a partir de tejidos vegetales siguiendo la metodología antes descrita. En la Tabla 1 se muestran sus nombres, morfologías macro y microscópica, así como sus sitios de aislamiento.


<b>Tabla 1.</b> Morfología macro y microscópica de los hongos fitopatógenos aislados a partir de tejidos vegetales.		
<b>Nombre científico</b>	<b>Morfologías</b>	
<b><i>Bipolaris</i> sp.</b>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Colonias aterciopeladas, planas y en ocasiones forman un velo blanco</p> <p>Pigmentación: Verde oliva que tiende al gris y negro</p> <p>Difusión del pigmento al medio: Presenta pigmento café oscuro que difunde al medio</p> <p>Bordes: Regulares con un color verde oliva más obscuro que el del centro</p> <p>Crecimiento: Rápido y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Verde oscuro que tiende al negro</p> 
	<b>Microscópica</b>	<p>Micelio: Septado, macrosifonado y oscuro</p> <p>Forma de reproducción: Asexuada</p> <p>Produce macroconidios con septos transversales, elípticos, de pared gruesa y con superficie lisa</p> 
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Flor de <i>Euphorbia pulcherrima</i> (Noche buena)</p> <p>Sitio de aislamiento: Antófilo (Pétalo de flor)</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento micelial color blanco, verde y café de aspecto aterciopelado en la parte media del pétalo; en las zonas aledañas mostraba puntos blancos polvosos, decoloración y regiones casi marchitas</p>

<i>Fusarium avenaceum</i>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Algodonoso</p> <p>Pigmentación: Amarillo en la parte media y blanco en el contorno</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Regulares de color blanco</p> <p>Crecimiento: Lento y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Amarillo</p>	
	<b>Microscópica</b>	<p>Morfología microscópica</p> <p>Micelio: Hialino, septado y macrosifonado</p> <p>Forma de reproducción: Asexuada</p> <p>Presenta conidióforos cortos que se agrupan en racimos. Los macroconidios son curvados y puntiagudos en los extremo; se encuentran agrupados o libres</p>	
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Flor de <i>Euphorbia pulcherrima</i></p> <p>Sitio de aislamiento: Antófilo (Pétalo de flor)</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento micelial color blanco, verde y café de aspecto aterciopelado en la parte media del pétalo; en las zonas aledañas mostraba puntos blancos polvosos, decoloración y regiones casi marchitas</p>	
<i>Fusarium equiseti</i>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Aterciopelado</p> <p>Pigmentación: Naranja</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Regulares de color blanco</p> <p>Crecimiento: Lento y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Naranja</p>	

	<b>Microscópica</b>	<p>Morfología microscópica</p> <p>Micelio: Septado, hialino y macrosifonado</p> <p>Forma de reproducción: Asexual</p> <p>Presenta macroconidios curvados y puntiagudos en los extremos; se encuentran agrupados o libres</p>	
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Fruto de <i>Cucumis melo</i> (melón)</p> <p>Sitio de aislamiento: Epicarpio y tálamo (cáscara)</p> <p>Síntomas del tejido: Regiones con crecimiento micelial de color anaranjado y aspecto atorcipelado compacto. Regiones aledañas mostraban deformación, ablandamiento y palidez</p>	
<b><i>Fusarium oxysporum</i></b>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Algodonoso</p> <p>Pigmentación: Blanco en la periferia y púrpura en el centro</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Regulares de color blanco</p> <p>Crecimiento: Rápido y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Blanco</p>	
	<b>Microscópica</b>	<p>Micelio: hialino, septado y macrosifonado.</p> <p>Forma de reproducción: Asexuada</p> <p>Presenta conidióforos cortos que se agrupan en racimos. Los macroconidios son curvados, puntiagudos en los extremos y principalmente triceptados. Las microconidias son abundantes, principalmente no septadas, elipsoidales a cilíndricas, rectas y poco curvadas</p>	

	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Fruto de <i>Allium cepa</i> (cebolla)</p> <p>Sitio de aislamiento: Hojas externas del bulbo</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento micelial filamentososo de color blanco con ligera pigmentación púrpura. La región que rodeaba al crecimiento del hongo se mostraba obscura indicando necrosis</p>	
<b><i>Mucor</i> sp.</b>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Velloso, algodonoso y seco</p> <p>Pigmentación: Blanco en su totalidad durante los primeros 2 o 3 días, posteriormente toma una totalidad blanco-grisácea</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Irregulares</p> <p>Crecimiento: Rápido y extendido</p> <p>Micelio vegetativo: Blanco</p>	
	<b>Microscópica</b>	<p>Micelio: cenocítico, hialino y macrosifonado (4-8µm)</p> <p>Forma de reproducción: Asexuada</p> <p>Esporangioforos erectos (20-80µm de diámetro) y simples que forman esporangios multiesporados, largos, terminales y globosos. Las esporangiosporas son hialinas, globosas (3-5µm de diámetro) y de pared lisa</p>	
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Fruto de <i>Psidium guajaba</i> (guayaba)</p> <p>Sitio de aislamiento: Epicarpio (cáscara)</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento filamentososo blanco en aproximadamente un tercio de la superficie del fruto. Madurez y ablandamiento del fruto</p>	

<b><i>Paecilomyces</i> sp.</b>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Polvoso</p> <p>Pigmentación: Verde en el centro de la colonia y café en el contorno</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Irregulares</p> <p>Crecimiento: Rápido y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Café</p>	
	<b>Microscópica</b>	<p>Micelio: septado, hialino y macrosifonado</p> <p>Forma de reproducción: asexuada</p> <p>Conidióforos hialinos, erectos, ramificados apicalmente soportando conidias en las fiálides terminales. Las fiálides tienen una disposición vertical y su base es cilíndrica</p>	
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Flor de <i>Euphorbia pulcherrima</i></p> <p>Sitio de aislamiento: Antófilo (pétalo de flor)</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento micelial color café y aspecto polvoso en la parte media del pétalo; en las zonas aledañas mostraba puntos blancos polvosos, decoloración y regiones casi marchitas.</p>	
<b><i>Penicillium</i> sp.</b>	<b>Macroscópica</b>	<p>Aspecto: Polvoso</p> <p>Pigmentación: Verde que tiende al café en el centro y halo blanco en el contorno</p> <p>Difusión del pigmento al medio: No</p> <p>Bordes: Regulares de color blanco</p> <p>Crecimiento: Rápido y radial</p> <p>Micelio vegetativo: Verde que tiende al café</p>	

	<b>Microscópica</b>	<p>Micelio: Septado, hialino y macrosifonado (2-4<math>\mu</math>m)</p> <p>Forma de reproducción: Asexuada</p> <p>Conidióforo hialino y largo de 5-10<math>\mu</math>m que contiene varias fiálides agrupadas</p> <p>Microconidios redondos que miden de 1-3<math>\mu</math>m de diámetro</p>	
	<b>Fuente de obtención</b>	<p>Tejido vegetal: Fruto de <i>Citrus sinensis</i> (naranja)</p> <p>Sitio de aislamiento: Exocarpo (cáscara)</p> <p>Síntomas del tejido: Crecimiento micelial polvoso de color verde en una pequeña zona de la superficie del fruto. El tejido vegetal se observaba maduro y ablandado</p>	

Los hongos aislados e identificados fueron: *Bipolaris* sp., *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp. *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp. Los tres primeros fueron aislados de un arbusto de *Euphorbia pulcherrima* y los cuatro restantes son hongos fitopatógenos post-cosecha que se aislaron de distintos frutos. Todos ellos pertenecen al grupo de los hongos necrotróficos no especializados, los cuales se caracterizan por atacar usualmente a tejidos inmaduros o senescentes, o a plantas cuya resistencia está comprometida por factores ambientales y aunque no poseen mecanismos de parasitismo sofisticados pueden causar serios daños económicos. Ya anteriormente, en el marco teórico, se ha descrito el tipo de organismos vegetales que afectan géneros fúngicos como los aislados en este trabajo.

Extracción de los metabolitos secundarios de cepas de *B.thuringiensis* y *B. cereus* mediante el uso de la resina amberlita XAD-16.

Se realizó la extracción de metabolitos secundarios de 27 cepas de *B.thuringiensis* y de 23 cepas de *B. cereus* de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. De este proceso se obtuvieron extractos metanólicos que al someterse a evaporación y secado generaban

extractos secos de color café que posteriormente fueron pesados y almacenados en tubos Eppendorf. Los resultados del pesado se muestran en la Tabla 2.

<b>Tabla 2: Cepas utilizadas y rendimiento del extracto obtenido en cada una</b>			
<b>Nomenclatura interna de laboratorio</b>	<b>Nombre del microorganismo</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Eli 52</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Mérida Yucatan	0.0927
<b>Eli 102</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Puebla	0.1148
<b>Eli 13</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Isla Veracruz	0.0895
<b>Eli 19</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Querétaro	0.0898
<b>Eli 8</b>	<i>B. cereus</i>	Chiautla de Tapia, Pue.	0.0792
<b>Eli 2</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Saltillo Coahuila	0.0915
<b>Eli 7</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chiautla de Tapia, Pue.	0.1038
<b>Eli 20</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Querétaro	0.0921
<b>Eli 14</b>	<i>B. cereus</i>	San Luis Potosí	0.1186
<b>Eli 4</b>	<i>B. cereus</i>	Chetumal, Quintana Roo	0.1382
<b>Eli 22</b>	<i>B. cereus</i>	Villa Hermosa, Tabasco	0.0986
<b>Eli 25</b>	<i>B. cereus</i>	Atlixco (solares)	0.1124
<b>Eli 9</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chiautla de Tapia, Pue.	0.1054
<b>Eli 114</b>	<i>B. cereus</i>	Chiautla de Tapia, Pue.	0.1152

<b>Eli 1</b>	<i>B. cereus</i>	Chiautla de Tapia, Pue.	0.1098
<b>Eli 35</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Bacalar Quintana Roo	0.1073
<b>Eli 54</b>	<i>B. cereus</i>	Mérida, Yucatán	0.1372
<b>Eli 62</b>	<i>B. cereus</i>	Tulum, Quintana Roo	0.1037
<b>Eli 111</b>	<i>B. cereus</i>	Puebla, Pué.	0.1056
<b>Eli 23</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Atlixco (ahuehuate)	0.0987
<b>Eli 4</b>	<i>B. cereus</i>	Chiautla de Tapia	0.1039
<b>Eli 5</b>	<i>B. cereus</i>	Chiautla de Tapia	0.1294
<b>Eli 15</b>	<i>B. thuringiensis</i>	San Luis Potosí	0.0995
<b>Eli 89</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Tlaxcala	0.1156
<b>Eli 24</b>	<i>B. cereus</i>	Atlixco (ahuehuate)	0.1059
<b>Eli 29</b>	<i>B. cereus</i>	C.U. Puebla	0.0915
<b>Eli 148</b>	<i>B. cereus</i>	Bacalar, Quintana Roo	0.0989
<b>Eli 46</b>	<i>B. cereus</i>	Chetumal Quintana Roo	0.0917
<b>Eli 38</b>	<i>B. cereus</i>	Carrillo	0.0945
<b>Eli 16</b>	<i>B. cereus</i>	San Luis Potosí	0.0957
<b>ELI3</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chiautla de Tapia	0.1055
<b>ELI6</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chiautla de Tapia	0.1084
<b>ELI10</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Tlapanala, Puebla	0.1322

<b>ELI11</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Tlapanala, Puebla	0.1175
<b>ELI12</b>	<i>B. cereus</i>	Tlapanala, Puebla	0.1320
<b>ELI17</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Querétaro	0.1673
<b>ELI33</b>	<i>B. cereus</i>	Puebla	0.1348
<b>ELI21</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Villa Hermosa, Tabasco.	0.1259
<b>ELI26</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Atlixco (solares)	0.1269
<b>ELI27</b>	<i>B. thuringiensis</i>	C.U. Puebla	0.1410
<b>ELI28</b>	<i>B. thuringiensis</i>	C.U. Puebla	0.1886
<b>ELI30</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Jardinera, Pue.	0.1510
<b>ELI31</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Jardinera, Pue.	0.1648
<b>ELI32</b>	<i>B. cereus</i>	Patio, Puebla.	0.1473
<b>ELI33</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Bacalar, Quintana Roo	0.1955
<b>ELI34</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Bacalar, Quintana Roo	0.1804
<b>ELI37</b>	<i>B. cereus</i>	Bacalar, Quintana Roo	0.1344
<b>ELI40</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chetumal, Quintana Roo	0.1034
<b>ELI41</b>	<i>B. cereus</i>	Chetumal, Quintana Roo	0.2192
<b>ELI42</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Chetumal, Quintana Roo	0.2686

El peso promedio obtenido fue de 0.1235g (123.5mg); los pesos máximo y mínimo obtenidos fueron 0.2686 g y 0.0792 g, respectivamente. Con estos extractos secos se prepararon las

soluciones acuosas a concentración de 30 mg/100 µL a las que se les evaluaría su efecto antifúngico.

#### Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos

Se evaluó la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos mediante el método de difusión en agar. Los siete hongos fitopatógenos descritos anteriormente fueron los organismos a los que se tomaron como blanco de acción de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de las cepas de *Bacillus* sp. En estas pruebas se utilizó como control negativo a un disco de papel filtro empapado de metanol, y como control positivo a miconazol (solución de 20 mg/mL). Fue necesario realizar diluciones acuosas no seriadas de miconazol y seleccionar a la que permitiría obtener un halo de inhibición de tamaño adecuado que no interfiera con el efecto de los otros extractos probados en una misma placa. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 3.

<b>Tabla 3. Halos de inhibición (mm) producidos por el miconazol y las diluciones de acuosas de miconazol 1:2, 1:4 a las 72h de incubación a 29°C</b>			
<b>Hongo</b>	Miconazol comercial (concentración: 20 mg/ml)	Dilución 1:2	Dilución 1:4
<i>Bipolaris</i> sp	60	42	35
<i>F. oxysporum</i>	13	9	0
<i>F. avenaceum</i>	50	39	34
<i>F. equiseti</i>	25	23	21
<i>Penicillium</i> sp.	38	31	25
<i>Paecilomyces</i> sp	35	29	21
<i>Mucor</i> sp	13	8	0

Por los halos obtenidos se decidió usar la dilución 1:4 (5 mg/mL) para los hongos *Bipolaris* sp., *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *Penicillium* sp. y *Paecilomyces* sp. Para los hongos *F. oxysporum* y *Mucor* sp. se requirió utilizar la solución de miconazol sin diluir (20 mg/mL) pues la concentración original generó halos de inhibición muy pequeños.

Los resultados de las pruebas de la evaluación del efecto antifúngico de los 50 extractos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

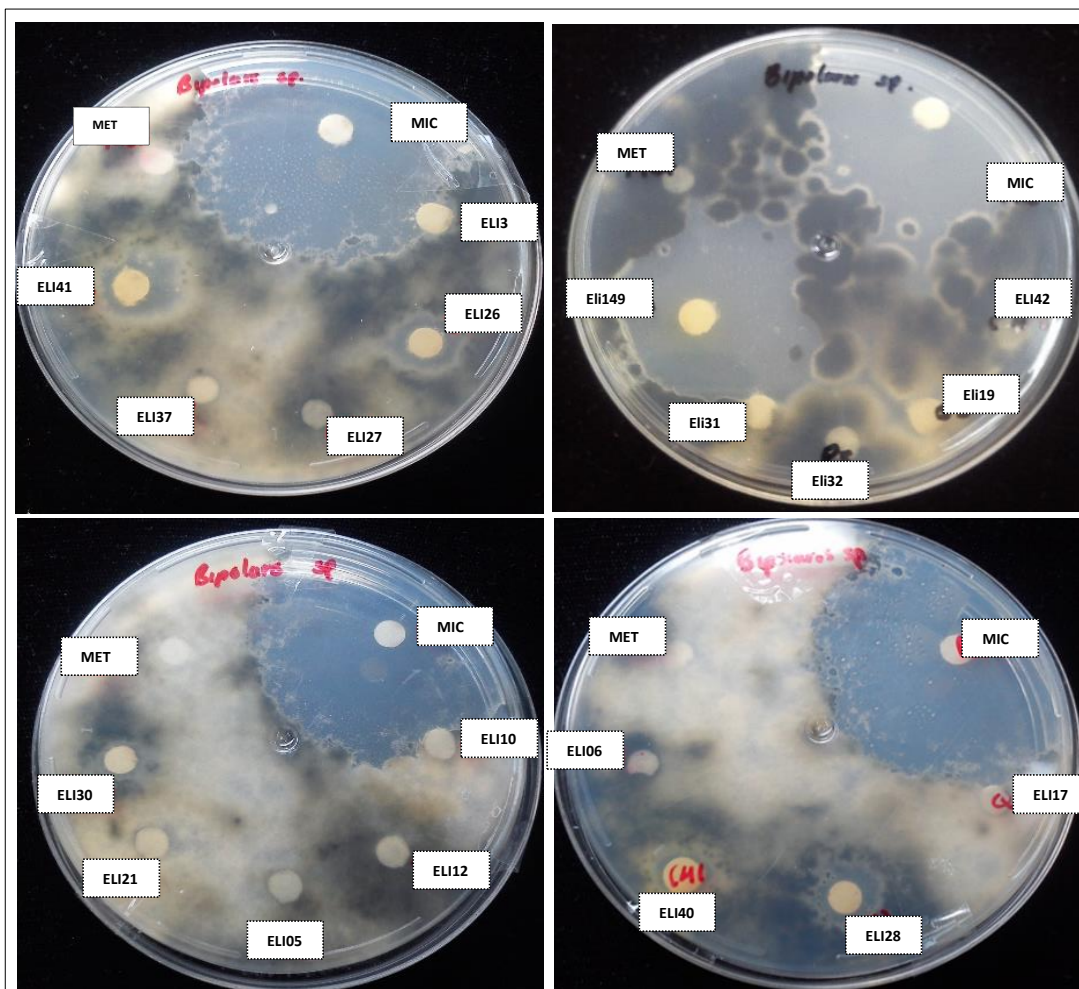
**Tabla 4. Halos de inhibición generados por los extractos obtenidos de las cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus***

<b>Cepa de <i>Bacillus</i></b>	<b>Especie de <i>Bacillus</i></b>	<b><i>Bipolaris</i> sp.</b>	<b><i>F. avenaceum</i></b>	<b><i>F. equiseti</i></b>	<b><i>F. oxysporum</i></b>	<b><i>Mucor</i> sp.</b>	<b><i>Paecilomyces</i> sp.</b>	<b><i>Penicillium</i> sp.</b>
Eli 52	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 102	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 13	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 19	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 8	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 2	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 7	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 20	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 14	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 4	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 22	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 25	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 9	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 114	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 1	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 35	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 54	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 62	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 111	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-

Eli 23	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 4	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 5	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 15	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 89	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 24	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 29	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 148	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 46	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 38	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Eli 16	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI3	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	<b>8</b>	-
ELI6	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI10	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI11	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI12	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI17	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI149	<i>B. cereus</i>	<b>33</b>	<b>29</b>	<b>28</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>24</b>
ELI21	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI26	<i>B. thuringiensis</i>	<b>12</b>	-	-	-	-	<b>14</b>	-
ELI27	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
ELI28	<i>B. thuringiensis</i>	<b>14</b>	<b>9</b>	-	-	-	-	-
ELI30	<i>B. thuringiensis</i>	<b>9</b>	<b>9</b>	-	-	-	<b>9</b>	8

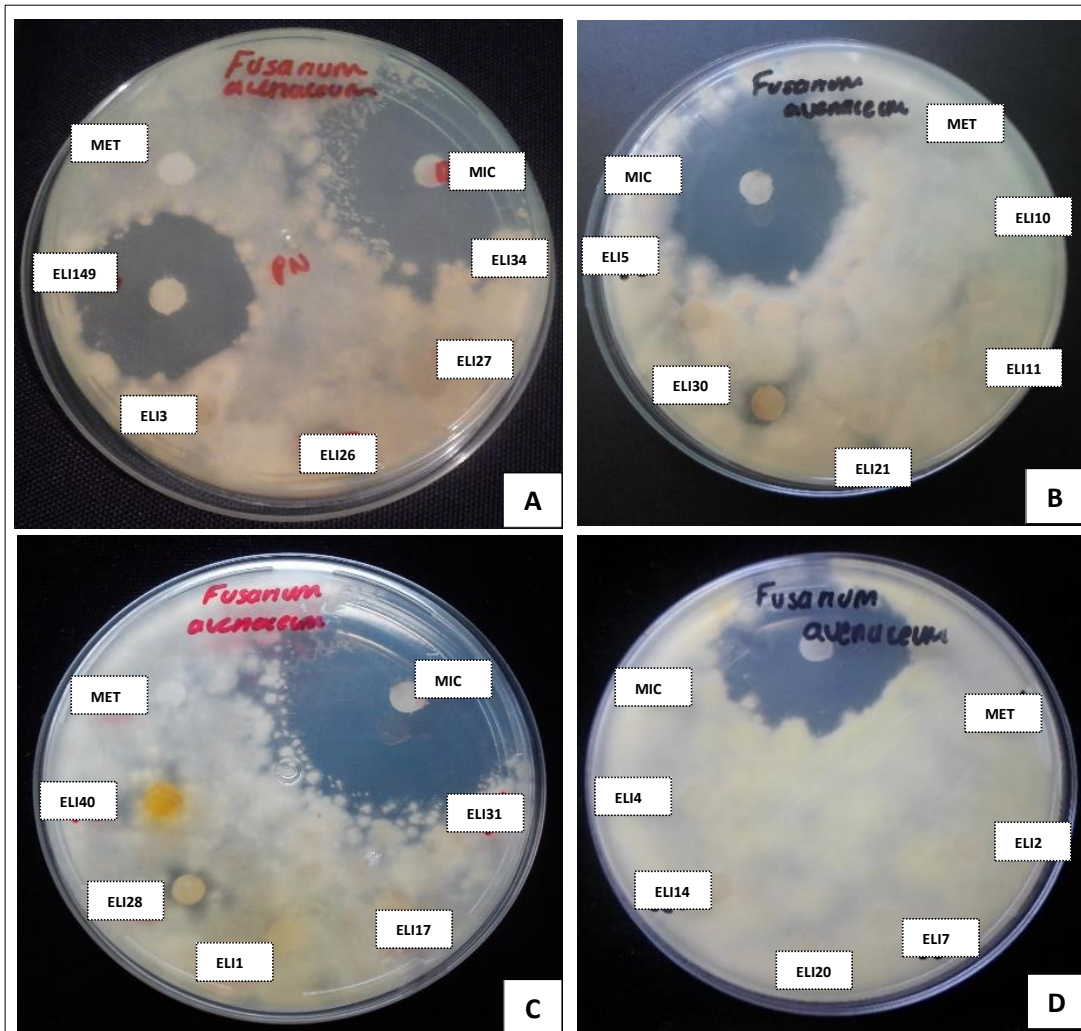
<b>ELI31</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI32</b>	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI33</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI34</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI37</b>	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI40</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>ELI41</b>	<i>B. cereus</i>	<b>14</b>	-	-	-	-	-	-
<b>ELI42</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Concentración de miconazol</b>		(5mg/mL)	(5g/mL)	(5mg/mL)	(20 mg/mL)	(20mg/mL)	(5mg/mL)	(5mg/mL)
<b>Diámetro promedio de los halos de inhibición generados</b>		34.8	32.5	22.8	14.1mm	12.7mm	21.4mm	30.6mm

Se puede observar en la tabla anterior que con respecto al hongo *Bipolaris* sp, únicamente los extractos de tres cepas de *B. thuringiensis* (ELI26, ELI28 y ELI30) y dos cepas de *B. cereus* (ELI149 y ELI41) fueron los que generaron halos de inhibición a su crecimiento (Figura 16). Cabe mencionar, que el hongo durante sus primeros días de crecimiento toma una coloración blanca y que en días posteriores torna a verde oscuro grisáceo.

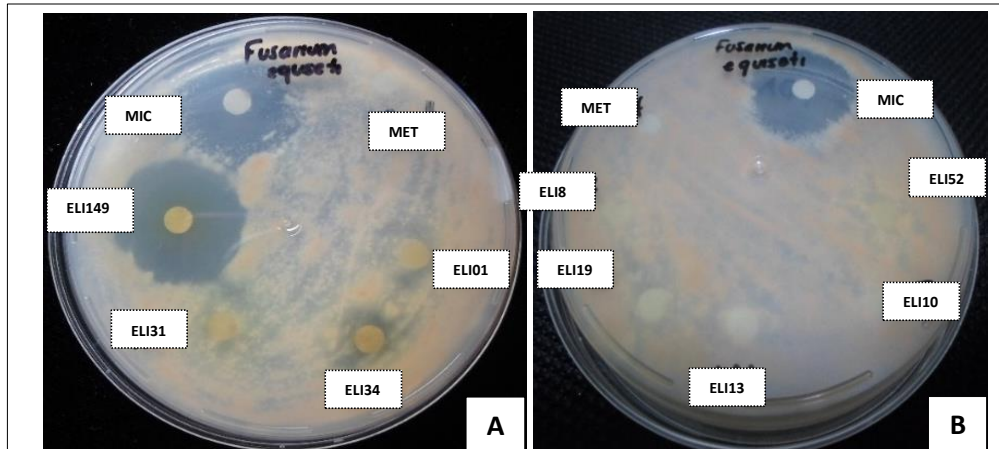


**Figura 16.** Halos de inhibición producidos por los extractos de las cepas ELI26, ELI28, ELI30, ELI149 y ELI41 sobre *Bipolaris* sp. a las 120 horas de incubación. \*MET= Metanol; MIC= Miconazol (Dilución 1:4; 5mg/ml)

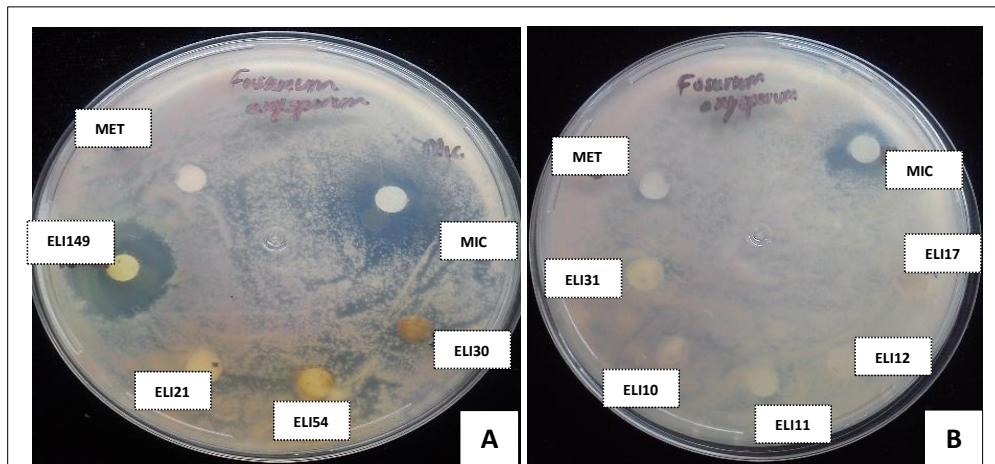
En cuanto a las especies del género *Fusarium* spp. se debe de remarcar que *F. avenaceum* fue inhibido considerablemente por el extracto de la cepa ELI149 de *B. cereus* y mínimamente por el extracto de la cepa ELI30 y ELI28, ambas de *B. thuringiensis* (Figura 17). *F. equiseti*, sólo fue inhibido por el extracto de la cepa ELI149 (Figura 18), con un halo similar al producido por el miconazol en dilución 1:4 (5mg/ml). Por otro lado, *F. oxysporum* sólo fue inhibido por el extracto de la cepa ELI149 e incluso el halo de inhibición fue mayor que el generado por el control positivo miconazol sin diluir (20 mg/mL) (Figura 19).



**Figura 17. A-C.** Halos de inhibición producidos por el extracto de ELI149, ELI30 y ELI28 sobre el hongo *Fusarium avenaceum* a las 72 horas de incubación. **D.** Placa donde no se observa inhibición de crecimiento con los extractos probados. Met=Metanol; Mic= Miconazol (dilución 1:4; 5 mg/mL)

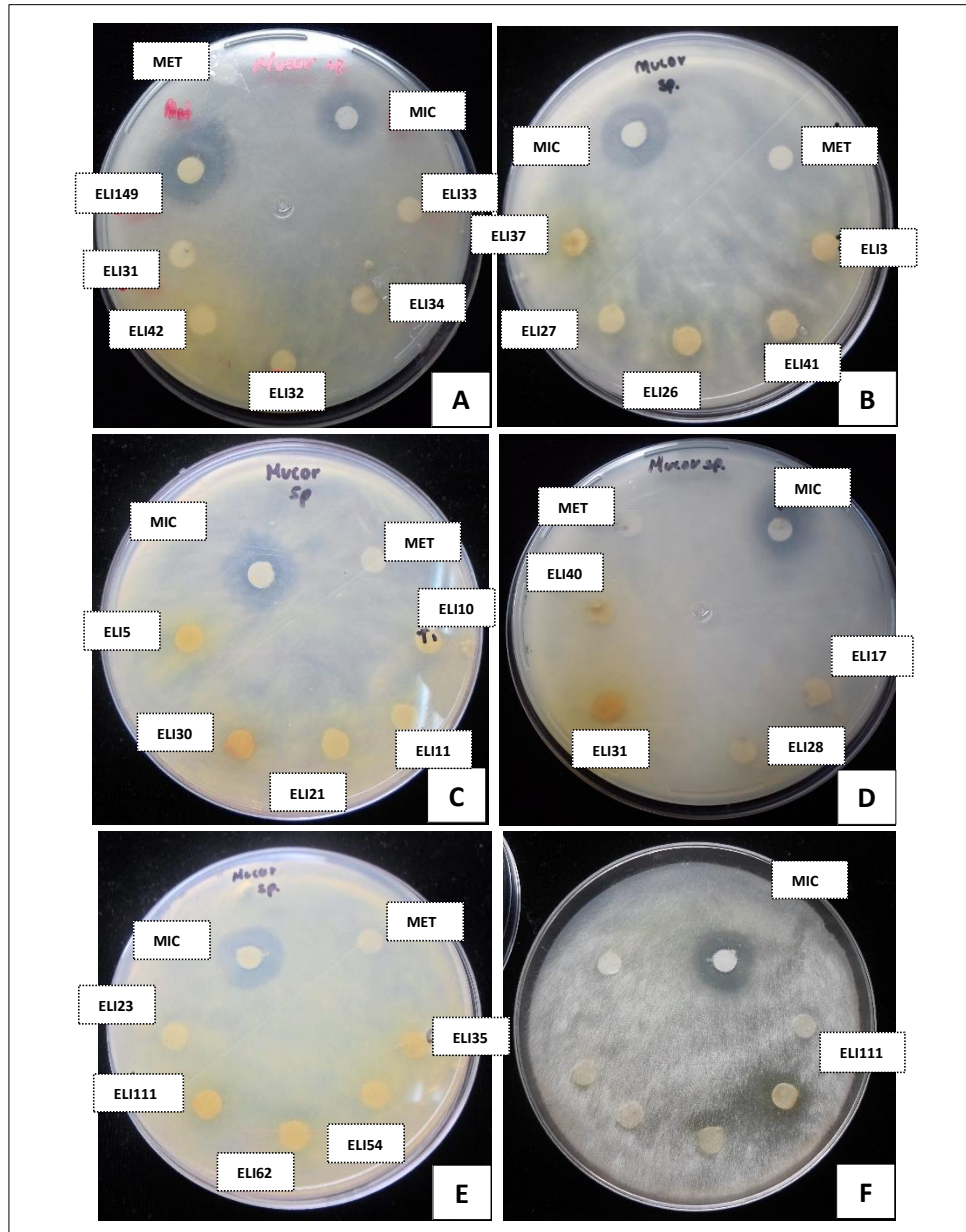


**Figura 18. A.** Halos de inhibición producidos por el extracto de ELI149 sobre el hongo *F. equiseti* a las 72 horas de incubación. **B.** Placa donde no se observa inhibición de crecimiento con los extractos probados. Met=Metanol; Mic= Miconazol (dilución 1:4; 5 mg/mL)



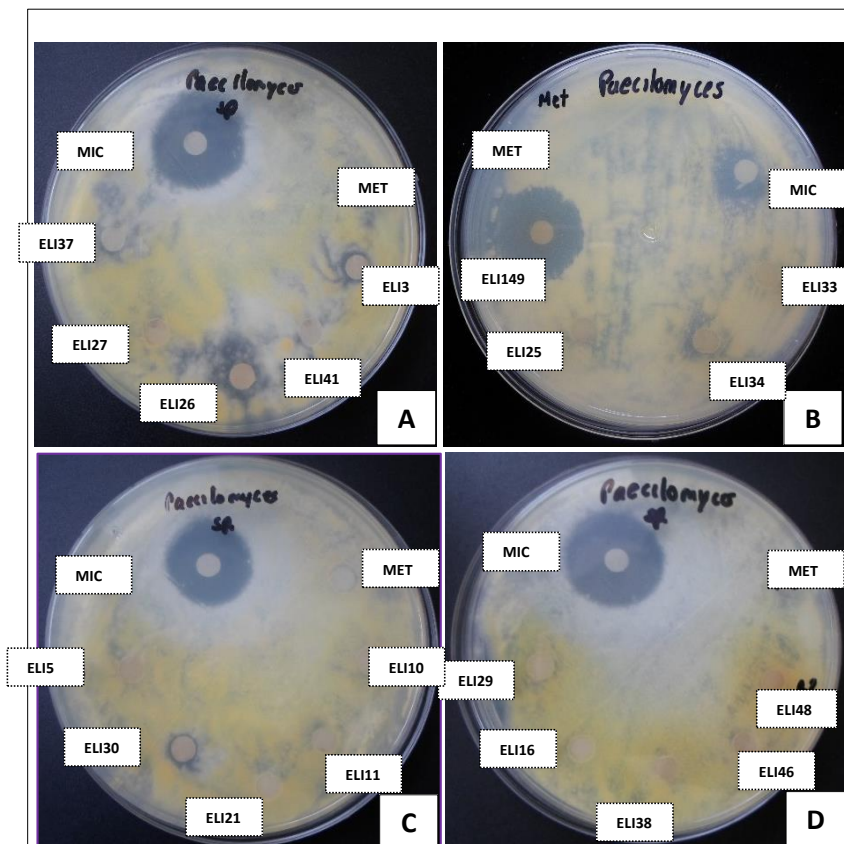
**Figura 19. A.** Halos de inhibición producidos por el extracto de ELI149 sobre el hongo *Fusarium oxysporum* a las 72 horas de incubación con los extractos probados. **B.** Placa donde no se observa inhibición de crecimiento. Met: Metanol; Mic: Miconazol (20 mg/mL)

Respecto al hongo *Mucor* sp. sólo logró inhibirlo el extracto de la cepa ELI149 de *B. cereus*, e incluso en mayor proporción que el control positivo sin diluir (Figura 20). Por otro lado, el extracto de la cepa ELI111 de *B. cereus* pareció no inhibir su crecimiento porque no generó un halo de inhibición visible al reverso de la placa, pero por la parte frontal se observaba una disminución en la velocidad de crecimiento pues el micelio se observaba muy corto en comparación con la zona aledaña (Figura 20 E y F).



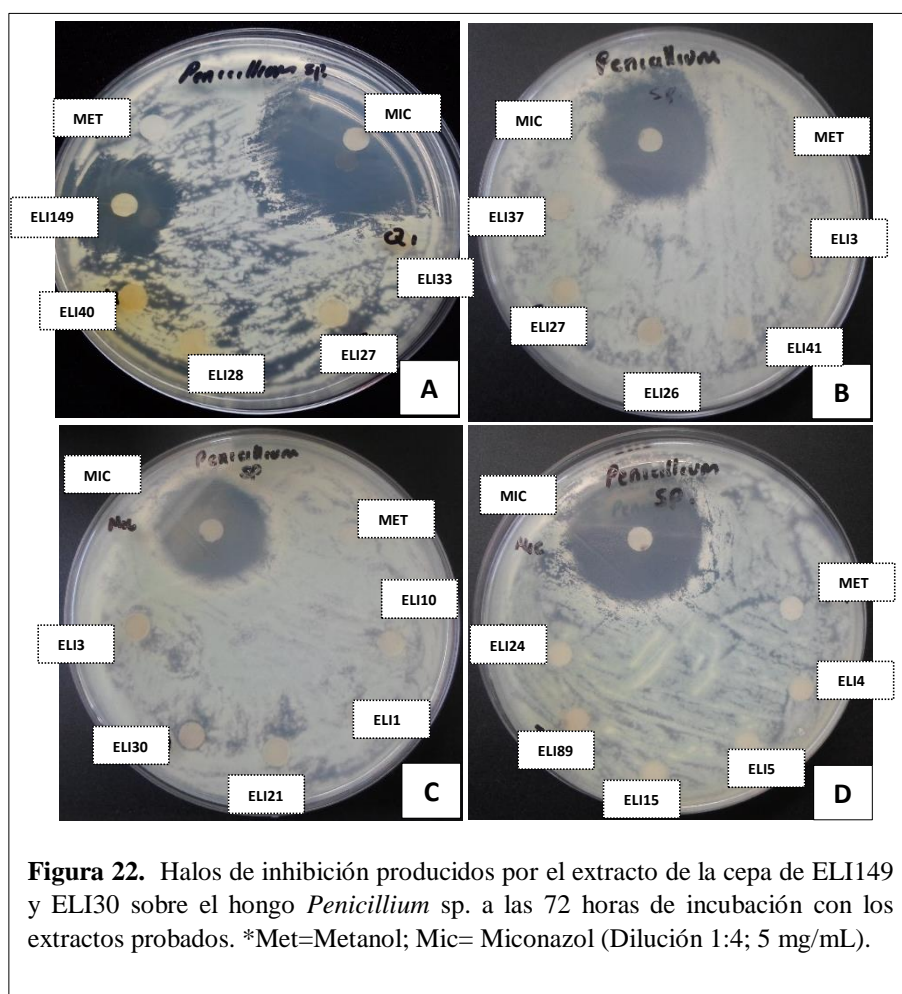
**Figura 20.** A. Halos de inhibición producidos por el extracto de ELI149 sobre el hongo *Mucor* sp. a las 72 horas de incubación. B-D. Placas donde no se observa inhibición de crecimiento con los extractos probados. E. La placa no muestra un halo de inhibición pero su reverso F. Muestra una zona con menor velocidad de crecimiento fúngico. Met=Metanol; Mic=Miconazol (20 mg/mL).

En el caso del hongo *Paecilomyces* sp. resultó que los extractos de las cepas de ELI3, ELI26 y ELI30 de *B. thuringiensis* así como el de ELI149 de *B. cereus* fueron los que generaron halos de inhibición (Figura 21). El extracto de la cepa ELI26 sólo pudo mantener su efecto antifúngico por 48 horas, pero a las 72 horas de incubación el hongo comenzó a invadir el halo de inhibición antes formado.



**Figura 21.** A-C. Halos de inhibición producidos por los extractos de la cepa ELI3, ELI26, ELI149 y ELI30 sobre el hongo *Paecilomyces* sp. a las 72 horas de incubación. **D.** Placa donde no se observa inhibición de crecimiento fúngico. \* Met: Metanol; Mic: Miconazol (Dilución 1:4; 5 mg/mL).

Por último, *Penicillium* sp. sólo fue inhibido por el extracto de la cepa ELI149 de *B. cereus* y pareciera que muy mínimamente por ELI30 (Figura 22).



**Figura 22.** Halos de inhibición producidos por el extracto de la cepa de ELI149 y ELI30 sobre el hongo *Penicillium* sp. a las 72 horas de incubación con los extractos probados. \*Met=Metanol; Mic= Miconazol (Dilución 1:4; 5 mg/mL).

De los cincuenta extractos obtenidos y probados, únicamente cinco (10%) generaron halos de inhibición en al menos uno de los hongos. Sólo el extracto de la cepa ELI149 (*B. cereus*) presentó actividad antifúngica sobre todos en los hongos utilizados en este estudio, y los otros cuatro ELI41, ELI26, ELI28 y ELI30 presentaron un espectro variado. Estos resultados podrían explicarse mediante los siguientes puntos:

- La producción de los metabolitos secundarios tiende a depender del género, especie e incluso la cepa a la que pertenece el microorganismo debido a que estos compuestos surgen a partir de intermediarios metabólicos comunes que pasan por vías enzimáticas especiales codificadas por genes específicos del organismo; de ahí que no todas las cepas

utilizadas en este estudio tengan la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

- El tipo y la cantidad de metabolitos secundarios producidos y excretados por la bacteria se ven influidos por factores ambientales (interacciones con el entorno y otras poblaciones) o de cultivo *in vitro* como son la composición del medio (fuente de carbono, nitrógeno, fosfato y elementos traza), la temperatura y el pH, etc. Estos factores también pudieron haber jugado un papel importante en este estudio, puesto que las condiciones de cultivo dadas pudieron haber sido adecuadas para la producción de los metabolitos secundarios de algunas cepas pero no para la de otras.
- Los extractos que presentaron un efecto antifúngico pueden contener metabolitos secundarios que prevengan la germinación de las esporas evitando así su proliferación, e inhiban la formación del tubo germinativo evitando su colonización.
- La variación en el espectro de acción de los extractos puede explicarse según la naturaleza del propio extracto o la de los hongos a los que se buscó inhibir. Con respecto al extracto, se puede decir que probablemente la cantidad de los metabolitos responsables del efecto pudo no ser la suficiente para mantener su efecto por un tiempo prolongado. Con respecto a los hongos, puede explicarse por su velocidad de crecimiento y otras propiedades como su capacidad para detoxificar los metabolitos secundarios que intentan afectar su integridad.

El hongo *Bipolaris* sp. es el hongo que crece más lentamente de todos los usados y por tanto, los metabolitos secundarios con efecto antifúngico tienen suficiente oportunidad para actuar sobre las esporas y evitar su germinación; esto podría explicar porque fue el hongo más sensible de los utilizados.

Los hongos del género *Fusarium* spp, tienen una velocidad de crecimiento media, sin embargo, estos hongos son bien conocidos por su resistencia frente a compuestos que afectan su integridad, especialmente *F. oxysporum*, pero en su caso, el halo generado por el extracto de ELI149 fue mayor en comparación con el que produjo el control positivo miconazol. A *F. avenaceum* sólo lograron inhibirlo los extractos de las cepas ELI149, ELI30 y ELI28, hecho que indica que es más sensible que las otras dos especies del mismo género. Por otro lado, a *F. equiseti* sólo logró inhibirlo el extracto de la cepa ELI149.

*Mucor* sp. fue uno de los más difíciles de inhibir porque su micelio se expande tan rápidamente que los extractos no tuvieron la potencia suficiente para mantener la zona de halo de inhibición; sólo el extracto de la cepa de NRA logró producirle un halo a su crecimiento e incluso en mayor proporción que el control positivo miconazol, lo cual podría explicarse probablemente por una cantidad suficiente de metabolitos en el extracto de NRA.

*Penicillium* sp. y *Paecilomyces* sp. tienen una velocidad de crecimiento similar entre ellos, pero el primero es más resistente, pues sólo el extracto de la cepa ELI149 logró inhibirlo, mientras que al segundo lo inhibieron los extractos de las cepas ELI26, ELI3, ELI30 y ELI149.

Finalmente, se tiene que el extracto de la cepa ELI149 resultó ser el más prometedor, pues inhibió el crecimiento de los hongos en buena proporción y mantuvo tal efecto por más de 7 días, aún por más tiempo que el control positivo usado para todos los hongos (datos no mostrados).

## **10.- CONCLUSIONES**

De la evaluación del efecto antifúngico mostrado por la colección de extractos obtenidos de cepas aisladas del suelo, puede identificarse a una cepa de *B. cereus* con características prometedoras contra hongos fitopatógenos y dos de *B. thuringiensis* con cierto espectro de inhibición, todas ellas con potencial de acción en el campo de la biorremediación.

## 11.- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Martínez, E., Sosa, J. y Álvarez, F. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 1-9.
- 2- Wagner, I., Beil, W., Lang, S., Meiners, M. y Laatsuch H. (2002). Integrated Approach To Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 74, 207-238.
- 3- Vining, L. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44, 395-427.
- 4- Sierra, I., Romero, M. y Orduz, S. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas del suelo. *Actual Biol.*, 34(96), 5-19.
- 5- Martínez, Z. y Moreno, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología*, 11(3), 37-50.
- 6- Luzhetskyy, A., Pelzer, S. y Bechthold, A. (2007). The future of natural products as a source of new antibiotics. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 8, 608-613.
- 7- Demain, L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechno*, 52, 455-463.
- 8- Galvin, M., Hill, C. y Ross, R. (1999). Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 355-358.
- 9- Mari, M., Neri, F. y Bertolini, P. (2007). Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruit. *Stewart Postharvest Review*, 3(6), 1-7.
- 10- Ibarra, J. Galindo, E., Patiño, M. y Serrano, L. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 48(2), 113-120.
- 11- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. y Barka, E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.*, 71(9), 49-51.
- 12- Sansinenea, E. y Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett.*, 33, 1523-1538.

- 13- Tejera, B., Heydrich, M. y Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa*). *Revista Protección Vegetal*, 27, 117-122.
- 14- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Constanza, L. y Sánchez, C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas*, 9, 177-187.
- 15- Corrales, L., Consuelo, L., Cuervo, J., Bautista, D. y Guevara, M. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis*. *NOVA – Publicación científica en ciencias Biomédicas*, 8(13), 63-75.
- 16- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- 17- Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. y Mayorga, L. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63-72.
- 18- Bais, H., Fall, R., y Vivanco, J. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134, 307-319.
- 19- Romero, D., Vicente, A. y Rakoptoaly, R. (2007). The iturin and fengycin families of polipeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *The American Phytopathology Society*, 20(4), 431-440.
- 20- Ragazzo, J., Robles, A., Lomelí, L. y Luna, G. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Rev. Chapingo Ser.Hortic.*, 17, 1-7.
- 21- Romero, M., Jansen, R., Sylla, M., Lunsdorf, H., Hausbler, S., Santosa, D.A., Timmis, K.N. y Molinari, G. (2006). 7-OMalonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis*-active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1701–1709.
- 22- Vitelli, J., Gajardo, R., Liset, L., Fajardo, Y., Dorta, B. y Rodríguez, V. (2010). Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región

- nororiental de Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 30, 90-96.
- 23- Griffiths, J., Haslam, S., Yang, T., Garczynski, S., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P., Dell, A., Adang M. y Aroian, R. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Science, 307, 922-925.
- 24- Jurat, J. y Adang, M. (2004). Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European Journal Biochemical, 271, 3127-3135.
- 25- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Muñoz, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. y Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochem Biophys Acta, 1667, 38-46.
- 26- Khatar, A., Rejasse, A., Destoumiexius, D. Escoubas, J., Sanchis, V., Lereclus, D., Givaudan, A., Kallassy, M., Nielssen, C. y Gaufriault, S. (2009). The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insect. J. Bacteriol, 191, 7063-707.
- 27- Fedhila, S. (2002). The InhA3 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insect infected via the oral route. J. Bacteriol, 184, 3296-3304.
- 28- Sampson, M. y Gooday, G. (2004). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogens in insects. Microbiology, 144, 2189-2194.
- 29- Reyes, A., Escudero, B. Aguilar, G., Hayward, J. y Barboza, J. (2004). Antifungal activities of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potencial for biocontrol of phytopatogenic fungi in soybean seed. JFS: Food microbiology and safety, 69(5), 131-134.
- 30- Helgason, E., Okstad, O., Caugant, D., Johansen, H., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. y Kolsto, A. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* One species on the basis of genetic evidence. Appl Environ Microbiol., 66, 2627-2630.
- 31- Chang, Y., Shangkuan, Y., Lin, H. y Liu, H. (2003). PCR Assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* Group Cells". Appl Envir Microbiol., 69, 4502-4510.

- 32- Sang-Lang, W. (2009). Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Mar Biotechnology*, 11, 334-344.
- 33- Strange, R. y Scott, P. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annual review of phytopathology journal*, 43, 83-116.
- 34- Porta, A. y Vannacci, G. (2012). Fungal plant diseases in Europe and in the Mediterranean basin. In: Lal R, editor *Agricultural Sciences*. Oxford: Eolss Publishers.
- 35- Orbera, T., Ortega, E. y Serrat, M. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades. *Biotecnología aplicada*, 31, 7-12.
- 36- Anderson, P., Cunningham, N. y Dazzac, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol.*, 19, 535-544.
- 37- Trigos, A., Ramírez, K y Salinas, A. (2008). Presencia de hongos Fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de micología*, 28, 125-129.
- 38- Dufresne, M. y Osbourn, A. (2001). Definition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. *The American Phytopathological Society*, 14(3), 300-307.
- 39- Juárez, G., Sosa, M. y López, A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4(2), 14-23.
- 40- Reyes, P. (2008). Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de micología*, 25, 182-185.
- 41- Mari, M., Cembali, T., Casalini, L y Patrella, G. (2000). *Mucor* species on orchard soil- population dynamics and pathogenicity on pear fruit. *European Journal of plant pathology*, 106, 449-454.
- 42- Wisniewska, H., Luykasz, S., Waskiewicz, A. y Beszterda, M. (2014). Toxigenic *Fusarium* species infecting wheat heads in Poland. *Central European Journal of Biology*, 9(2), 163-172.

- 43- Nwanma, B., Onyike, N. y Nelson, P. (1993). The distribution of *Fusarium* species in soils planted to millet and sorghum in Lesotho, Nigeria and Zimbabwe. *Mycopathologia*, 121, 105-114.
- 44- Wenche, L., Askel, B., Rundeberget, T. Kosiak, B. y Gareis, M. (1999). Mycotoxin production and cytotoxic of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144,103-113.
- 45- Yli, T., Paavanen, S., Parikka, P. Jestoi, S. Klemsdal, S. y Rizzo, A. (2006). Genetic variation, real-time PCR, metabolites and mycotoxins of *Fusarium avenaceum* and related species, 22(2), 79-86.
- 46- Siegrid, S., Mhammerler, R. y Vierheiling, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *European J. Plant Pathology*, 122,395-401.
- 47- Shivas, R. y Philemon, E. (1996). First record of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubens in banana in Papua New Guinea. *Australian Plant Pathology*, 25,260.
- 48- Lukasz, S., Gromadzka, K. y Chelkowski, J. Polymorphis of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *J. Appl Genet.*, 53(2), 227-36.
- 49- Punja, Z., Wan, A., Rahman, R., Goswami, R., Barasubiye, K., Seifert, S. y Lévesque, C. (2008). Growth, population dynamic, and diversity of *Fusarium equiseti* in ginseng fields. *European Journal of plant Pathology*, 121,173-184.
- 50- Vargas, M., González, C., Chafer, M. y Chiralt, A. (2007). Estudio preliminar del uso de recubrimiento de quitosano y de microorganismos eficaces en el control postcosecha de la podredumbre azul de naranjas. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones, 1414-1423.
- 51- Carissimi, M., Schipani, M., Van der Van, S. y Germani, J. (2009). Antifungal activity of soil *Bacillus* sp, E164-against *Bipolaris sorokiniana*. *Biociencias*, 17(1), 48-58.
- 52- Nyvall, R., Percich, J., Porter, J., Brantner, J. (1995). Comparison of fungal brown spot severity to incidence of seedborne *Bipolaris oryzae* and *B sorokiniana* and infected floral sites on cultivated wild rice. *Plant Disease*, 79, 249-250.

- 53- Sharma, R., Dinesh, S. y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205-221.
- 54- Casey, J., Walsh, P. y O'Shea, D. (2007). Characterization of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from the fermentation broth. *Separation and Purification Technology*, 53, 281-288.
- 55- Wulff, E., Mguni, C., Mansfeld, K., Fels, J. Lubeck, M. y Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Plant Pathology*, 51(5) 574-584.