



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“Extracción de metabolitos secundarios y el estudio
de su actividad biológica”**

TESIS

Para obtener el grado de:

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

PRESENTA:

JOSE DANIEL ROSALES TORRES

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO

H. PUEBLA DE Z. MARZO 2019

ÍNDICE

RESUMEN2
INTRODUCCIÓN2
MARCO TEÓRICO4
MARCO DE REFERENCIA11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA13
JUSTIFICACIÓN14
OBJETIVOS15
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN16
METODOLOGÍA17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN23
CONCLUSIONES34
BIBLIOGRAFÍA35

1- RESUMEN

En este proyecto se extrajeron metabolitos secundarios, de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de diferentes suelos de Tabasco y Baja California y se evaluó su actividad inhibitoria contra bacterias como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*. Posteriormente se evaluó el efecto antifúngico de dichos metabolitos contra hongos tales como *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp, *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp.

En el cual se observó que la mayoría de extractos presentaron actividad inhibitoria contra bacterias grampositivas, en caso contrario los extractos no presentaron ningún efecto inhibitorio contra los hongos antes mencionados.

2- INTRODUCCIÓN

La biotecnología se puede definir como el conjunto de técnicas que involucran la manipulación de organismos vivos o sus componentes sub-celulares, para producir sustancias, desarrollar procesos o proporcionar servicios. Por tal motivo, la Biotecnología ha emergido como una contribuyente importante para el avance de la agricultura, medicina y las ciencias ambientales. Una de las subdisciplinas de la Biotecnología es la Biotecnología Microbiana que tiene por objeto la utilización de metabolitos secundarios extraídos de diferentes fuentes naturales como son microorganismos, algas y hongos. En la actualidad se han descrito cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes, de las cuales los microorganismos constituyen una de ellas, ofreciendo grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas.

Los antibióticos producidos por las bacterias han sido empleados contra las infecciones producidas por bacterias y hongos, muchos utilizados comercialmente y otros son potencialmente útiles en otras ramas de la medicina. La estrategia de búsqueda de metabolitos novedosos se cambió lentamente en muchos laboratorios, tomando en cuenta que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidas, y que millones de especies microbianas permanecen desconocidas, por lo que es grande el potencial de los microorganismos como proveedores de compuestos bioactivos útiles. Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas. Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de microorganismos y que ejercen su mayor efecto sobre la salud, nutrición y economía de la sociedad. Los antibióticos se agrupan en familias, caracterizadas porque agrupan compuestos que tienen una estructura química similar y comparten el mismo mecanismo de acción antimicrobiano. *Bacillus* sp. es productor de múltiples metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, antifúngicos y sideróforos. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna de este modo la gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura, la medicina y la biotecnología industrial. Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos

incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas.

3- MARCO TEÓRICO

3.1 Metabolitos secundarios: solución biológica para los cultivos y la salud

La agricultura es una fuente importante para la economía mundial, el medio ambiente y el sistema social. Debido al incremento de la población mundial hay una mayor demanda de producción agrícola. Sin embargo, las plagas y enfermedades de los cultivos merman mucho su capacidad de producción y provoca grandes pérdidas económicas. Para evitar este problema por varias décadas los pesticidas químicos han sido utilizados causando graves daños al medio ambiente y a la salud. Con el propósito de minimizar los riesgos de los pesticidas químicos se ha generado el concepto de agricultura sostenible, el cual se basa en utilizar productos ecológicos. Se ha encontrado que los microorganismos son productores de una gran cantidad de compuestos que pueden ser tóxicos contra patógenos de las plantas. También algunos compuestos se emplean en las industrias farmacéuticas como antibióticos y antifúngicos. A estos compuestos se les llama metabolitos secundarios.¹

Por definición, los metabolitos primarios son aquellos que se producen en la fase exponencial y son necesarios para la sobrevivencia del microorganismo. Mientras que los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, que se producen en la fase estacionaria y aunque no son imprescindibles para el microorganismo, juegan papeles como la protección y supervivencia propia en el ambiente que lo rodea. Sus características son:

- No son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce. En estado natural, sus funciones se hallan ordenadas a la supervivencia de la especie, pero cuando los microorganismos que los producen se desarrollan en cultivo puro, los metabolitos secundarios no desempeñan esa misión.
- Generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí.
- Cada uno de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos.
- La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea (degeneración de la raza), por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.

De todos los productos tradicionales obtenidos por fermentación, los más importantes para la salud humana son los metabolitos secundarios. Donde se incluyen, además de los antibióticos, ciertas toxinas, alcaloides, factores de crecimiento vegetal y pigmentos.

En 1891, Kossel definió los metabolitos secundarios por exclusión, es decir aquellos que no pertenecían a los metabolitos primarios, provocando una fuerte crítica que aún hoy en día no cesa. Actualmente el concepto aceptado, es que los metabolitos primarios son compuestos químicos provenientes de organismos vivos (plantas, microorganismos o animales) que son vitales para su funcionamiento mientras que los secundarios son compuestos prescindibles. Estos metabolitos secundarios tienen gran diversidad estructural y cada uno de los compuestos está producido por un número pequeño de especies. ¹

Por muchos años, el metabolismo secundario fue ignorado; el estudio de este tipo de metabolismo no esencial se dejó para los científicos de las industrias y los químicos académicos. Hoy en día la situación es diferente. La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y las actividades biológicas que poseen estos productos naturales han inspirado a la

industria farmacéutica para buscar nuevas estructuras en cultivos microbianos así como en plantas. Muchos de los productos microbianos que tienen un gran valor comercial y económico son metabolitos secundarios.¹

3.2 Género *Bacillus* sp. como agente de control biológico

El género *Bacillus* (reino bacteria; phylo Firmicutes; clase Bacilli; orden Bacillales; Familia Bacillaceae) está caracterizado por una alta diversidad de especies cuyo tamaño de genoma suele ser entre 3.35 y 5.5 Mb y cuyas propiedades metabólicas y nichos ecológicos varían significativamente. Actualmente más de 142 genomas han sido secuenciados, muchos de ellos con interés clínico. El género *Bacillus* se define como una bacteria aeróbica, grampositiva, móvil, catalasa positiva, hemólisis variable, con capacidad de formar endosporas de morfología esférica, ovalada, elipsoidal o cilíndrica.²

Incluye un gran número de especies, se puede aislar de una gran cantidad de ambientes y puede crecer en muchos medios de cultivo como agar nutritivo, Luria Bertani, tripticaseína de soya o agar sangre. Su ciclo de vida es simple: las células vegetativas bajo condiciones favorables de pH, temperatura y nutrientes comienzan a crecer y generar el septo que separa a las dos células hijas, por lo que a microscopía de contraste de fases se pueden observar como células solas o en pareja. La división que presentan las células vegetativas es por fisión binaria. Cuando alguno de los nutrientes como aminoácidos, azúcares o el oxígeno se vuelven insuficientes para crecer, la bacteria forma endosporas, no más de una por célula, las cuales son muy resistentes a muchas condiciones adversas como el calor, la radiación, los desinfectantes y la desecación entre otros. La formación de las endosporas es una de las características más importantes en la identificación del género, ya que es el único género aeróbico formador de esporas. Se forman intracelularmente al final de la fase exponencial, normalmente cuando hay un decaimiento en los nutrientes y difieren de las células vegetativas en que son refringentes y visibles claramente en un microscopio de contraste de fases.²

La morfología colonial y el tamaño varían entre especies. Las bacterias vistas a microscopía pueden aparecer individualmente, en parejas o en cadenas (a veces de gran tamaño). Algunas especies pueden tener inclusiones en el citoplasma que son visibles a microscopía de contraste de fases por ser menos refringentes que las esporas cuya posición suele ser central o subterminal. Las inclusiones de algunas especies pueden ser cristalíferas llamadas proteínas cristalíferas o δ -endotoxinas las cuales son a menudo tóxicas a insectos y a otros vertebrados. La morfología colonial describe a *Bacillus* como células generalmente redondeadas cuyo diámetro es de 0.4 a 1.8 μm y una longitud de 0.9 a 10 μm , aunque las bacterias de una misma especie suelen tener tamaños regulares. Las morfologías coloniales varían dependiendo el medio de cultivo, sin embargo, las colonias de *Bacillus* en un medio de rutina no son difíciles de identificar, ya que suelen ser grandes con formas y bordes irregulares, de color crema y aspecto ceroso o brillante y algunas incluso muestran rizos (*B. mycoides*) en los bordes.²

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

- Presentan potencialidad como solubilizadores de fosfatos y fijador de nitrógeno atmosférico. Además de que se ha demostrado su utilidad como promotores del crecimiento vegetal.
- Son productores de antibióticos, toxinas, quitinasas, proteasas y metabolitos secundarios. Estos últimos ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana, insecticida y antiparasitaria; además de que constituyen moléculas estimuladoras de crecimiento vegetal y activadoras de mecanismos de resistencia en plantas.²

Se estima que anualmente los insectos plaga ocasionan pérdidas del 20 al 30% de la producción total de algunos cultivos y para controlar este problema los métodos de control de plagas han sido dominados por el uso de insecticidas químicos sintéticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de éstos ha seleccionado el desarrollo de altos niveles de resistencia en las plagas blanco, alta mortalidad en insectos benéficos y contaminación en el medio ambiente.²

En un intento por disminuir estos problemas, los gobiernos, la industria y los científicos han tenido que desarrollar métodos de control de plagas más compatibles ambientalmente, que deben cumplir con ciertos requisitos como ser altamente tóxicos para el organismo blanco, tener la capacidad de ser producidos en masa a escala industrial y tener una vida media larga.²

Entre los agentes de control biológico destacan las bacterias entomopatógenas. En los últimos años se han desarrollado los bioinsecticidas basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis*, cuya actividad insecticida radica en la producción de proteínas tóxicas para los insectos.²

B. thuringiensis es una bacteria grampositiva, cuyo hábitat principal es el suelo, donde es considerado parte de la población bacteriana zimógena, aunque también ha sido aislada de superficies de plantas, cadáveres de insectos y polvo de productos almacenados. Es una bacteria usada como el ingrediente activo para la agricultura en los insecticidas biológicos y para el control de vectores de enfermedades como son los mosquitos y moscas negras en el caso de *B.*

thuringiensis var *israelensis*. Su ciclo de vida es simple. 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, u el oxígeno 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) (Fig 1) en donde radica su actividad bioinsecticida.²

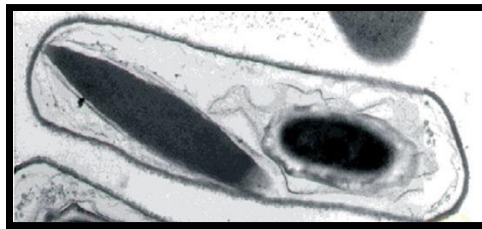


Figura 1: Cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Soberón M, Bravo A. (2011). Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión.(figura).Recuperado de : http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf

Estos cristales están constituidos de las denominadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, que se liberan sólo bajo lisis celular y se encuentran codificadas en plásmidos extracromosomales que se pueden replicar independientemente.

La actividad bioinsecticida de *B. thuringiensis* radica en las proteínas parasporales llamadas Cry. Las toxinas Cry individuales tienen un espectro de actividad insecticida definido, generalmente restringido a unas pocas especies en un orden en particular de lepidópteros (mariposas y polillas), dípteros (mosquitos y moscas), coleópteros (escarabajos y gorgojos), himenópteros (avispas y abejas) y nemátodos.²

Las δ -endotoxinas deben de ser ingeridas para tener efecto. Su modo de acción envuelve varios eventos que deben ser completados varias horas después de su ingestión para que ocurra la muerte del insecto. Empresas como Mycogen o

Monsanto han aprovechado esas características de *B. thuringiensis* lanzando al mercado productos de formulaciones de ésta.²

El potencial de algunas especies del género *Bacillus* consideradas agentes de control biológico de fitopatógenos, recae principalmente en su capacidad para secretar una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y antibacteriana³

3.3 Metabolitos secundarios de *Bacillus*: fuente de bactericidas y antifúngicos

Bacillus spp. secreta muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, antifúngicos y sideróforos. Los metabolitos producidos por *Bacillus* spp. pueden también afectar la microflora en la rizósfera generando un ambiente antagónico hacia los patógenos que lo rodean. La gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial.⁴

Por muchos años, el metabolismo secundario fue ignorado; el estudio de este tipo de metabolismo no esencial se dejó para los científicos de las industrias y los químicos académicos. Hoy en día la situación es diferente. La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y las actividades biológicas que poseen estos productos naturales han inspirado a la industria farmacéutica para buscar nuevas estructuras en cultivos microbianos así como en plantas. Muchos de los productos microbianos que tienen un gran valor comercial y económico son metabolitos secundarios.⁵

Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente

natural.⁵ En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación.⁶

Esta amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos secundarios expande el potencial de la importancia industrial y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas.⁶

La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de metabolitos secundarios producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, hipocolesterolémicos, inmunosupresores, antiparasitarios, herbicidas e insecticidas, entre otros. Los metabolitos secundarios son definidos como sustancias de bajo peso molecular, que no se producen en la vía metabólica primaria y que no juegan un papel fundamental en las funciones primarias o de crecimiento⁶. A diferencia de los metabolitos primarios, los cuales son comunes en todos los sistemas biológicos, los metabolitos secundarios, son química y taxonómicamente diversos, presentando funciones desconocidas⁷.

4.- MARCO DE REFERENCIA

Demain en 1999 reportó que los metabolitos secundarios eran la principal herramienta para el desarrollo de productos para el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos, ya que Strohl en 2004 reportó que una buena

parte de los antibióticos clínicamente relevantes que incluyen drogas antibacterianas y antifúngicas, han sido productos naturales o derivados de ellos^{8,9}.

Luzhetskyy y colaboradores en el año de 2007, comentan que existe una urgente necesidad de desarrollar nuevos antibióticos debido a que las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, al desarrollo y expansión de patógenos multirresistentes, a la evolución de los agentes infecciosos y a la toxicidad de algunos de los compuestos terapéuticos actuales, entre otras razones ¹⁰.

Por otro lado, Hadacek y Greger en el año 2000 realizaron estudios probando en el campo los productos naturales contra diferentes plagas de hongos y bacterias que producen reducciones en el rendimiento de los cultivos y pérdidas económicas millonarias a nivel mundial ¹¹.

Se han utilizado los antifúngicos naturales extraídos de muchos microorganismos contra fitopatógenos causantes de enfermedades de varios cultivos como así lo demostraron Kim y Chung en el año 2004 y Liu y colaboradores en el año 2001^{12,13}.

La búsqueda de microorganismos productores de compuestos biológicamente activos a partir de diversas fuentes naturales ha sido el fundamento de programas de investigación en antibióticos durante más de 30 años, como lo reportó Demain en el año 2006¹⁴.

La expansión de la resistencia hacia algunos antibióticos determina la utilidad terapéutica de fármacos que actualmente están en uso como lo reportaron Bax y otros en el año 2000¹⁵. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, la causa mayoritaria de infecciones adquiridas en el entorno y en el hospital, ha desarrollado resistencia a muchas clases de antibióticos. Enrighten el año de 2003 reportó que existen cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina que aparecieron en el ambiente hospitalario después de la introducción de una meticilina penicilina

sintética, dejando a la vancomicina como última línea de defensa para el tratamiento de esta cepa¹⁶.

Sieradzki y colaboradores en el año de 1999 y Tenover y col. en el 2004 describieron la aparición de aislados clínicos resistentes a vancomicina y reportaron que ninguna clase de antibiótico es efectiva contra las infecciones de *S. aureus* multiresistente^{17,18}. Por lo tanto nuevos antibióticos y terapias son urgentemente necesarias para mejorar el manejo de infecciones bacterianas.

Para ello Romero-Tabarez y col. en el 2006 y Sierra-García y col. en el 2012 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 metilicina y antifúngica.^{19, 20}

5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antibióticos han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define en como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie. Recientemente se han descrito las 2 primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la vancomicina lo que indica que cada vez es más frecuente la asociación de diferentes mecanismos de resistencia para la misma familia de antibióticos en una misma cepa. La monitorización de la resistencia a antibióticos es relevante a nivel local y nacional. Existe una urgente necesidad de desarrollar nuevos antibióticos debido a que las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, al desarrollo y expansión de patógenos multirresistentes, a la evolución de los agentes infecciosos y a la toxicidad de algunos de los compuestos terapéuticos actuales, entre otras razones. La búsqueda de microorganismos productores de compuestos biológicamente activos a partir de diversas fuentes naturales ha sido el fundamento de programas de investigación en antibióticos durante más de 30 años.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta científica:

¿Tendrán actividad biológica los metabolitos extraídos de cepas de *Bacillus* sp inhibiendo a bacterias grampositivas y gramnegativas y hongos fitopatógenos?

6.- JUSTIFICACIÓN

Desde que se está dando un mal uso de antibióticos con el tiempo se han venido descubriendo nuevas cepas capaces de resistir la actividad de ciertos antibióticos, esto está alarmando a la comunidad científica por lo que ha impulsado el estudio y desarrollo de nuevos antibióticos capaces de inhibir a estas cepas resistentes ya que de lo contrario se prevé un alza en la tasa de mortalidad causada por enfermedades infecciosas.

La identificación de bacterias productoras de metabolitos secundarios promisorios por ser altamente activos y de amplio espectro de acción contribuye al conocimiento del potencial de la biodiversidad microbiana de México por lo cual sería de gran importancia evaluar la capacidad de cepas de *Bacillus* sp. nativas para producir compuestos con actividad antibacteriana, y antifúngica. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna, así como atender la problemática actual de carácter local y nacional por la búsqueda de nuevos productos naturales, particularmente antibióticos que hagan frente a la preocupante resistencia de cepas patógenas frente a los fármacos actuales.

El trabajo de purificación y caracterización de compuestos es una ardua tarea que no se puede realizar a cualquier cepa sino solamente a aquellas cepas que demuestren tener un claro poder inhibitorio contra varias bacterias. Por lo que en este proyecto se pretende obtener extractos crudos de cepas de *Bacillus* sp. con capacidad de inhibir a varias bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y hongos Fitopatógenos.

7.- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico de los diferentes extractos obtenidos de una colección de cepas de *Bacillus* aisladas del suelo de los Estados de Tabasco y Baja California.

Objetivos particulares

- 1- Aislar bacterias del género *Bacillus* del suelo y hacer una caracterización macroscópica y microscópica de los diferentes *Bacillus*.
- 2- Extraer el o los metabolitos secundarios de una colección de sobrenadantes de cultivos de 20 cepas de *Bacillus* sp. aisladas del suelo mediante el uso de la resina Amberlita™ XAD-16 (Sigma Aldrich).
- 3- Evaluar el efecto bactericida de los diferentes extractos de cepas de *Bacillus* sp. contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Listeria monocytogenes*.
- 4- Realizar pruebas para determinar el efecto antifúngico de los extractos contra *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp., *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp.

8.-DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Observacional, descriptivo, transversal, experimental y prospectivo

Universo de estudio: Cepas de *Bacillus* aislados de suelos de los Estados de Tabasco y Baja California.

Número de muestras: 10 cepas extraídas del suelo de Tabasco y 10 cepas extraídas del suelo de Baja California.

Criterios de selección de muestra

- Inclusión: Aquellas cepas que tengan morfología macroscópica y microscópica de *Bacillus sp.*
- Exclusión: Aquellas cepas que no tengan morfología de *Bacillus*.

9.-METODOLOGÍA

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

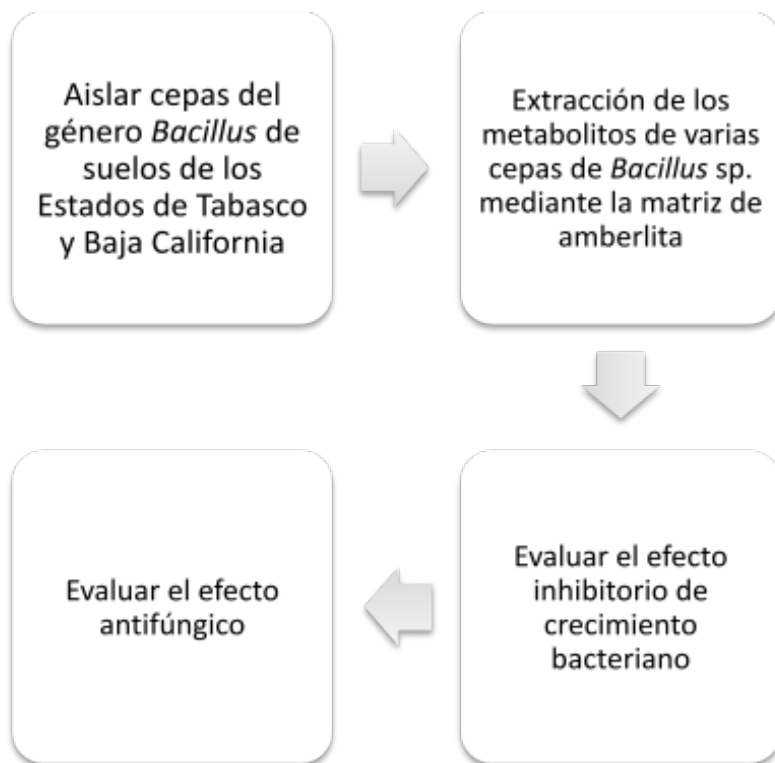


Diagrama 1. Diagrama general de trabajo

Aislamiento de *Bacillus* sp.

De las diferentes muestras de suelo se pesó 1 g, que se disolverá en 5 mL de agua destilada estéril. Se agitará para desprender las bacterias del suelo. Se

tomará 100 μ L para sembrar en placas de medio LB, se incubarán a 28°C toda la noche (20 horas) (ver diagrama 2) y se seleccionarán aquellas colonias de aspecto ceroso típico de *Bacillus sp.* Se observará su morfología colonial. Esas colonias se sembrarán en medio Tris G (5 mL) se incubarán a 28°C con agitación de 2000 rpm y se tomarán alícuotas por varios días para su observación al microscopio mediante un frotis en fresco, para observar la presencia de esporas. (Ver diagrama 3).

Diagrama 2. Aislamiento de *Bacillus spp* silvestre.

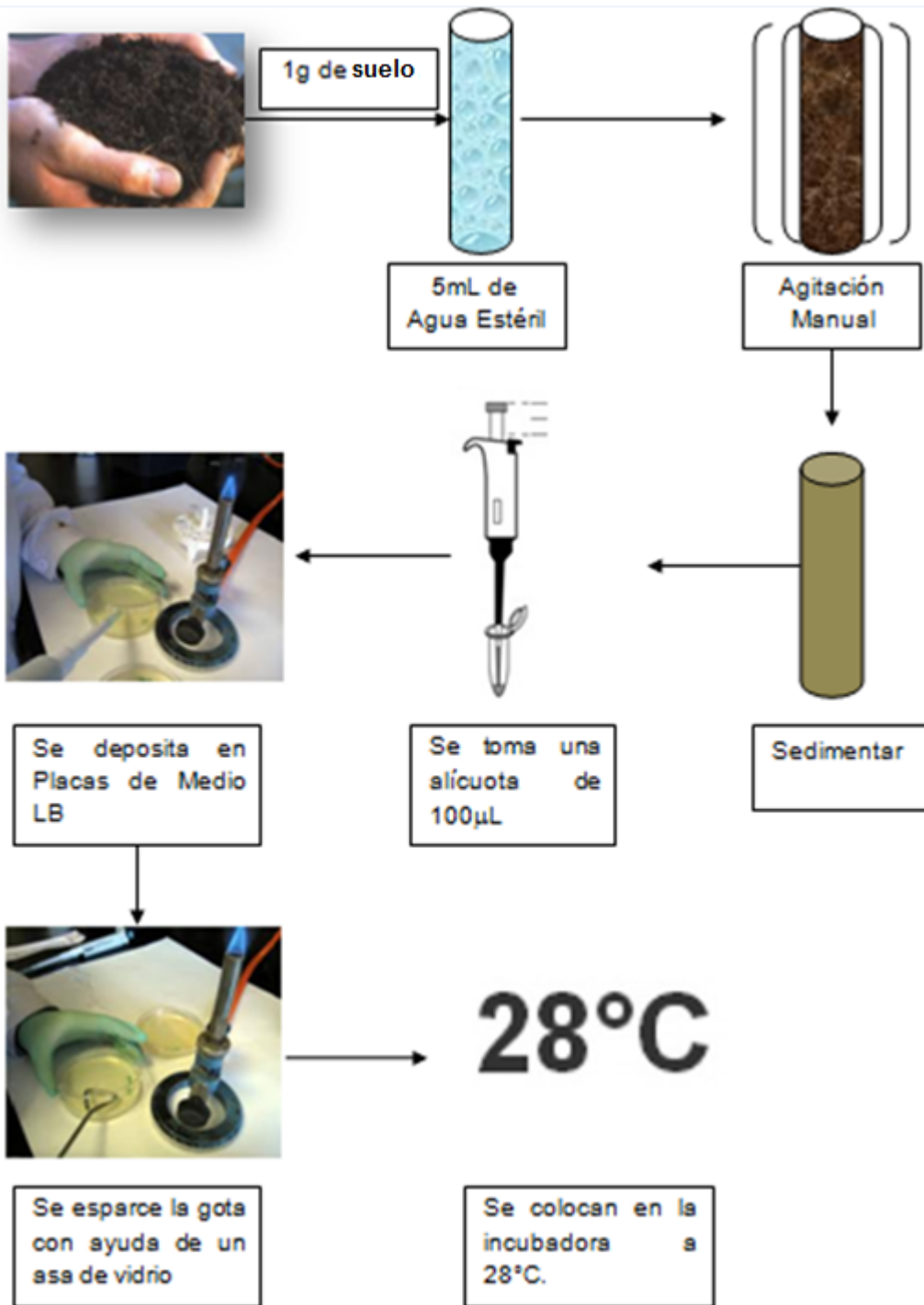
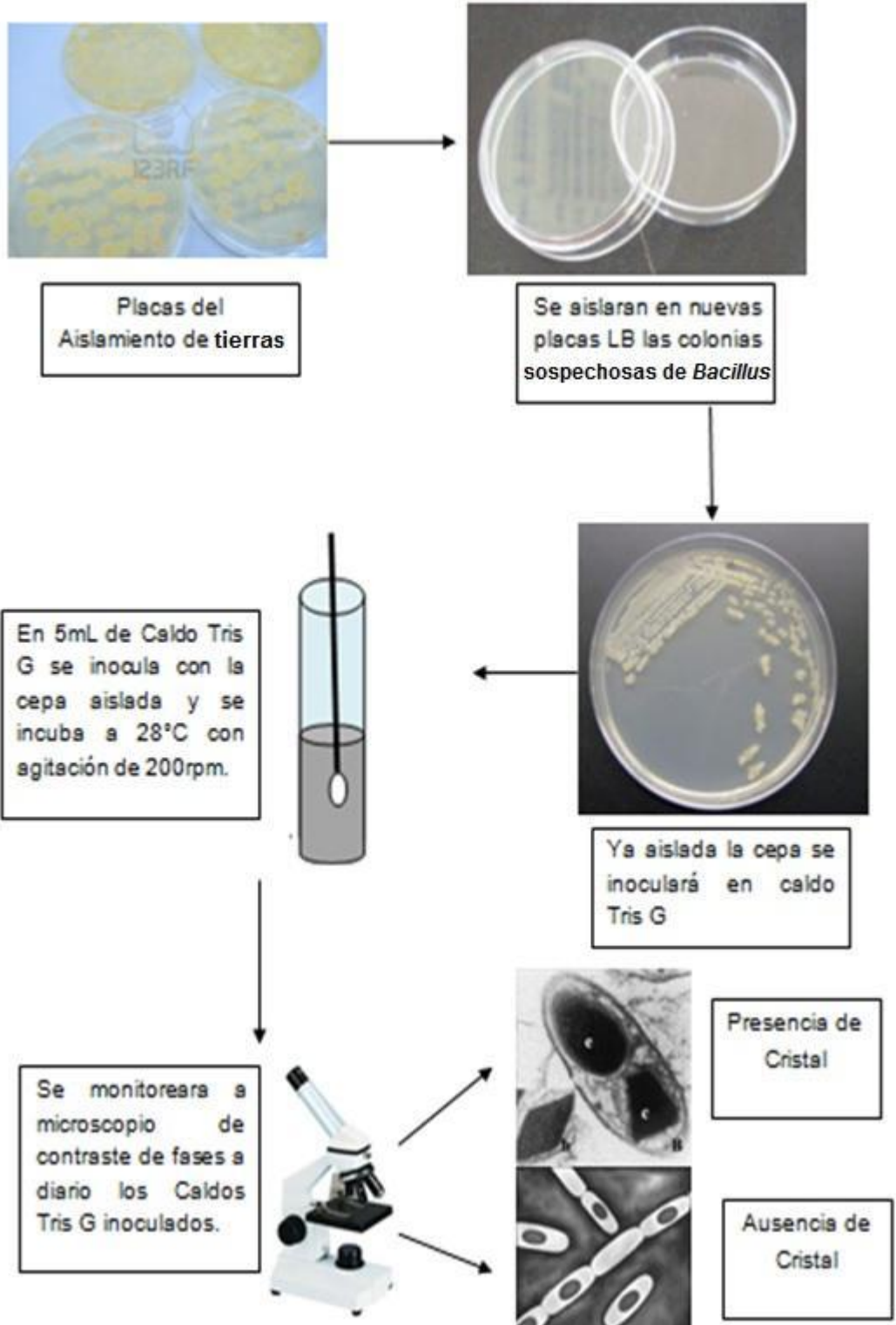


Diagrama 3. Selección de Colonias características de *Bacillus*



Extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus* sp utilizando amberlita.

Para realizar la extracción de metabolitos secundarios se procede a utilizar una matriz de amberlita XAD16 (Sigma aldrich). Esta es una resina macroreticular no iónica que absorbe y libera las sustancias a través de interacciones hidrofóbicas y polares. Las 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 bioproductos²¹. Estas resinas han sido utilizadas con éxito en la identificación y caracterización de antibióticos²¹.

Para ello se pesaron 0.5 gramos de amberlita por cada 100 mL de caldo de cultivo. Posteriormente se hicieron lavados de la siguiente forma: se colocó la amberlita pesada en un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada durante media hora, y se agitó continuamente. Luego se decantará el agua y se colocará en el vaso 50 mL de metanol, se agitará continuamente durante media hora. Repetir este paso, 2 veces. Posteriormente se decantará el metanol.

Después de lavar la amberlita se agregará al caldo de cultivo ya inoculado con una asada de la cepa de interés de la siguiente manera: se pondrán las cepas en 500 mL de medio LB durante 7 días, esto para asegurarse de que estén en la fase estacionaria que es la fase adecuada para la excreción de metabolitos secundarios y a los cultivos se les añadirá la amberlita, para ello se colocó en el vaso que contiene la amberlita, de 5-7 mL de agua destilada estéril con el objetivo de que toda la amberlita sea retirada del vaso y se pase al caldo de cultivo. Se etiquetará cada matraz que contenga el caldo inoculado y la amberlita con el nombre de la cepa, cantidad de caldo de cultivo y la fecha. La incubación se realizó a 30 °C durante 7 días con agitación a 200 rpm.

Posteriormente viene la etapa de extracción. Después de los 7 días, se retiró del matraz todo el caldo de cultivo quedándose sólo con la amberlita. Se colocó la amberlita en un vaso de precipitado con 60 mL de metanol, se agitará continuamente durante 20 minutos aproximadamente, hasta que la amberlita quede de color blanco nuevamente y el metanol se haya coloreado. Se decantó,

desechó la amberlita y el sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante ya centrifugado obtenido, se colocó en matraces de bola para evaporar. Se evaporó en rotavapor hasta tener aproximadamente 10 mL del extracto y se filtró con membranas de 0.45 micras para eliminar esporas y células. Se evaporó nuevamente hasta obtener aproximadamente 1 mL del extracto y se colocó el extracto en recipientes individuales etiquetados y se colocó en la estufa a secar durante 24 horas a 28°C. Pasado este tiempo se verificó que los residuos estuvieran secos completamente. Se rasparon los residuos del recipiente para obtener el sólido del extracto y se guardó el sólido obtenido en tubos rotulados.

Evaluación del efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano de los metabolitos extraídos de las cepas de *Bacillus*

Se preparó cultivos en suspensión de las bacterias que se tienen que probar con los extractos de *Bacillus*, con 3 mL de caldo LB, incubándolos a 29 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De los cultivos en suspensión se sembraron 100 μ l. en cajas Petri.

Por otro lado, con los extractos de cada cepa de *Bacillus* se mojaron discos de papel filtro, previamente esterilizados. Estos discos se colocaron en las placas que fueron inoculadas con las diferentes bacterias y se dejaron en incubación a 29°C durante un día. Como controles se pusieron dos discos de papel uno con agua (control negativo) y otro con un antibiótico conocido (control positivo). Al día siguiente se observó el grado de inhibición midiendo el halo de inhibición alrededor del disco de papel en milímetros de diámetro (Figura 2).

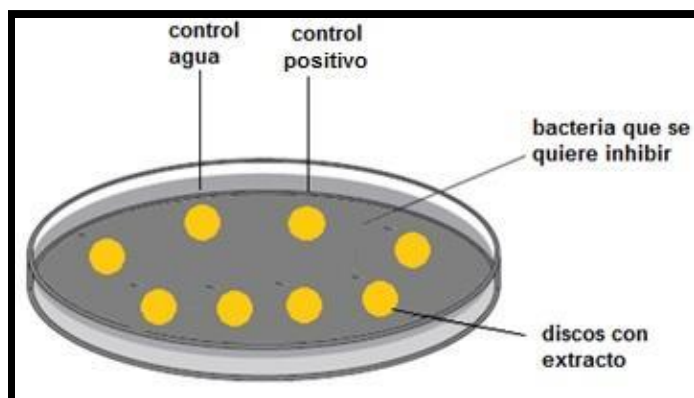


Figura 2. Esquema del experimento del efecto inhibitorio de los extractos.

Evaluación del efecto antifúngico de los metabolitos extraídos.

Con una varilla de vidrio se esparcieron 100 μ l de la suspensión de esporas de cada hongo a inhibir sobre la superficie de una placa de medio PDA de 100 x 15 mm. Por otro lado, los extractos de cada cepa de *Bacillus* se colocaron en discos de papel filtro estéril. Estos discos se colocaron en las placas que fueron inoculadas con las esporas de los diferentes hongos y se dejaron en incubación a 29°C durante 48 h. Como control negativo se pondrá un disco de papel filtro con 10 μ l de agua estéril, y como control positivo un disco impregnado con una solución de 10 μ l de miconazol tal como se muestra en la Figura 3. En los días siguientes se observó los resultados. Los hongos utilizados serán *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp., *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp.

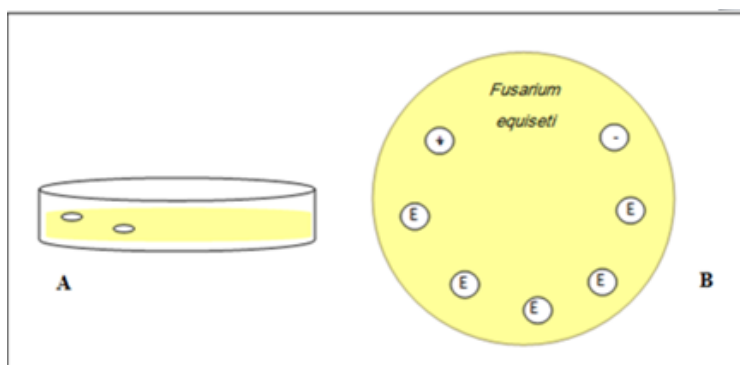


Figura 3. Esquema del experimento del efecto antifúngico de los extractos

10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de metabolitos secundarios de *Bacillus sp.* utilizando amberlita

Se utilizaron 20 cepas de *Bacillus sp.*, las cuales aparecen mostradas en la Tabla 1. Estas cepas fueron estudiadas a nivel morfológico observando su morfología colonial. Este dato resulta interesante cuando se quiere hacer una preclasificación ya que las bacterias del género *Bacillus* presentan características similares entre ellas².

Siguiendo la metodología ya mencionada anteriormente se llevó a cabo la extracción de metabolitos secundarios de estas 20 cepas. Al final del proceso, se obtuvieron extractos secos de color café, que fueron pesados y depositados en tubos Eppendorf.

Tabla 1: Cepas de *Bacillus sp.* aisladas del suelo de Tabasco y Baja California

NOMBRE	PROCEDENCIA	ESPECIE	ESPORAS	CRISTAL	OBSERVACIONES
ELI 316	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias color beige, de bordes regulares, opacos. Bacilos alargados e inmóviles.
ELI 317	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias rizoides, color beige. Bacilos alargados, inmóviles; esporas de bordes redondos.
ELI 318	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Bacilos pequeños inmóviles, abundantes esporas con bordes definidos y redondos.
ELI 319	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias beige de bordes regulares definidos. Bacilos cortos inmóviles, opacos.

ELI 320	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	SI	Colonias blanquecinas y opacas. Se observa un diamante sospechoso de <i>B. thuringiensis</i> .
ELI 321	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Bacilos alargados inmóviles. Esporas redondas de contornos definidos color negro.
ELI 322	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	SI	Sospechoso de <i>B. thuringiensis</i> . se observa bacilo corto que tiene un diamante en la parte final con brillo.
ELI 323	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias color blancas, porosas con bordes regulares definidos, son opacas.
ELI 324	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias beige asperosas opacas. Los bacilos son cortos e inmóviles.
ELI 325	Col. Abraham de la Cruz Cunduacán, Tabasco.	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias blancas, asperosas opacas sin estrías. Bacilos cortos e inmóviles.
ELI 326	Col. Mariano Matamoros, Baja california	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Rizoide de superficie plana, color amarillo, apariencia seca. Bacilos largos
ELI 327	Col. Mariano Matamoros, Baja california	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Forma irregular, opaco, bordes ondulados, color amarillo claro. Bacilos medianos
ELI 328	Col. Mariano Matamoros, Baja california	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Forma circular, color piel, opaco, superficie plana. Bacilos largos, inmóviles
ELI 329	Col. Mariano Matamoros, Baja california	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Rizoides, opaco, superficie plana, forma irregular,

					color amarillo. Estreptobacilos cortos
ELI 330	Col. Mariano Matamoros, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Forma irregular tipo circular, ligeramente convexo, opaco.
ELI 331	Rancho, Tecate, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Rizoide muy abundante, ligeramente brillante, elevación plana, formas irregulares. Bacilos de tamaño medio
ELI 332	Rancho, Tecate, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Colonias pequeñas tipo puntiforme, bordes definidos, superficie brillante, amarillo grisáceo. Bacilos medios
ELI 333	Rancho, Tecate, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Forma tipo redonda, bordes indefinidos, opaco a transluz, superficie brillante
ELI 334	Rancho, Tecate, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Ligeramente blanca, bordes definidos, opaco. Bacilos cortos
ELI 335	Rancho, Tecate, Baja California	<i>Bacillus sp.</i>	SI	NO	Color blanco. Formas irregulares, bordes definidos, translúcida, de superficie opaca. Bacilos delgados

Evaluación del efecto inhibitorio de los metabolitos extraídos contra bacterias.

Se evaluó el efecto inhibitorio de los metabolitos extraídos de ELI316 al ELI335 (150 mg/ml) contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Para llevar a cabo estas pruebas, se utilizó un disco de papel impregnado con agua estéril como control negativo, en el caso del control positivo se usó vancomicina (333 mg/ml) para grampositivas y ampicilina (333 mg/ml) para gramnegativas.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto inhibitorio de los 20 extractos en bacterias grampositivas se muestran en Tabla 2 y en bacterias gramnegativas Tabla 3.

Tabla 2: Halos de inhibición en mm de los diferentes extractos contra las bacterias grampositivas

Extracto	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Lysteria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus Agalactiae</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
ELI316	15	14	9	7	10	10
ELI317	12	0	0	8	8	12
ELI318	15	0	0	0	9	8
ELI319	15	0	0	8	0	7
ELI320	22	14	0	35	25	14
ELI321	20	13	0	12	12	9
ELI322	19	10	0	12	8	18
ELI323	17	0	0	0	0	0
ELI324	16	14	10	14	9	9
ELI325	20	10	10	13	12	11
ELI326	17	0	0	0	6	7
ELI327	14	7	0	0	0	7
ELI328	20	10	10	14	11	9
ELI329	20	8	10	12	12	11
ELI330	26	17	18	7	14	12
ELI331	27	16	20	10	14	11
ELI332	20	9	8	12	10	12
ELI333	17	9	0	0	0	10
ELI334	30	17	16	13	15	12
ELI335	25	14	11	20	14	11
Vancomicina	32	28	25	29	26	23

Tabla 3: Halos de inhibición en mm de los diferentes extractos contra las bacterias gramnegativas

Extracto	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Shigella sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio cholera</i>
ELI316	0	0	0	0	0	32	0	0
ELI317	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI318	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI319	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI320	0	0	0	0	0	20	0	0
ELI321	0	0	0	0	0	19	0	0
ELI322	0	0	0	0	0	7	0	0
ELI323	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI324	0	0	0	0	0	28	0	0
ELI325	0	0	0	0	0	26	0	0
ELI326	0	0	0	0	0	9	0	0
ELI327	0	0	0	0	0	20	0	0
ELI328	0	0	0	0	0	15	0	0
ELI329	0	0	0	0	0	14	0	0
ELI330	0	0	0	0	0	24	0	0
ELI331	0	0	0	0	0	26	0	0
ELI332	0	0	0	0	0	26	0	0
ELI333	0	0	0	0	0	20	0	0
ELI334	0	0	0	0	0	32	0	0
ELI335	0	0	0	0	0	28	0	0
Ampicilina	18	17	0	17	14	42	0	10

Se puede observar que la mayoría de los extractos, tienen inhibición contra las bacterias grampositivas, siendo ELI330 y ELI331 los dos con mayor poder inhibitorio al inhibir a todas las bacterias grampositivas presentando los halos de inhibición con mayor diámetro en comparación con los demás extractos. Sin embargo, ninguno de los extractos tuvo poder inhibitorio sobre las bacterias

gramnegativas probadas. Esto demuestra que los extractos tienen metabolitos con especificidad contra bacterias grampositivas.

Las figuras 4 y 5 muestran los antibiogramas realizados en bacterias grampositivas y gramnegativas.

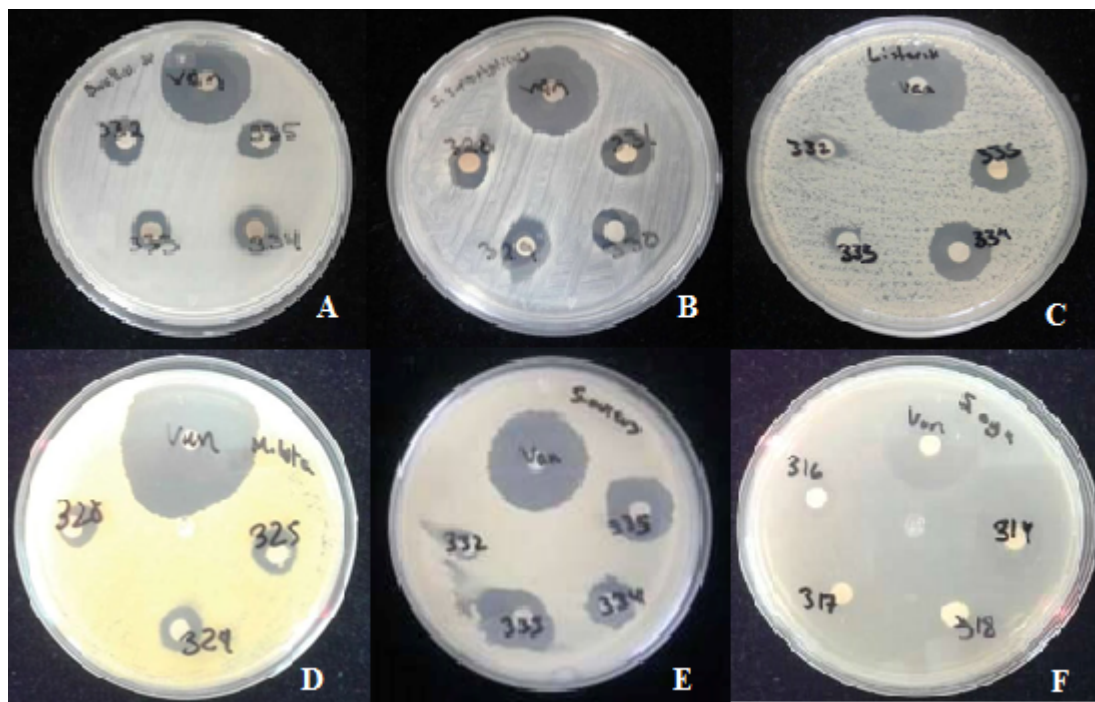


Figura 4: Antibiogramas realizados en bacterias grampositivas. A) *Bacillus cereus*; B) *S. saprophyticus*; C) *L. monocytogenes*; D) *M. luteus*, E) *S. aureus*; F) *S. agalactiae*.

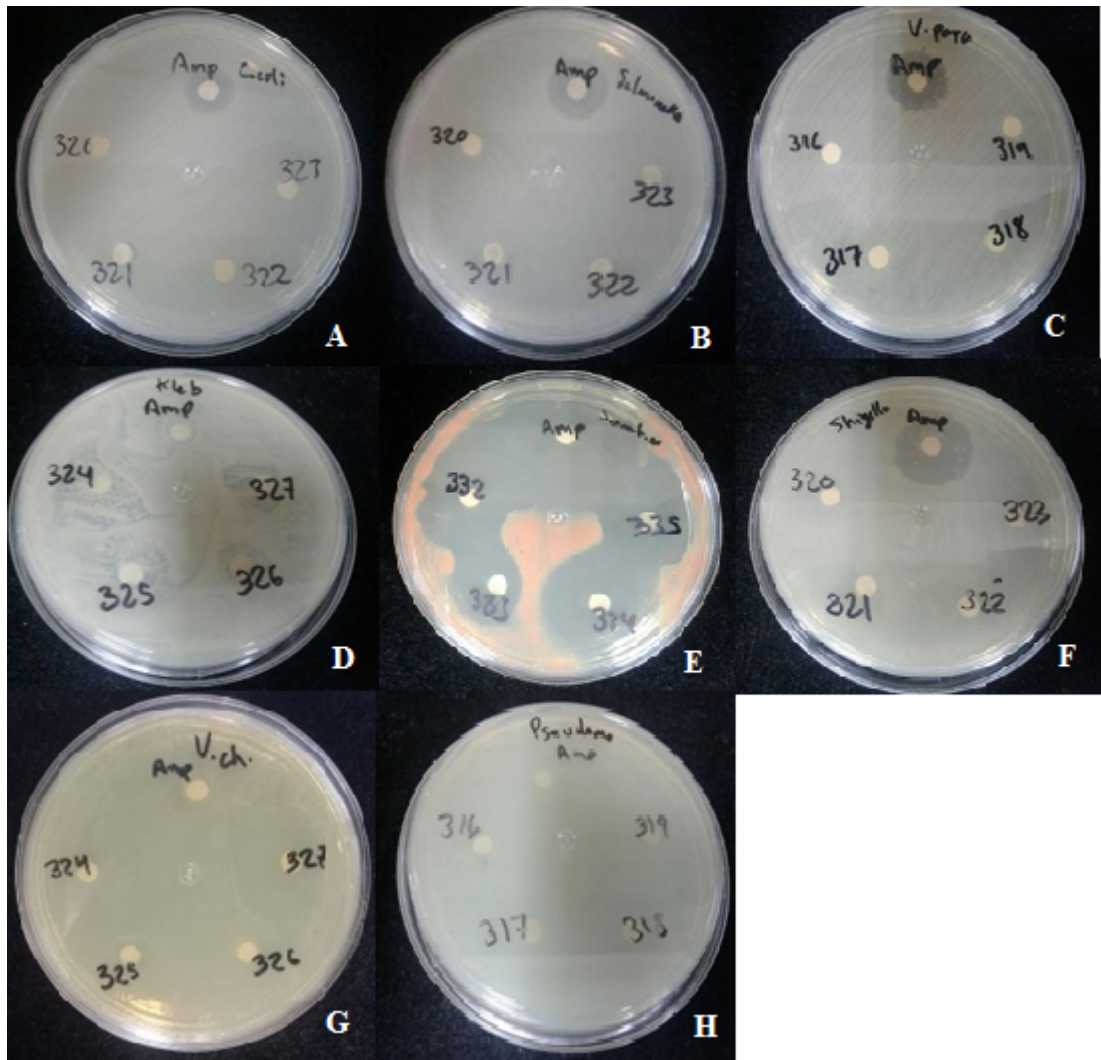


Figura 5: Antibiogramas realizados en bacterias gramnegativas. A) *E. coli*, B) *Salmonella typhi*, C) *V. parahaemolyticus*, D) *Klebsiella pneumoniae*, E) *Serratia marcescens*, F) *Shigella* sp., G) *V. cholerae*, H) *Pseudomonas aeruginosa*

Evaluación de la actividad fungicida de los metabolitos extraídos

Se evaluó la actividad fungicida de los metabolitos extraídos en los hongos anteriormente mencionados. Para llevar a cabo estas pruebas, se utilizó un disco de papel impregnado con agua estéril como control negativo, en el caso del control positivo se usó miconazol. Los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4: Halos de inhibición en mm de los diferentes extractos contra los hongos probados								
Extracto	<i>Mucor sp</i>	<i>Paecilomyces sp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>M. roleri</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Rhizopus</i>
ELI316	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI317	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI318	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI319	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI320	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI321	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI322	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI323	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI324	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI325	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI326	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI327	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI328	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI329	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI330	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI331	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI332	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI333	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI334	0	0	0	0	0	0	0	0
ELI335	0	0	0	0	0	0	0	0
Miconazol	5	29	11	35	22	30	38	5

Como se puede observar ningún extracto muestra poder inhibitorio contra ninguno de los hongos probados (Figura 6).

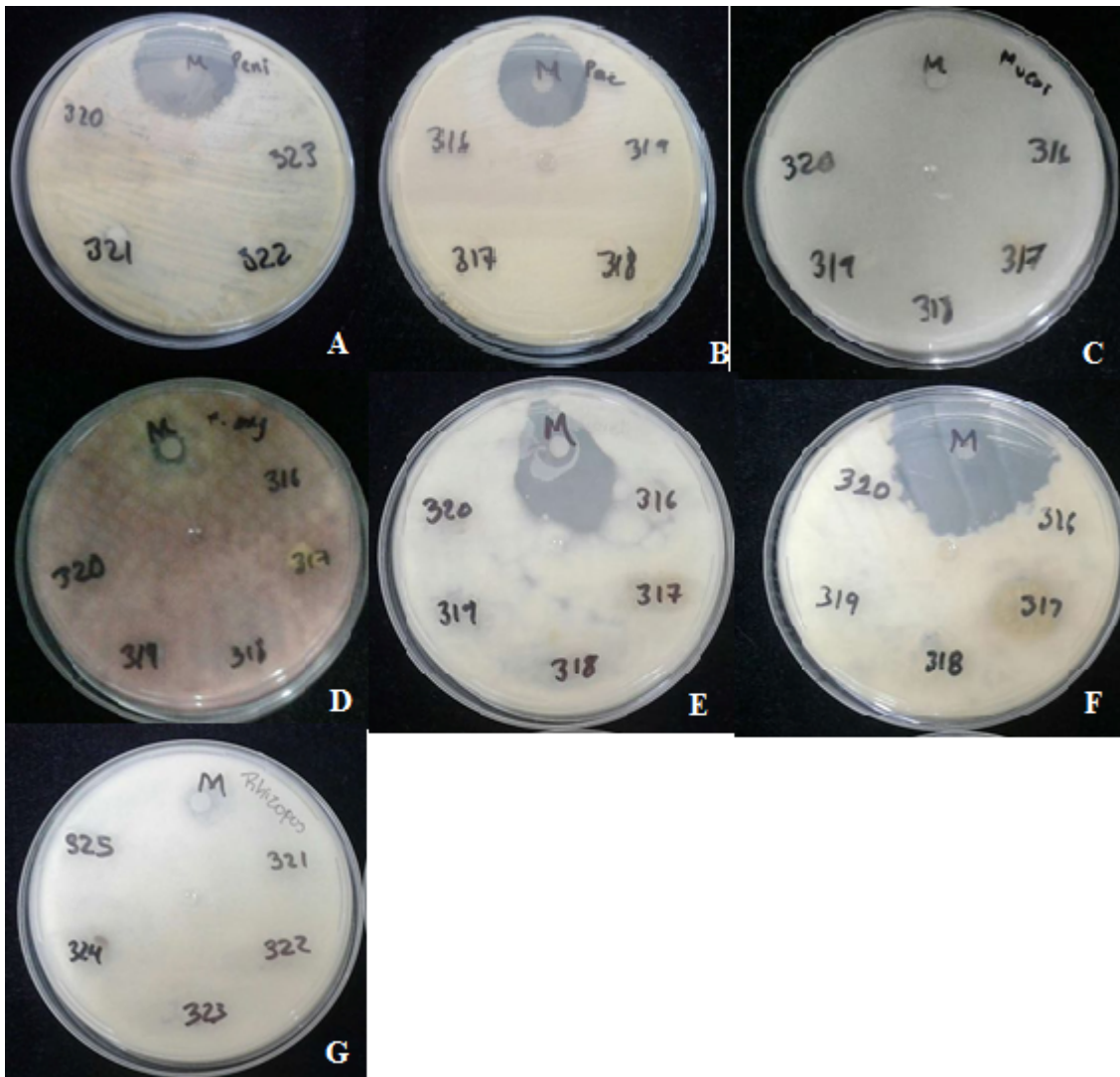


Figura 6. Antagonismos realizados en hongos. A) *Penicillium* sp, B) *Paecylomices* sp., C) *Mucor* sp., D) *F. oxysporum*, E) *M. roreri*, F) *F. avenaceum*, G) *Rhizopus* sp.

Es importante señalar que los extractos obtenidos de las cepas son extractos crudos es decir son una mezcla de sustancias no identificadas ni cuantificadas ya que pueden ser demasiados metabolitos secundarios producidos por una misma cepa y por lo tanto pueden presentar diferente actividad biológica. ¹ Esto es importante remarcar ya que al realizar los antibiogramas se utilizó una concentración de 150 mg/ml del extracto crudo correspondiente de cada cepa.

Aclarado el punto anterior se puede discutir lo siguiente:

En los casos en el que los extractos presentaron halos de inhibición no se sabe que metabolito secundario específico es responsable de la inhibición de la bacteria porque como ya se mencionó son extractos crudos y para saber cuál es el metabolito responsable de la inhibición se tendría que hacer una separación de cada extracto crudo para identificar cada uno de los metabolitos que lo componen e identificar cual o cuales son los que presentan la actividad inhibitoria; esto representa un arduo trabajo de investigación que posteriormente se puede realizar pero por el momento no es el objetivo de este trabajo.

Al no saber que sustancias ni cuantas sustancias componen cada extracto crudo producido por su correspondiente cepa tampoco se sabe la concentración del metabolito secundario activo del extracto crudo; es decir en los antibiogramas realizados se utilizó una concentración de 150 mg/ml de extracto crudo de cada cepa, pero en sí la concentración del metabolito activo es desconocida sin embargo se deduce que es menor a 150mg/ml ya que esa concentración es del extracto crudo y el extracto crudo tiene varias sustancias químicamente relacionadas que no se sabe en qué proporción se encuentran por lo que es imposible saber la concentración exacta del metabolito activo capaz de inhibir a la bacteria.

Todo esto es importante para poder interpretar los resultados ya que como se ve en los antibiogramas que son pruebas cualitativas, en los cuales se evaluó la inhibición del crecimiento de los distintos microorganismos ya mencionados. Tomando en cuenta lo antes mencionado en los casos en que se presentó halos de inhibición se considera lo siguiente:

- El extracto contiene uno o más sustancias capaces de inhibir el crecimiento de determinada cepa.
- La concentración de ese metabolito activo es menor a 150 mg/ml al ser una concentración baja es muy prometedor de que al incrementar su concentración sea más eficaz al inhibir cierto microorganismo.

Considerando lo anterior se observa que los extractos obtenidos contienen diferentes sustancias que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos principalmente bacterias grampositivas presentando halos de inhibición de diferente tamaño mostrando así la diferente capacidad inhibitoria de cada extracto según sus metabolitos que lo componen.

Los extractos de las cepas ELI 330, ELI 331 son extractos que merecen ser estudiados ya que presentan los halos de inhibición más grandes en comparación con los demás y que inhiben a todas las bacterias grampositivas probadas en este trabajo.

11.- CONCLUSIONES

- Los extractos obtenidos de las cepas ELI316, ELI324, ELI325, ELI328, ELI329, ELI330, ELI331, ELI332, ELI334 y ELI335 fueron los que mostraron inhibición contra todas las bacterias grampositivas y los extractos obtenidos de las cepas ELI330 y ELI331 fueron los que presentaron los mayores diámetros de los halos de inhibición.
- Ninguno de los extractos tuvo poder inhibitorio contra las bacterias gramnegativas probadas, solo algunos lograron inhibir a *Serratia marcescens*.
- Tampoco ningún extracto tuvo inhibición contra los hongos probados.
- Estos datos hacen suponer que los compuestos que se encuentran en los extractos crudos son muy específicos contra bacterias grampositivas.

12.- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Karlovsky, P. (2008) Secondary metabolites in soil ecology. In: Karlovsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1–19
- 2- Sansinenea E. (2012), *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer, Países bajos.
- 3- Sansinenea E, Rojas N, Flores E, Anastacio E, Sanchez P, Vazquez C, Zumaquero L, Negrete Erasmo (2004). δ -Endotoxina de *Bacillus thuringiensis*: una proteína insecticida específica. En: “Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero” Rocha-Gracia R, Martinez-Laguna Y, Lozano-Zarain P (Eds). BUAP, pp 213-232.
- 4- Velusamy P, Gnanamanickam SS (2008) The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: Karlovsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–106.
- 5- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 56:845–857
- 6- Sansinenea E, Ortiz A (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. Biotechnol Lett 33:1523–1538.
- 7- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics, 58: 1-26.
- 8- Demain AL. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 52: 455-463.

- 9- Strohl WR. (2004). Antimicrobials. En: Bull AT, editor. Microbial diversity and bioprospecting. Washington D. C. (U. S. A.): ASM Press. p. 336-356.
- 10-Luzhetskyy A, Pelzer S, Bechthold A. (2007). The future of natural products as a source of new antibiotics. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 8: 608-613.
- 11-Hadacek F, Greger H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis Journal*, 11: 137-147.
- 12-Kim PI, Chung K. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234: 177-183.
- 13-Liu CH, Zou WX, Lu H, Tan RX. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282.
- 14-Demain AL. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 486-495.
- 15-Bax R, Mullan N, Verhoef J. (2000). The millennium bugs—the need for and development of new antibacterials. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16: 51–59.
- 16-Enright MC. (2003). The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:474–479.
- 17-Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. (1999). The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N. Engl. J. Med.* 340:517–523.
- 18-Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:275–280.

- 19-Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsford H, Häußler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G. 2006. 7-O-malonyl 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*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 1701-1709.
- 20-Sierra-García I, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S. 2012. Determination of the antimicrobial and insecticidal activities in extracts produced by bacteria isolated from soil. *Actual Biol* 34, 96:5-19
- 21-Casey JT, Walsh PK, O'Shea DG. 2007. Characterization of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from the fermentation broth. *Separation and Purification Technology*, 53: 281-288.