



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS METABOLITOS EXTRAIDOS DE CEPAS
DE BACILLUS SP AISLADAS DEL ESTADO DE
TLAXCALA”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

JOCELYN GRANDE TECOCOATZI

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO

H. PUEBLA DE ZARAGOZA

MARZO DEL 2019



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno
de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
GRANDE TECOCOATZI JOCELYN

realizada en el area de Microbiología, comunican a Ud. la aprobación
de la misma con la siguiente redacción:

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS
EXTRAIDOS DE CEPAS DE BACILLUS SP AISLADAS DEL ESTADO DE
TLAXCALA"**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los
18 días del mes de Febrero de 2019

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

MC. ALEJANDRO CESAR RUIZ TAGLE

MSP. MARIA DE LA CRUZ MENESES SANCHEZ

MC. PATRICIA GPE. SUAREZ ALBORES



C.c.p. Archivo

Vo. Bo.

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Estibaliz Sansinenea Royano y al Dr. Aurelio Ortiz Márquez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por brindarme su confianza, su apoyo, su cariño y su constante motivación.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo económico para el desarrollo de esta tesis.

A mis padres Francisco Grande Hernández y Alejandra Tecocoatzi Tecante por ser los cimientos de mi desarrollo, por su sacrificio y esfuerzo de cada día para forjarme como la persona que soy en la actualidad. Ustedes, son mi mayor inspiración para alcanzar mis sueños.

Para Francisco Salazar de la luz, Jessica Vaca Calderón y compañeros que conforman el laboratorio de biotecnología microbiana, por estar conmigo en todo este proceso, por compartirme su conocimiento y ayudarme con suficiente esmero.

A mis demás amigos y familiares que siempre estuvieron impulsándome a culminar esta meta con éxito.

Y a Dios por permitirme sonreír ante cada uno de mis logros que son resultado de su amor incondicional, por darme la oportunidad de demostrarme que puedo lograr todo lo que me proponga.

Gracias por tanto.

ÍNDICE

RESUMEN5
INTRODUCCIÓN6
MARCO TEÓRICO8
MARCO DE REFERENCIA21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA2 3
JUSTIFICACIÓN2 4
OBJETIVOS2 5
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	

2 6
METODOLOGÍA2 7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN3 4
CONCLUSIONES4 6
BIBLIOGRAFÍA4 7

1- RESUMEN

2- INTRODUCCIÓN

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 compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. 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. En este contexto se han evaluado microorganismos, se han aislado y caracterizado química y biológicamente sus metabolitos secundarios, y se ha estudiado el papel que estos juegan en el control de enfermedades y en las respuestas de defensa.

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.

En la actualidad, 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.

Actualmente, en el sector agrícola se tiene un problema latente que no ha podido ser controlado en su totalidad, y es el desarrollo frecuente de diversos tipos de plagas en cultivos agrícolas. Si bien es cierto, lo anterior ha traído como consecuencia pérdidas cuantiosas de cultivo y por ende cuantiosas pérdidas económicas, en donde se pierde alrededor de un 20 y 30% de la producción total de cultivos

En el presente trabajo se extraerán metabolitos secundarios, de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de diferentes suelos del Estado de Tlaxcala y se evaluará su actividad inhibitoria contra bacterias como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerasuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*. Así mismo, se evaluará el efecto antifúngico de dichos metabolitos contra hongos tales como *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp, *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp.

3- MARCO TEÓRICO

3.1 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 108 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.

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.¹

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.

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.

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.

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.

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.

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 esporulan produciendo una endospora y un cuerpo parasporal o cuerpo de inclusión (cristal) (Fig 1) en donde radica su actividad bioinsecticida.

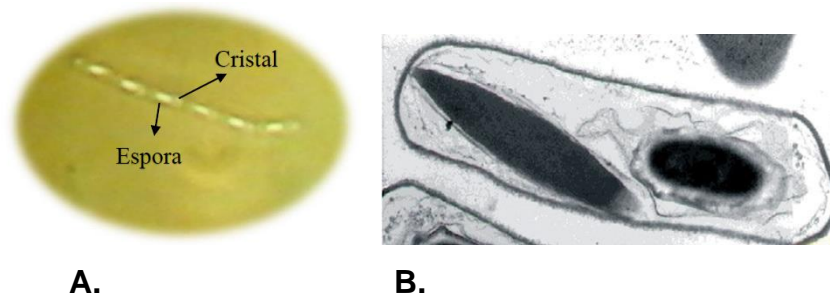


Figura 1: A) Cristales y esporas de *B. thuringiensis*.

B) *B. thuringiensis*, dentro la espora y el cuerpo de inclusión.

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 (avispa y abejas) y nemátodos.

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.

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 antibacteriana ².

3.2 Bacterias de importancia clínica utilizadas en este estudio

Se sabe que la mayoría de las infecciones y problemas de salud en los seres humanos se debe a la presencia de bacterias patógenas y que por ello son de gran importancia en la salud. En este estudio se utilizaron algunas de ellas y se describen a continuación.

Serratia marcescens es un bacilo Gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae. Puede ser peligroso para el hombre, ya que a veces es patógena, como causa de infecciones nosocomiales y urinarias. Cuando crece a 30 °C las colonias son de color rojo ocasionado por el pigmento prodigiosina, por lo cual es de fácil identificación.³

Staphylococcus aureus conocido como estafilococo áureo, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, Grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil, que forma racimos de cocos, que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Puede producir una amplia gama de enfermedades y en la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina.⁴

Klebsiella pneumoniae es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella* de la familia Enterobacteriaceae, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Son bacterias Gramnegativas, la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. *Klebsiella pneumoniae*, dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de herida quirúrgica.⁵

Escherichia coli, es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo Gramnegativo, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.⁶

Staphylococcus saprophyticus es un coco Grampositivo, coagulasa negativo, anaerobio facultativo, no formador de cápsula, no formador de spora e inmóvil. Es catalasa y oxidasa positivo. Posee la enzima ureasa y es capaz de adherirse a las células epiteliales del tracto urogenital. Su hábitat normal no se conoce con exactitud. Es causa frecuente de infecciones del tracto urinario en mujeres jóvenes.⁷

Streptococcus agalactiae, es un coco Grampositivo, beta-hemolítico, catalasa negativo, oxidasa negativo y anaerobio facultativo, caracterizado por presentar el grupo B de antígenos Lancefield. Se puede encontrar en el aparato digestivo, urinario y genital de los adultos. Aunque una infección por EGB normalmente no ocasiona problemas a las mujeres sanas antes del embarazo, puede provocar una enfermedad grave a la madre y al bebé durante la gestación y después del parto.

Una de cada cuatro o cinco mujeres embarazadas tiene estreptococos grupo B en el recto o en la vagina. En estas mujeres, una infección por EGB puede causar corioamnionitis (infección grave de las membranas placentarias) e infección posparto (después del nacimiento). Las infecciones del aparato urinario causadas por los EGB pueden inducir el trabajo de parto y provocar un parto prematuro.

Salmonella sp. es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos Gramnegativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Algunas salmonellas son comunes en la piel de tortugas y de muchos reptiles, lo cual puede ser de cuidado cuando se manipulan este tipo de mascotas a la vez con alimentos. Produce salmonelosis con un periodo de incubación de entre 5 horas y 5 días, diarrea y dolor abdominal.⁵

Vibrio cholerae es una bacteria Gramnegativa con forma de bastón curvo que provoca el cólera en humanos. Junto con otra especie de género *Vibrio* pertenece a la subdivisión gamma de las Proteobacterias. Hay dos biotipos principales de *V. cholerae*, clásica y El Tor, y numerosos serogrupos.⁸

Vibrio parahaemolyticus es un bacilo Gramnegativo, es móvil y no presenta cápsula ni espora. Tolerla la sal común por lo que se desarrolla en el agua del mar y puede crecer a pH 9 en medios ligeramente básicos. Está asociado al consumo de mariscos y en algunos lugares como en Japón hay que tener especial cuidado con él. Es capaz de causar gastroenteritis.⁵

Shigella sp. es un género de bacterias con forma de bacilo Gramnegativas, inmóviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que pueden ocasionar diarrea en los seres humanos. Fue descubierto hace 115 años por el científico japonés Kiyoshi Shiga, de quien tomó su nombre. La infección por *Shigella*, típicamente comienza por contaminación fecal-oral. Dependiendo de la edad y la condición del hospedador, son suficientes alrededor de 200 organismos para causar una infección. *Shigella* causa disentería, resultando en destrucción de las células epiteliales de la mucosa intestinal a nivel del ciego y el recto.⁹

Listeria monocytogenes es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de la Listeriosis. Es uno de los patógenos causantes de infecciones

alimentarias más violentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30%, más alta que casi todas las restantes toxico infecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es un bacilo Grampositivo, pequeño (0,4 a 0,5 micrones de ancho x 0,5 a 1,2 de largo) no ramificado y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan.¹⁰

3.3 Hongos fitopatógenos utilizados en este estudio

Los hongos fitopatógenos son aquellos que causan daño a los productos agrícolas antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. 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 productos¹¹. 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 plantas¹².

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. 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.¹³

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 2). 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*¹⁴.



Figura 2. Pudrición de durazno por *Mucor* sp.

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^{15, 16}. Dentro del género *Fusarium* encontramos a especies de importancia agrícola como: *F. avenaceum*, y *F. 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. *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*), romero (*Rosmarinus officinalis*), plátano (*Musa paradisiaca*), lechuga (*Lactuca sativa*) etc.

17

Penicillium sp. 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 3). 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 toxinas¹⁸.



Figura 3. Podredumbre azul en limón (*Citrus limon*) por *Penicillium* sp.

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

Moniliophthora
Basidiomycota que
moniliasis, uno de los
el cacao (*Theobroma*
chocolate) y su
Latinoamérica (Figura



roreri es un hongo
causa la enfermedad de
problemas más graves para
cacao - fuente del
producción en
4). En México, en el estado

de Tabasco, el primer reporte de la enfermedad fue en Abril 2005,¹⁹ y en el 2007 la

moniliasis invadió todas las áreas de cacao del estado, convirtiéndola en el mayor factor limitador de la producción de cacao como también en Nicaragua y Honduras.

Figura 4. Moniliasis del cacao por *Moniliophthora roreri*.

3.4 Metabolitos secundarios: 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.²⁰

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.²¹

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.

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.²² 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.²³

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.²⁴

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 crecimiento²⁵. 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 desconocidas²⁶.

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^{27, 28}.

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 ^{27, 29}.

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 ³⁰.

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^{31,32}.

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 2006³³.

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 2000³⁴. 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 cepa³⁵.

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^{36,37}. 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 meticilina y antifúngica.^{38, 39}

5- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es uno de los países con mayor diversidad biológica, sin embargo no ha enfocado sus esfuerzos para el conocimiento de la biodiversidad microbiana y su consecuente potencial biotecnológico como productores de metabolitos secundarios activos. La identificación de bacterias productoras de metabolitos secundarios promisorios al ser altamente activos y de amplio espectro de acción contribuirían al conocimiento del potencial de la biodiversidad microbiana de México y cuyos compuestos activos podrían ser utilizados para el desarrollo de productos para el control de patógenos comunes en salud pública y en agricultura. Por lo anterior sería de gran importancia evaluar la capacidad de cepas de *Bacillus* sp nativas de México para producir compuestos con actividad antibacteriana e insecticida.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta científica:

¿Tendrán los metabolitos extraídos de cepas de *Bacillus* sp. actividad biológica que inhiba a bacterias Grampositivas y Gramnegativas así como a hongos fitopatógenos?

6- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, 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. El trabajo de purificación y caracterización de compuestos es una ardua tarea que no puede realizarse a todas las cepas, 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.* y ver su potencial como bactericidas y antifúngicos.

7- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto bactericida y antifúngico de los diferentes extractos obtenidos de una colección de cepas de *Bacillus* aisladas del suelo.

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 27 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 choleraesuis*, *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: Descriptivo, transversal, experimental y prospectivo

Universo de estudio: Cepas de *Bacillus* aislados de suelos del Estado de Tlaxcala.

Número de muestras: 27 cepas.

Criterios de selección de muestra

- Inclusión: Aquellas cepas que tengan morfología de *Bacillus*.
- Exclusión: Aquellas cepas que no tengan morfología de *Bacillus*.

9- METODOLOGÍA

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

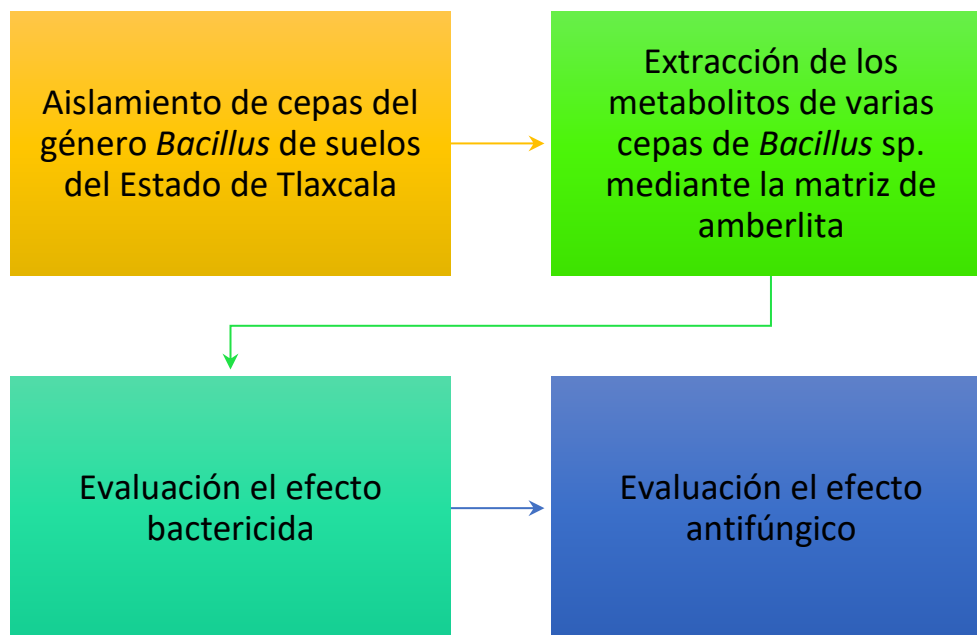


Diagrama 1. Diagrama general de trabajo

Aislamiento de *Bacillus sp silvestre.*

Se pesó 1 g de las diferentes muestras de suelos. Mismas, que se disolvieron en 5 mL de agua destilada estéril con agitación constante, esto, con la finalidad de desprender las bacterias del suelo. Se dejó sedimentar; del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 μ L que se depositó en placas de medio LB, se realizó una

siembra masiva e incubo a 28°C por aproximadamente 20 h (ver diagrama 2). Pasado este tiempo, se seleccionaron colonias de aspecto ceroso típico de *Bacillus* sp. resembrando nuevamente en placas LB. Luego, se realizó una observación de su morfología colonial. Esas colonias se sembraron en medio Tris G (5 mL) e incubaron a 28°C con agitación de 2000 rpm. De este caldo de cultivo, se tomaron alícuotas durante varios días para su observación microscópica mediante un frotis en fresco y así observar la presencia de esporas. Además, fue de vital importancia la observación de presencia o ausencia de cristales ya que eso determino si se trataba de *B. thuringiensis* o *B. cereus* ya que sólo por el contenido de cristales se pueden diferenciar ambas cepas como se mencionó en los antecedentes. (Ver diagrama 3).



Diagrama 2. Aislamiento de *Bacillus* sp silvestre.



Diagrama 3. Selección de Colonias características de *Bacillus*

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

Para realizar la extracción de metabolitos secundarios se utilizó 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 bioproductos⁴⁰. Estas resinas han sido utilizadas con éxito en la identificación y caracterización de antibióticos⁴¹.

En primer lugar se pesaron 0.5 gramos de amberlita XAD16 por cada 100 mL de caldo de cultivo. Hecho lo anterior, se le 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, con agitación constante. Luego, se decantó el agua y se colocó en el vaso 50 mL de metanol, agitando durante media hora. Este último paso, se repitió 2 veces, sin decantar el metanol.

Por otro lado, se prepararon matraces con 150 mL de caldo TSA, sometidos a esterilización en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Una vez que los medios estuvieran atemperados, se inocularon con una asada de las cepas de interés, en seguida, se procedió a decantar el metanol que aun contenía la amberlita, agregando entre 5-7 mL de agua destilada estéril con el objetivo de que toda la amberlita se retirara del vaso de precipitado y se pasara al caldo de cultivo. Cada uno de los matraces, que contenían el caldo de cultivo inoculado y la amberlita fueron etiquetados con el nombre de la cepa, cantidad de caldo de cultivo y fecha. Incubando a 30°C, durante 7 días con agitación a 200 rpm.

Después de los 7 días, se inició la etapa de extracción, para ello de cada matraz se retiró todo el caldo de cultivo quedándose sólo con la amberlita. La cual, se colocó en un vaso de precipitado con 60 mL de metanol, se agitó continuamente durante 20 minutos aproximadamente, hasta que la amberlita adquiriera una coloración blanquecina y el metanol se hubiera coloreado. Este metanol, se centrifugó 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 1 mL del extracto y éste se colocó en recipientes individuales etiquetados que fueron llevados a la estufa de secado durante 24 horas a 28° 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 Eppendorf rotulados.

Evaluación del efecto bactericida de los metabolitos extraídos de las cepas de *Bacillus*

Antes de llevar a cabo este paso, primero se sembraron en placas LB las bacterias Grampositivas y Gramnegativas a probar con los extractos de *Bacillus*. Luego, se prepararon cultivos en suspensión, se inoculó cada bacteria en 3 mL de caldo LB, que posteriormente fueron incubadas 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. Se hizo una observación microscópica para descartar algún tipo de contaminación en el cultivo. Si esta era negativa, se tomaba una alícuota de 100 µl y se sembraba en placas LB rotuladas con el nombre de la bacteria.

Por otro lado, con los extractos sólidos obtenidos de cada cepa de *Bacillus*, se prepararon soluciones, pesando 0.015 g de extracto sólido diluido en 150 µl de agua destilada estéril. De cada una de estas soluciones se mojaron discos de papel, previamente esterilizados. Estos discos se colocaron en las placas previamente inoculadas con las diferentes bacterias y se dejaron en incubación a 29 °C durante un día. Como controles se utilizaron dos discos de papel uno con agua y otro con antibiótico vancomicina para Grampositivas y ampicilina para Gramnegativas. Al día siguiente se observó si había zona de inhibición, midiendo el halo de inhibición alrededor del disco de papel en milímetros de diámetro (Figura 5).

Evaluación del efecto antifúngico de los metabolitos extraídos.

Los hongos probados fueron previamente resembrados y purificados. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas, se tomó parte del micelio aéreo de cada hongo y se depositó en 500 µl de medio LB, agitando constantemente. Luego, con una varilla de vidrio se esparcieron 100 µl de la suspensión de esporas de cada hongo sobre la superficie de una placa de medio PDA. 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 previamente inoculadas con las esporas de los diferentes hongos y se dejaron en incubación a 29°C durante 48 h. Como control negativo se utilizó un disco de papel filtro con metanol, y como control positivo un disco impregnado con una solución miconazol tal como se muestra en la Figura 6. En los días siguientes se observó si hubo crecimiento del hongo y se midió el halo de inhibición. Los hongos utilizados fueron *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp., *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp.

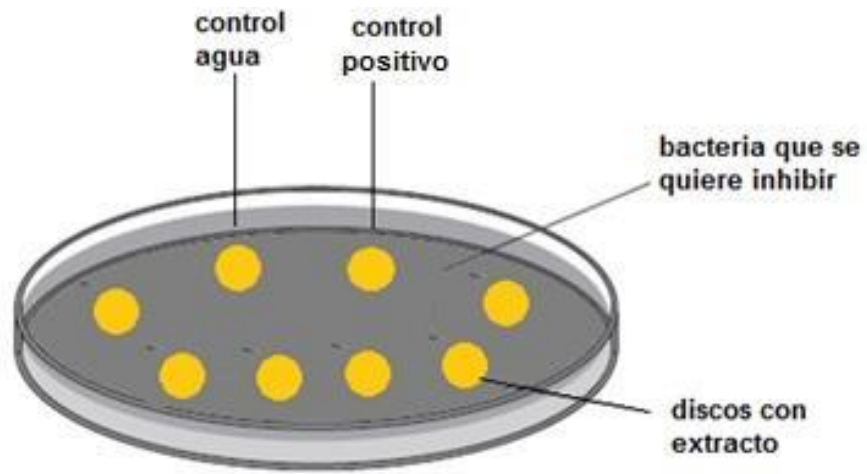


Figura 5. Esquema del experimento del efecto bactericida de los extractos

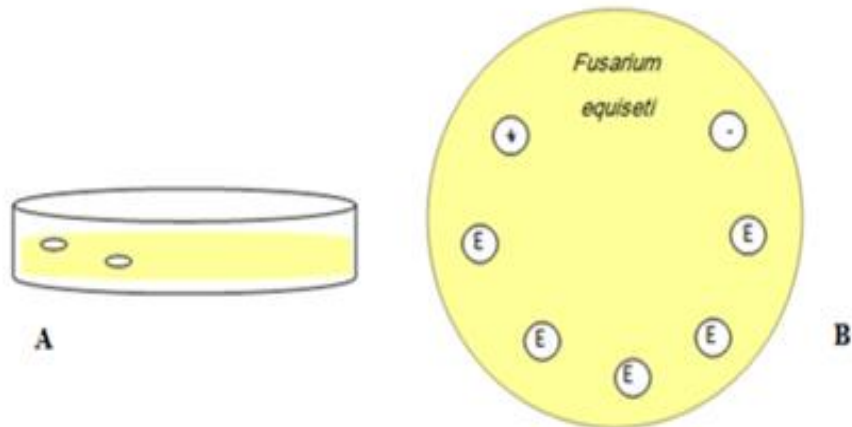


Figura 6. Esquema del experimento del efecto antifúngico de los extractos

10- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

La extracción de los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus sp.* se llevó a cabo mediante la resina Amberlita XAD16 (Sigma- Aldrich).

Se realizó la extracción de metabolitos secundarios de 27 cepas, de las cuales 15 correspondieron a *Bacillus cereus*, 9 a *Bacillus mycoides* y 3 a *B. sp (fam. Subtilis)*, de acuerdo a los criterios de inclusión y a la metodología de selección anteriormente descrita.

Al final del proceso, se obtuvieron extractos secos de color café, que fueron pesados y depositados en tubos Eppendorf. Los resultados del pesado se describen en la Tabla 1.

Nombre de la cepa	Nombre del microorganismo	Lugar de procedencia	Peso (g)
Acx 1	<i>Bacillus sp. (fam subtilis)</i>	Acxotla del Monte, Tlaxcala.	0,0394
Acx 2	<i>B. cereus</i>	Acxotla del Monte, Tlaxcala.	0,1787
Acx 3	<i>B. mycooides</i>	Acxotla del Monte, Tlaxcala.	0,0526
Acx 4	<i>B. cereus</i>	Acxotla del Monte, Tlaxcala.	0,1053
Acx 5	<i>B. cereus</i>	Acxotla del Monte, Tlaxcala.	0,1001
Lla 1	<i>B. mycooides</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,1015
Lla 2	<i>Bacillus sp. (fam subtilis)</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,051
Lla 3	<i>B. mycooides</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,0253
Lla 4	<i>B. cereus</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,1051
Lla 5	<i>Bacillus sp. (fam subtilis)</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,0669
Lla 6	<i>B. cereus</i>	Llanito, Tlaxcala.	0,0341
Tep 1	<i>B. cereus</i>	Tepeyanco, Tlaxcala.	0,0841
Tep 2	<i>B. mycooides</i>	Tepeyanco, Tlaxcala.	0,0303
Tep 3	<i>B. cereus</i>	Tepeyanco, Tlaxcala.	0,9233
Tep 4	<i>B. cereus</i>	Tepeyanco, Tlaxcala.	0,0779
JT1	<i>B. cereus</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,1913
JT2	<i>B. mycooides</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,0617
JT3	<i>B. cereus</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,071
JT4	<i>B. cereus</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,1298
JT5	<i>B. cereus</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,0762
JT6	<i>B. mycooides</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,0525
JT7	<i>B. cereus</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,0658
JT8	<i>B. mycooides</i>	Jardín, Tlaxcala.	0,0841
CT9	<i>B. cereus</i>	Campo, Tlaxcala.	0,067
CT10	<i>B. mycooides</i>	Campo, Tlaxcala.	0,0593
CT11	<i>B. cereus</i>	Campo, Tlaxcala.	0,1151
CT12	<i>B. mycooides</i>	Campo, Tlaxcala.	0,0478

Tabla 1: Cepas utilizadas y cantidad de extracto obtenido en gramos de cada una

El peso promedio fue de 0.1110 g, el peso máximo de 0,9233 g y el mínimo de 0,0253 g. Con el fin de evaluar el efecto bactericida y antifúngico se prepararon soluciones acuosas de los extractos secos obtenidos.

Evaluación de la actividad bactericida de los metabolitos extraídos

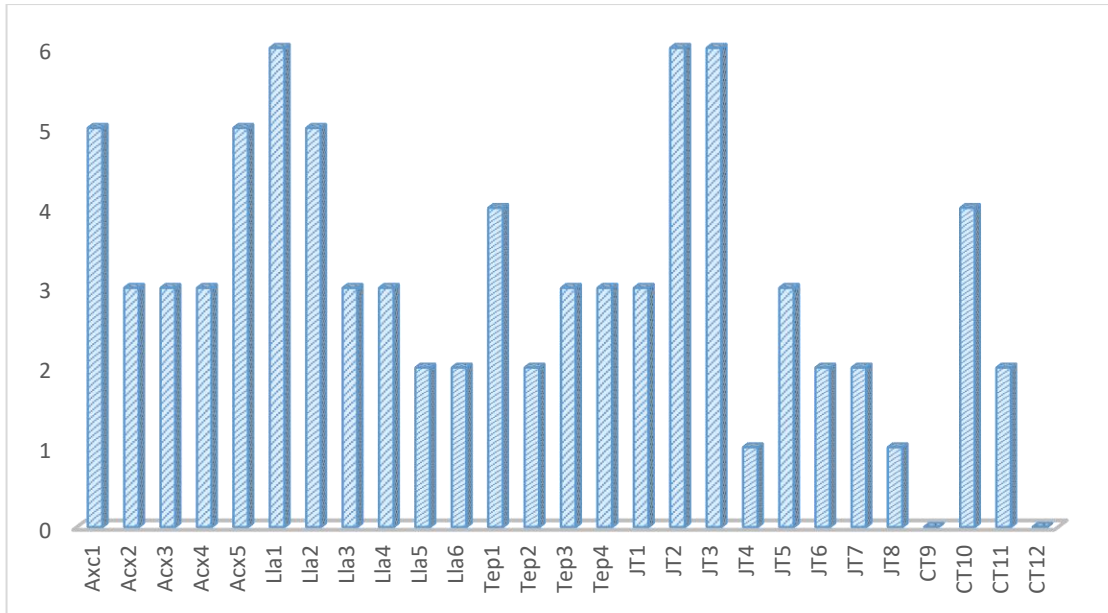
Se evaluó la actividad bactericida de los 27 extractos obtenidos en seis bacterias Grampositivas y ocho Gramnegativas: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Serratia marcescens*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*, respectivamente. Realizando un total de 378

pruebas, cuyos resultados se muestran en las tablas 2 y 3 así como en las figuras 7 y 8.

Es importante señalar que al presentarse algún tipo de contaminación, se repetía el ensayo para no reportar un resultado erróneo.

Diámetro de inhibición en mm						
Cepas	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
Acx1	12	12	10	21	20	0
Acx2	0	12	0	14	23	0
Acx3	0	10	10	20	0	0
Acx4	0	0	8	14	10	0
Acx5	11	10	0	20	12	8
Lla1	10	17	12	11	18	12
Lla2	11	14	8	20	20	0
Lla3	0	0	10	18	12	0
Lla4	0	0	12	14	17	0
Lla5	0	0	10	10	0	0
Lla6	0	0	0	10	10	0
Tep1	0	11	6	18	21	0
Tep2	0	0	0	18	13	0
Tep3	0	0	15	18	11	0
Tep4	0	9	0	15	18	0
JT1	0	0	0	17	12	9
JT2	12	15	8	10	10	10
JT3	14	17	10	23	14	10
JT4	0	0	0	10	0	0
JT5	9	0	0	20	0	10
JT6	0	0	10	0	12	0
JT7	0	0	0	14	11	0
JT8	0	0	0	0	13	0
CT9	0	0	0	0	0	0
CT10	0	0	10	14	15	8
CT11	0	0	0	10	0	5
CT12	0	0	0	0	0	0
VANCOMICINA	22	28	28	35	35	20

Tabla 2. Diámetros de los halos de inhibición generados por los 27 extractos en bacterias Grampositivas



Gráfica 1. Extractos que presentaron actividad inhibitoria en bacterias Grampositivas

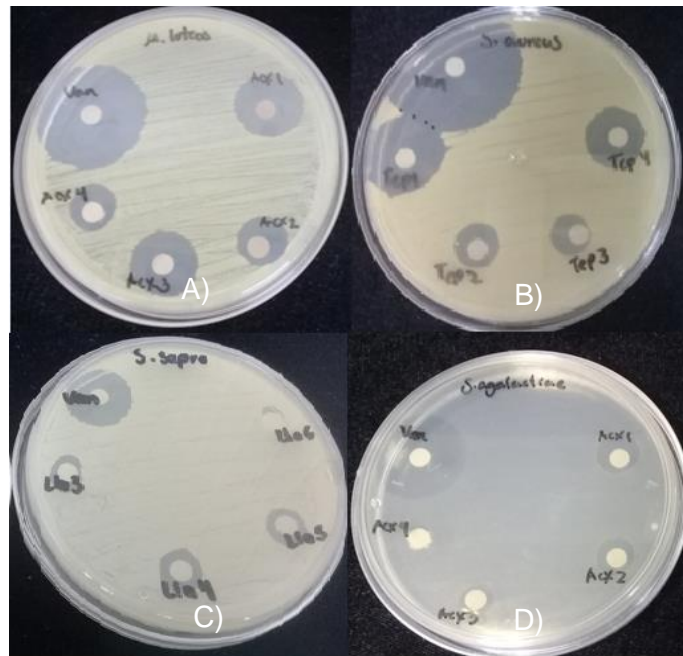


Figura 7. Halos de inhibición de las bacterias Grampositivas. A) *Micrococcus luteus* B) *Staphylococcus aureus* C) *Staphylococcus saprophyticus* D) *Streptococcus agalactiae*

De las pruebas de inhibición en bacterias Grampositivas, se obtuvo que solo tres de los extractos (11%) inhiben a todas las bacterias analizadas, siendo estos Lla1, JT2 y JT3. Los extractos Acx1, Acx5 y Lla2, que también corresponden al 11% inhiben a 5 bacterias.

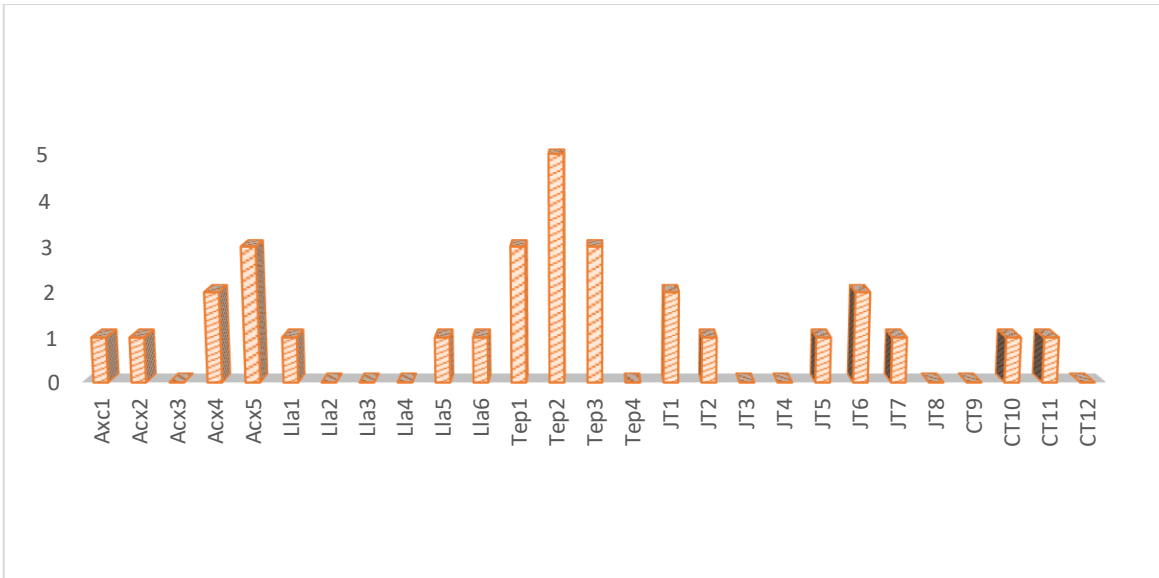
El 70% de los extractos, presentaron actividad inhibitoria en al menos 1 de las bacterias y el 7% no tuvo actividad.

Las bacterias Grampositivas más sensibles fueron *Micrococcus luteus* (A) y *Staphylococcus aureus* (B) (Figura 7). En la Tabla 2, se puede observar que para estas dos bacterias hubo halos de inhibición por casi todos los extractos. Los más representativos fueron JT3 para *Micrococcus luteus* y Acx2 para *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias de mayor resistencia fueron *Listeria monocytogenes* y *Bacillus sp.*

Diámetro de inhibición en mm								
Cepas	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
Acx1	0	8	0	0	0	0	0	0
Acx2	22	0	0	0	0	0	0	0
Acx3	0	0	0	0	0	0	0	0
Acx4	8	0	0	0	10	0	0	0
Acx5	26	20	0	0	0	0	20	0
Ua1	10	0	0	0	0	0	0	0
Ua2	0	0	0	0	0	0	0	0
Ua3	0	0	0	0	0	0	0	0
Ua4	0	0	0	0	0	0	0	0
Ua5	10	0	0	0	0	0	0	0
Ua6	15	0	0	0	0	0	0	0
Tep1	30	0	0	0	10	0	10	0
Tep2	0	0	19	0	16	16	15	20
Tep3	0	0	19	0	15	0	20	0
Tep4	0	0	0	0	0	0	0	0
JT1	13	0	0	0	0	0	0	16
JT2	21	0	0	0	0	0	0	0
JT3	0	0	0	0	0	0	0	0
JT4	0	0	0	0	0	0	0	0
JT5	16	0	0	0	0	0	0	0
JT6	14	0	0	0	0	0	0	10
JT7	0	10	0	0	0	0	0	0
JT8	0	0	0	0	0	0	0	0
CT9	0	0	0	0	0	0	0	0
CT10	13	0	0	0	0	0	0	0
CT11	16	0	0	0	0	0	0	0
CT12	0	0	0	0	0	0	0	0
AMPICILINA	35	20	13	15	20	18	22	15

Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición generados por los 27 extractos en bacterias Gramnegativas



Gráfica 2. Extractos que presentaron actividad inhibitoria en bacterias Gramnegativas

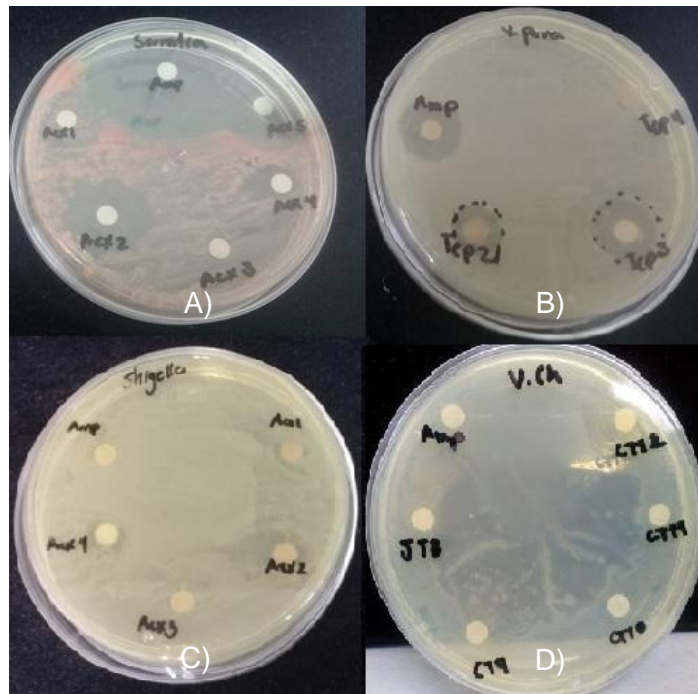


Figura 8. Halos de inhibición de las bacterias Gramnegativas. A) *Serratia marcescens* B) *Vibrio parahaemolyticus* C) *Shigella sp.* D) *Vibrio cholerae*

En bacterias Gramnegativas se obtuvo que solo el extracto Tep2 inhibe a 5 bacterias de las 8 analizadas. El 59% de todos los extractos probados inhiben al menos a 1 de las bacterias y el 37% no presenta actividad.

La bacteria que presentó mayor sensibilidad fue *Serratia marcescens* y mayor resistencia *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Tabla 3, se puede observar que hay halos representativos, como es el caso de Tep1 para *Serratia marcescens* que generó un halo muy cercano al del antibiótico control. En el caso de Tep 2, Tep3, Acx5 y JT1 generaron halos mayor o igual al de referencia para *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Klebsiella pneumoniae*.

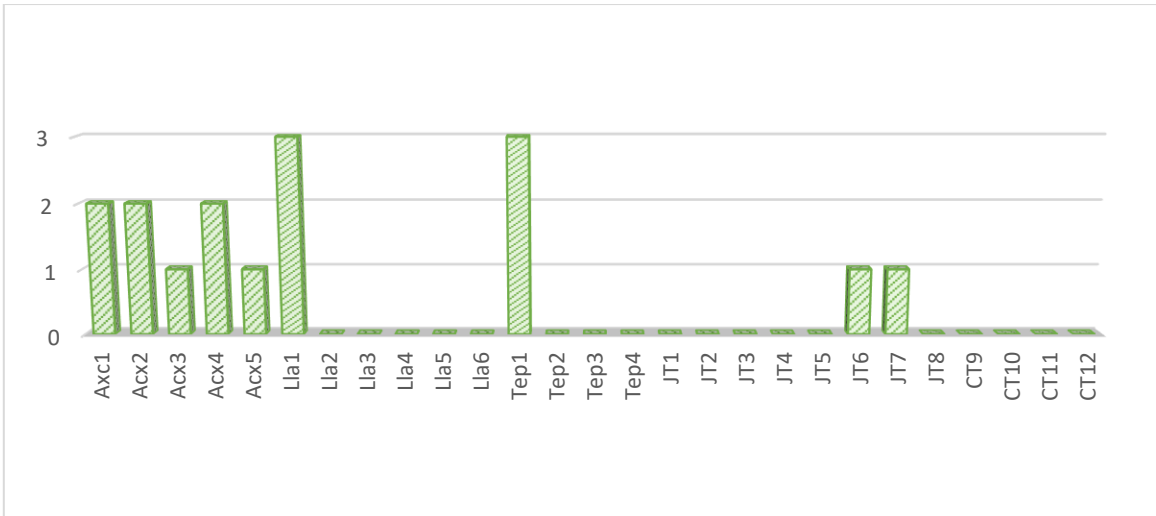
Con respecto a las bacterias Gramnegativas, se observó que presentaron mayor resistencia a los extractos en comparación a las Grampositivas. Esto se debe a que la estructura y composición de las bacterias Gramnegativas es más compleja. En este tipo de bacterias, se observan tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa, esta última exclusiva de las bacterias Gramnegativas tiene como función servir como barrera, evitando o disminuyendo la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían lesionar o destruir a la bacteria.

Como se observa en las imágenes C) y D) de la figura 8, las especies *Shigella* y *Vibrio cholerae* mostraron resistencia a el antibiótico control que fue Ampicilina, el cual es un antibiótico de uso común. Lo anterior es otro aspecto a considerar, la resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos

Cepas	<i>Penicillium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Mucor</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>M. rureri</i>
Acx1	0	0	0	14	12	0
Acx2	0	0	11	0	20	0
Acx3	0	0	0	0	0	12
Acx4	0	0	0	0	10	18
Acx5	0	0	0	0	0	20
Lla1	0	0	0	15	12	10
Lla2	0	0	0	0	0	0
Lla3	0	0	0	0	0	0
Lla4	0	0	0	0	0	0
Lla5	0	0	0	0	0	0
Lla6	0	0	0	0	0	0
Tep1	0	0	14	14	18	0
Tep2	0	0	0	0	0	0
Tep3	0	0	0	0	0	0
Tep4	0	0	0	0	0	0
JT1	0	0	0	0	0	0
JT2	0	0	0	0	0	0
JT3	0	0	0	0	0	0
JT4	0	0	0	0	0	0
JT5	0	0	0	0	0	0
JT6	0	10	0	0	0	0
JT7	0	10	0	0	0	0
JT8	0	0	0	0	0	0
CT9	0	0	0	0	0	0
CT10	0	0	0	0	0	0
CT11	0	0	0	0	0	0
CT12	0	0	0	0	0	0
MICONAZOL	24	30	12	22	12	36

Tabla 4. Diámetros de los halos de inhibición generados por los 27 extractos en hongos fitopatógenos



Gráfica 3. Extractos que presentaron actividad inhibitoria en hongos fitopatógenos

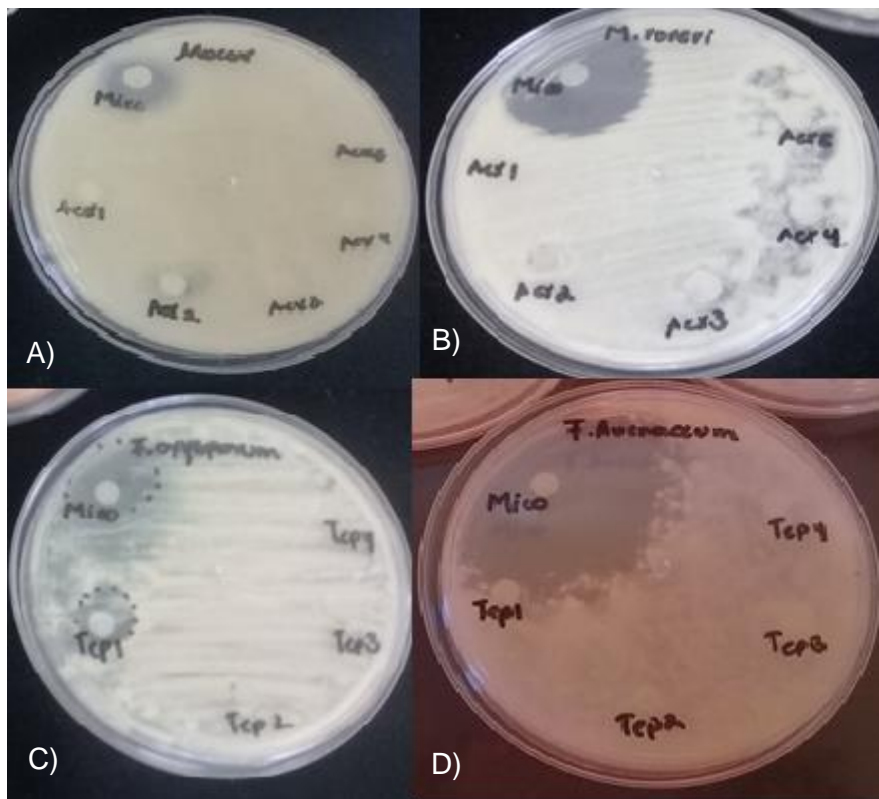


Figura 9. Halos de inhibición de los hongos fitopatógenos. A) *Mucor* sp. B) *Monilophthora roreri* C) *Fusarium oxysporum*. D) *Fusarium avenaceum*

Al evaluar la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos en los hongos fitopatógenos *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp, *Paecilomyces* sp, *Moniliophthora roreri* y *Penicillium* sp, se observó que fueron pocos los extractos que presentaron actividad inhibitoria (Tabla 4), siendo el hongo *F. oxysporum* el más sensible, en el cual, los extractos Acx2 y Tep1 presentaron halos de inhibición mayores al del antibiótico control. En el caso de este último extracto, también, presento un halo mayor en el hongo *Mucor* sp.

Lo anterior, podría 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 por factores propios del cultivo in vitro como son la composición del medio (fuente de carbono, nitrógeno, fósforo 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 la de otras.
- Los extractos que presentaron un efecto antifúngico pueden contener metabolitos secundarios que prevengan la germinación de las esporas de los hongos evitando así su proliferación, e inhibiendo la formación del tubo germinativo evitando así 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 afectan su integridad.

11- CONCLUSIONES

- De los 27 extractos obtenidos y analizados, 25 (92%) presentaron actividad inhibitoria en bacterias Grampositivas, siendo los más representativos Lla1, JT2, JT3 y Acx2.
- En bacterias Gramnegativas la actividad se redujo a un 62%, ya que sólo 17 extractos presentaron actividad bactericida en al menos una de las bacterias, destacando los extractos Tep1, Tep2, Tep3, Acx5 y JT1.
- En cuanto a los hongos, solo 9 (33%) de los extractos tuvieron actividad antifúngica en al menos uno de los hongos utilizados siendo Lla1 y Tep1 los extractos más prometedores.
- De los datos señalados los extractos Lla1 y Tep 1 destacan por ser los que tiene mayor actividad biológica contra diferentes organismos y podrían ser analizados los compuestos que se hayan presentes en dichos extractos.

12- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Sansinenea E. (2012), *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer, Países bajos.
- 2- 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.
- 3- Hejazi A, Falkiner FR. (1997). "*Serratia marcescens*". J Med Microbiol 46 (11): 903–912.
- 4- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. (2011). «Capítulo 13: *Staphylococcus*». En Jawetz. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. José Rafael Blengio Pinto (traductor) (25a edición). Estados Unidos: McGraw-Hill-Lange. pp. 185–194.
- 5- Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed. edición). McGraw Hill.
- 6- Singleton P (1999). Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine (5th ed.). Wiley. pp. 444–454.
- 7- Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, et al. (2005). "Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (37): 13272–13277.
- 8- Faruque SM; Nair GB (eds). (2008). *Vibrio cholerae*: Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press
- 9- Hale TL, Keusch GT (1996). *Shigella*: Structure, Classification, and Antigenic Types. in: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch
- 10- Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (Abril de 2009). «Capítulo 25: Listeria y Erysipelothrix». En Patrick R. Murray. Microbiología Médica (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 225-260.
- 11-Strange, R. y Scott, P. (2005). Plant disease: A threat to global food security. Annual review of phytopathology journal, 43, 83-116.

- 12-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.
- 13-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.
- 14-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.
- 15-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.
- 16-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.
- 17-Siegrid, S., Mammerler, 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.
- 18-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.
- 19-Phillips-Mora, W; Coutiño, A; Ortiz, C; López, A; Hernández, J; Aime, MC (2006). First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. Plant Pathology 55 (4): 584.
- 20- Velusamy P, Gnanamanickam SS (2008) The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. In: Karlowsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 93–106.
- 21-Karlovsky P (2008) Secondary metabolites in soil ecology. In: Karlowsky P (ed) Soil biology, vol 14. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1–19

- 22-Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56:845–857
- 23-Demain AL, Fang A (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69:1–39
- 24-Sansinenea E, Ortiz A (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33:1523–1538.
- 25-Vining LC. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44: 395-427.
- 26-Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.
- 27- Demain AL. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 455-463.
- 28-Strohl WR. (2004). Antimicrobials. En: Bull AT, editor. *Microbial diversity and bioprospecting*. Washington D. C. (U. S. A.): ASM Press. p. 336-356.
- 29-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.
- 30-Hadacek F, Greger H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis Journal*, 11: 137-147.
- 31-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.
- 32-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.
- 33-Demain AL. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 486-495.
- 34-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.
- 35-Enright MC. (2003). The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:474–479.

- 36-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.
- 37-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.
- 38-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.
- 39-Sierra-García I, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S. 2012. Detremination of the antimicrobila and insecticidal activities in extracts produced by bacteria isolated from soil. Actual Biol 34, 96:5-19
- 40-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.
- 41-Sasse F, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H. 1994. Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (Myxobacteria) production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. The Journal of Antibiotics, 48: 21-25.