

Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales

Angel Trigos,^{1,2} Guillermo Mendoza,² Mauricio Luna,²
Gabriela Heredia³ y Rosa Ma. Arias³

¹ Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana. Av. Dos Vistas s/n, Carretera Xalapa-Las Trancas, Xalapa 91000, Veracruz, México. ² Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa. Calle Médicos 5, Unidad del Bosque, Xalapa 91010, Veracruz, México. ³ Instituto de Ecología, Km 2.5, Carretera Antigua a Coatepec N° 351, Congregación el Haya. Xalapa 91070, Veracruz, México

Evaluation of antibacterial activity of soil and leaf litter fungi

Abstract. In this paper the antibacterial activity of the culture of 14 strains of soil and leaf litter fungi was evaluated by the broth microdilution method. Two of them, *Menisporopsis theobromae* and *Idriella* sp. showed bacterial activity. *M. theobromae* showed bioactivity against *Staphylococcus aureus*, whereas *Idriella* sp. showed bioactivity against *Staphylococcus aureus* and two other bacteria of medical interest: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*; as well as three phytopathogen bacteria (*Erwinia carotovora*, *E. carotovora* pv. *atroseptica* and *Agrobacterium tumefaciens*).

Key words: Soil and leaf litter fungi, antibacterial activity.

Resumen. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de los cultivos de 14 hongos microscópicos del suelo y restos vegetales, por medio del método de microdilución en caldo. Dos de ellos, *Menisporopsis theobromae* e *Idriella* sp. mostraron actividad antibacteriana; así, mientras que el primero tuvo acción solamente contra *Staphylococcus aureus* el segundo la presentó contra tres cepas de interés médico (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y tres fitopatógenas (*Erwinia carotovora*, *E. carotovora* pv. *atroseptica* y *Agrobacterium tumefaciens*).

Palabras clave: Hongos microscópicos del suelo y restos vegetales, actividad antibacteriana.

Received 22 September 2004; accepted 10 January 2005

Recibido 22 de septiembre 2004; aceptado 10 enero 2005

El descubrimiento de Fleming en 1929, de la penicilina, un metabolito que inhibe el crecimiento de las bacterias, producido por *Penicillium notatum*, inicia la investigación de otros antibióticos tales como las cefalosporinas, la tirocidina, la gramicidina, la actinomicina, eritromicina, tetraciclinas y aminoglucósidos, etc. [3]. Debido a la complejidad estructural que presentan algunos antibióticos su síntesis orgánica en muchos casos es muy costosa, por lo que aún en nuestros días se requiere de fuentes naturales para su producción y desarrollo [10]. Sin duda, este tipo de principios activos ocupan un lugar importante, dentro de los recursos terapéuticos con los que cuentan los médicos [1,4,5]; además,

Autor para correspondencia: : Angel Trigos
atrigos@uv.mx

estas sustancias se utilizan ampliamente para tratar enfermedades bacterianas en plantas y animales [8,9]. No obstante, la continua capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia antibacteriana, ha motivado la investigación de nuevos y más potentes antibióticos [3] y es aquí, donde países como México, que cuentan con una gran variedad de hongos microscópicos, ofrecen un gran potencial en la búsqueda de nuevos metabolitos fúngicos con acción antibacteriana [11,12]; sin embargo, la exploración de nuevos antibióticos a partir de estos organismos en nuestro país prácticamente no existe [14]. Por ello, desde hace algunos años nuestro grupo de trabajo ha venido desarrollando una línea de investigación relacionada con la química de hongos microscópicos, aislando una serie de metabolitos, entre los

que destacan algunas dicetopiperazinas bioactivas [13,15,16]. Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad antibiótica de 14 hongos del suelo y restos vegetales aislados en los estados de Veracruz y Puebla.

Para ello, se resumen en la Tabla 1 los hongos utilizados indicando su origen geográfico y sustrato del cual fueron aislados. En los bioensayos se usaron tres cepas bacterianas de importancia médica: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y tres cepas fitopatógenas: *Erwinia carotovora* (BF 001), *E. carotovora pv. atroseptica* (BF 008) y *Agrobacterium tumefaciens* (BF 012). Tanto las cepas fúngicas como las bacterianas se encuentran depositadas en las colecciones correspondientes del LATEX.

La preparación de los extractos fúngicos acuosos se realizó en matraces erlenmeyer de 250 ml, con 150 ml de caldo de producción (80 g sacarosa, 50 g harina de maíz, 1 g extracto de lavadura, 1000 ml agua), los cuales fueron inoculados con los diferentes hongos e incubados en agitación continua a 150 rpm durante 21 días, a 27 °C. Concluido lo anterior, se provocó la lisis celular en cada uno de los cultivos

con ultrasonido y se tomaron 20 ml de cada uno de los caldos de cultivo mezclándose homogéneamente con 20 ml de metanol; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, para realizar la evaluaciones antibacterianas, se tomaron 20 ml del sobrenadante de las distintas mezclas y se llevó a la mitad del volumen por destilación a presión reducida a -43 °C.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por el método de microdilución en caldo de la siguiente manera. En una microplaca de 96 pozos (12 columnas por 8 filas), se añadió a cada uno de ellos 100 µl de caldo Müller Hinton (Becton Dickinson Co.) estéril. Posteriormente, al primer pozo de cada columna se añadió 100 µl de cada uno de los extractos acuosos obtenidos y se diluyó 1:1 preparando a partir de esta una serie de 6 diluciones adicionales. Después se inoculó con 30 µl de una suspensión bacteriana de 37 500 UFC/ml a partir de la concentración 0.5 de Mc Farland (150 E 6 UF/ml). Como controles de crecimiento se usaron suspensiones bacterianas en caldo Müller Hinton y para los de esterilidad únicamente el caldo referido [7]. Finalmente, se incubaron durante 20 horas a 27 °C para las bacterias fitopatógenas y a 35 °C para aquellas de interés médico.

Tabla 1. Hongos microscópicos del suelo y restos vegetales utilizados en el presente trabajo.

Especie	Sustrato	Origen geográfico	Clave
<i>Aspergillus carneus</i> Blochwitz	suelo	Puebla	LAT 045
<i>A. niger</i> (var. <i>niger</i>) van Tiegh	suelo	Puebla	LAT 04
<i>Beltraniopsis ramosa</i> Castañeda	hoja muerta	Veracruz	LAT 047
<i>Beltrania rhombica</i> Penzing	hoja muerta	Veracruz	LAT 048
<i>Idriella</i> sp.	hojarasca	Veracruz	LAT 049
<i>Menisporopsis theobromae</i> Hughes	hoja muerta	Veracruz	LAT 050
<i>Memnoniella subsimplex</i> (Cooke) Deighton	hoja de plátano	Veracruz	LAT 051
<i>Paecilomyces persicinus</i> Nicot	suelo	Puebla	LAT 052
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	suelo	Puebla	LAT 053
<i>P. islandicum</i> Sopp	suelo	Puebla	LAT 054
<i>P. pinophilum</i> Hedgcock	suelo	Puebla	LAT 055
<i>Scolecobasidium constrictum</i> Abbott	hojarasca	Veracruz	LAT 056
<i>Sporodocladia bactrospora</i> (Kend.) M. Wingfierld	hoja muerta	Veracruz	LAT 057
<i>Stachybotrys parvispora</i> Hughes	hoja muerta	Veracruz	LAT 058

Tabla 2. Evaluación antibacteriana del extracto acuoso de *Idriella* sp. cultivado en caldo de producción durante 21 días con agitación (150 rpm) a 27 °C.

Nombre de la bacteria	CMI	CMB
<i>Escherichia coli</i>	2.3	4.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.7	4.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.3	NSD
<i>Erwinia carotovora</i>	2.3	4.6
<i>Erwinia carotovora pv. atroseptica</i>	2.3	4.6
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3.5	NSD

Nota.- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. CMB: Concentración Mínima Bactericida. NSD: No se detectó. Las concentraciones están dadas en mg/ml.

La Concentración Mínima Bactericida o Letal (CMB) se determinó partiendo de los resultados de la CMI inoculándose por estría, en cajas petri con Agar Müller Hinton con las soluciones de aquellos pozos donde no hubo crecimiento, incubándose durante 24 horas a 27° C las fitopatógenas y 35° C las de interés médico [7].

Los extractos de *Menisporopsis theobromae* e *Idriella* sp. mostraron actividad antibacteriana, lo cual contrasta con recientes estudios donde señalan el aislamiento de una polilactona macrocíclica con actividad antimalarica a partir del primero [2] y de especies de *Idriella* que han utilizados como agentes de control biológico en cereales [6]. Cabe señalar que éstos hongos pertenecen a las familias Stilbellaceae y Dematiaceae, respectivamente, que en el caso de ésta última, se encuentran los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, los cuales son productores de antibióticos comerciales. Mientras que *Menisporopsis theobromae* sólo mostró actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Idriella* sp. presentó inhibición sobre todas las cepas bacterianas utilizadas, como se observa en la Tabla 2, donde *Staphylococcus aureus* fue la más sensible, en tanto que la de *Pseudomonas aeruginosa* fue la menos afectada; cabe señalar que en cuatro de las seis cepas se observó acción bactericida (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora* y *E. carotovora pv. atroseptica*).

Las CMB y las CMI alcanzadas en este trabajo

resultan interesantes, ya que al tratarse de extractos crudos y no de compuestos puros se pueden considerar altas, por lo que este trabajo abre la posibilidad de realizar en un futuro, estudios químicos, toxicológicos y clínicos sobre los posibles metabolitos secundarios bioactivos que estos hongos pueden producir, en especial la cepa de *Idriella* sp.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT (35507-N) y SNI por los apoyos otorgados para el desarrollo de este trabajo, así como al Q.F.B. Víctor G Rivas de los Laboratorios Rivas de Xalapa, por la donación de las cepas bacterianas de interés médico.

Literatura citada

- Bycroft, B.W., 1988. Dictionary of Antibiotics and Related Substances. Chapman and Hall, Londres.
- Chinworrungsee M., P. Kittakoop, M. Isaka, P. Maithip, S. Supothina, Y. Thebtaranonth, 2004. Isolation and structure elucidation of a novel antimalarial macrocyclic poly lactone, menisporopsin A, from the fungus *Menisporopsis theobromae*. Journal of Natural Products 67: 689-692.
- Dax, S.L., 1997. Antibacterial Chemotherapeutic Agents. Blackie A & P, Londres.
- Foye, W.O., 1989. Principles of medicinal chemistry. Lea & Febiger, Filadelfia.
- Katzung, B.G., 1991. Farmacología básica y clínica. Manual Moderno, México D.F.

6. Lascaris, D., J. W. Deacon, 1994. *In vitro* growth and microcycle conidiation of *Idriella bolleyi*, a biocontrol agent of cereal pathogens. *Mycological Research* 98: 1200-1206.
7. Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Proposed Standard. NCCLS Document M31-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova.
8. Rosenstein, E., 1993. Diccionario de especialidades agronómicas. PLM, México D.F.
9. Rosenstein, E., 1994. Diccionario de especialidades veterinarias. PLM, Santa Fé de Bogotá.
10. Söllhuber, M., 2001. Uso de los productos naturales: obtención de fármacos por semisíntesis. I: Síntesis de antibióticos β -lactámicos y otros. *In: Avendaño, C. (ed.) Introducción a la química farmacéutica*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. pp. 723-769.
11. Trigos, A., 1999. Química de los Hongos. *In: Rivera, A. (ed.) Producción de vitamina D2 a partir de hongos macromicetos: aspectos científicos, técnicos y económicos*. CYTED-COLCIENCIAS, Santa Fé de Bogotá. pp. 19-61.
12. Trigos, A., 2000. Los hongos ¿amigos o enemigos? *La Ciencia y el Hombre* 12(3): 27-30.
13. Trigos, A., F. Sandoval, 2002. Diketopiperazines from cultures of the fungus *Papulaspora immersa*. *Micología Aplicada International*, 14: 7-9.
14. Trigos, Á., N. Sambrano, 1992 ¿Nos habremos olvidado de los Hongos? *Educación Química*. 3: 290-297.
15. Trigos, A., S. Reyna, B. Matamoros, 1995. Macrophominol, a new diketopiperazine from cultures of *Macrophomina phaseolina*. *Phytochemistry* 40: 1697.
16. Trigos, A., S. Reyna, M.L. Gutiérrez y M. Sánchez, 1997. Diketopiperazines from cultures of the fungus *Colletotrichum gloeosporoides*. *Natural Product Letters* 11:13-16.