

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DEL HONGO MICROSCÓPICO *Idriella sp.*

TESIS
para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología
PRESENTA
CÉSAR ESPINOZA RAMÍREZ

Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

Dr. ÁNGEL RAFAEL TRIGOS LANDA

Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

DIRECTOR

DIRECTOR

ASESOR

Abril/2008

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el PNPB del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto de CONACYT No. 35507-N titulado “Búsqueda de metabolitos con actividad antibiótica a partir de hongos microscópicos”.

Iztapalapa, D.F. a 29 de Abril de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS A PARTIR DEL HONGO
MICROSCÓPICO *Idriella* sp.**

Que presentó
CÉSAR ESPINOZA RAMÍREZ

Comité Tutorial:

Director: **Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ**

Director: **Dr. ÁNGEL RAFAEL TRIGOS LANDA**

Asesor: **Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

Jurado:

Presidente: **Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

Secretario: **Dra. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO**

Vocal: **Dra. MIRNA SUAREZ QUIROZ**

Vocal: **Dr. MAURICIO LUNA RODRIGUEZ**

Agradecimientos

Quiero agradecerles a mis directores de tesis Dr. Ángel R. Trigos Landa y el Dr. Gustavo Viniegra González por compartir sus conocimientos, por todo el apoyo, confianza y orientación, además, por permitir la realización de este trabajo en cada uno de sus respectivos laboratorios.

De la misma manera agradezco el valioso apoyo y las constantes sugerencias que me brindó mi asesor de tesis Dr. Octavio Loera Corral.

A la comisión revisora, Dra. Araceli Tomasini Campocosio, Dra. Mirna L. Suárez Quiroz, Dr. Mauricio Luna Rodríguez, por las sugerencias que tuvieron a bien realizar para la mejora de este trabajo.

De manera especial agradezco:

A Dios por permitirme lograr cada uno de mis objetivos.

A mis padres, Francisco y Socorro por la educación, apoyo y confianza que siempre me han brindado.

A todos y cada uno de mis compañeros de trabajo, amigos y personas cercanas a mí, con todo mi cariño.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se divide en 9 capítulos y uno más de anexos. Se inicia con una introducción, donde se destaca la importancia de los hongos en nuestra vida cotidiana, considerando el antagonismo que presentan los hongos saprófitos, y se plantea la utilización de estos organismos y/o de los compuestos que puedan producir con actividad antibacteriana, especialmente en el ataque de enfermedades provocadas por especies bacterianas fitopatógenas.

El segundo capítulo comprende la revisión bibliográfica de algunos aspectos de la biotecnología de hongos, enfocándose principalmente a la producción de antibióticos y al metabolismo de hongos. También, se presentan datos que evidencian la utilización de antibióticos utilizados dentro del área médica para el control de enfermedades de plantas ocasionadas por bacterias, además, se muestran algunos detalles de las especies bacterianas fitopatógenas que se estudiaron.

El capítulo tres, describe antecedentes de investigaciones relacionadas con la producción de compuestos con actividad antibiótica, a partir de algunos géneros de hongos, que se han utilizado como agentes de biocontrol. De igual manera, se muestran algunos productos que se basan en bacterias, que han sido utilizados como agentes de control biológico para combatir enfermedades bacterianas en plantas. Asimismo, se muestran reportes de actividad biocontrol y antibiótica de *Idriella bolleyi* e *Idriella* sp., respectivamente.

El cuarto capítulo, marca la importancia de la realización de este proyecto, enfocado en la búsqueda de compuestos químicos con actividad antibiótica producidos por un hongo saprófito. En los capítulo cinco y seis, se plantea la hipótesis, el objetivo general

y los objetivos específicos; en el séptimo, el material y metodología empleada en este estudio.

El capítulo ocho presenta los resultados tras la selección un medio de cultivo y un tipo de fermentación, empleando la técnica de microdilución en caldo, siguiendo el criterio de mayor actividad bacteriostática expresada en porcentaje de inhibición, en contra de especies bacterianas de interés clínico y fitopatógico.

Después de realizar diferentes etapas de extracción, purificación, obtención y caracterización estructural, se obtuvieron ocho compuestos, de los cuales sólo dos presentaron actividad antibiótica en contra de *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pectobacterium carotovorum*, durante la evaluación del caldo de cultivo de *Idriella* sp. utilizando medio de producción 0.5 X y realizado en fermentación líquida. Además, se observó un efecto inhibitorio en contra de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pectobacterium carotovorum* subp. atrosepticum, durante la evaluación del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp., realizado en el medio de producción 0.5 X y utilizando ambos sistemas de fermentaciones.

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra que el hongo *Idriella* sp., al igual que otros hongos saprófitos, es capaz de producir compuestos bioactivos, que pueden utilizarse como antimetabolitos debido a sus propiedades antibacterianas en contra de especies de interés médico y agrícola, cuyos perfiles de producción varían según sea el sistema de cultivo.

Para ello, fue necesario realizar una evaluación y selección del medio de cultivo, así como del tipo de sistema de fermentación para el cultivo de *Idriella* sp., en función de la presencia de mayor actividad antibacteriana en los extractos crudos; debido a esto, se compararon seis medios de cultivo, los cuáles fueron: Extracto de Malta (EM), Power White (PW), Medio de Producción 0.5 X (MP 0.5 X), Medio Sintético (MS), Medio Mínimo (MM) y Power Milk Yeast (PMY), tanto en fermentación líquida como sólida; posteriormente, se realizaron pruebas de susceptibilidad de los extractos acuosos y metanólicos, en contra de tres cepas bacterianas de interés médico (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) y contra siete de importancia agrícola (*Pectobacterium carotovorum* subsp. atrosepticum BF-001, *Pectobacterium carotovorum* BF-002, *Pectobacterium crhysanthemi* BF-003, *Erwinia amylovora* BF-004, *Agrobacterium tumefaciens* BF-005, *Xhantomonas axonopodis* BF-006 y *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BF-009).

De esta manera, el medio de producción 0.5 X realizado sobre fermentación líquida, fue el que presentó mayor actividad bacteriostática en contra de *Escherichia coli* y 4 bacterias fitopatógenas (resaltando a *Agrobacterium tumefaciens*). Posteriormente se realizó el cultivo masivo de *Idriella* sp. (HS-005) utilizando el medio de producción 0.5 X sobre fermentación líquida.

Una vez concluido el periodo de incubación, se realizaron extracciones con diferentes disolventes, teniendo prioridad la purificación de aquellas extracciones con disolventes polares, tanto del caldo de cultivo como de la biomasa producida por *Idriella* sp.

De la purificación del extracto butanólico se obtuvieron dos compuestos puros que presentaron actividad antibacteriana en contra de *Xhantomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium crhysanthemi*, *Erwinia amylovora* y *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Del primer compuesto (**1**) se obtuvieron 8.0 mg y del segundo (**2**), 620 mg, los cuales se identificaron por espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC) y espectrometría de masas; resultando ser el 5-hidroximetilfurfural (**1**) y el 1-n-butil- β -D-fructopiránosido (**2**). Además, se obtuvieron otros 5 compuestos en los cuales no se presentó actividad antibacterial en contra de las especies en estudio; denominados manitol, ácido oleico, ácido linoleico, ácido esteárico y ácido palmítico.

Por último, se determinó la cinética de producción del 5-hidroximetilfurfural (**1**) y el 1-n-butil- β -D-fructopiránosido (**2**), observando que existen diferencias en los perfiles de producción de cada compuesto, lo cual abre la posibilidad de manipular la fisiología del cultivo con el propósito de obtener mejores rendimientos de algunos de los dos compuestos bioactivos.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo observar que *Idriella* sp. es una fuente potencial de compuestos con efectos bacteriostáticos nunca antes reportados en este género, lo cual abre la posibilidad de utilizar este microorganismo en estrategias de biocontrol.

ABSTRACT

This paper shows that the fungus *Idriella* sp., as well as other saprophytic fungi, is able to produce bioactive substances, that can be used like antimetabolites, due their antibacterial properties against several species of medical and agricultural importance, whose production profiles, vary according the cultivation systems used.

For that reason, it was necessary to evaluate and select the cultivation media, as well as the kind of cultivation system for *Idriella* sp., according to the presence of higher antibacterial activity in the raw extracts. Six cultivation media were compared: Malt Extract (EM), Power White (PW), Production Medium 0.5 X (MP 0.5 X), Synthetic Medium (MS), Minimum Medium (MM) and Power Milk Yeast (PMY), in liquid and solid fermentation. After that, were made susceptibility tests on water and metanolic extracts against three bacterial strains of medical importance (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and against seven strains of agricultural importance (*Pectobacterium carotovorum* subsp. atrosepticum BF-001, *Pectobacterium carotovorum* BF-002, *Pectobacterium crhysanthemi* BF-003, *Erwinia amylovora* BF-004, *Agrobacterium tumefaciens* BF-005, *Xanthomonas axonopodis* BF-006 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BF-009).

The treatment with higher bacteriostatic activity against *Escherichia coli* and four different phytopathogenic bacteria (specially *Agrobacterium tumefaciens*) was the MP 0.5 X on liquid fermentation. Later it was made the massive cultivation of *Idriella* sp. (HS-005) using MP 0.5 X on liquid fermentation. When the incubation period concluded, the biomass produced by *Idriella* sp., as well as the culture filtrates, were extracted with different solvents, being prioritary the polar solvents.

From the butanolic extract were obtained two pure compounds, that presented antibacterial activity against *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium crhysanthemi*, *Erwinia amylovora* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. From the first compound (1) were obtained 8.0 mg and from the second one (2) were obtained 620 mg. These two substances were identified by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC) and mass spectrometry, as 5-hydroxymetilfurfural (1) and 1-n-Butyl- β -D-fructopyranoside (2). In addition to that, there were obtained five other compounds which didn't present antibacterial activity against the species studied (mannitol, oleic acid, linoleic acid, stearic acid and palmitic acid).

Finally, it was determined the kinetics of production of the 5-hydroxymetilfurfural (1) and the 1-n-Butyl- β -D-fructopyranoside (2), observing that there are differences in the production profiles of each compound, which means that is possible manipulate the cultivation physiology to obtain better yieldings of any of those substances.

According to the results obtained in this work, it was possible to observe that *Idriella* sp. is a potential source of compounds with bacteriostatic effects, whose weren't reported previously for the gener, and which make possible the use of this microorganism at biocontrol strategies.

CONTENIDO

CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ESPECTROS	ix
ÍNDICE DE UNIDADES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biotecnología de hongos	3
2.2 Metabolismo fúngico	6
2.2.1 Metabolismo primario	6
2.2.2 Metabolismo del carbono	7
2.2.3 Metabolismo del nitrógeno	7
2.2.4 Metabolismo secundario	8
2.3 Metabolitos producidos por plantas, animales y hongos	10
2.4 Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas	12
2.5 Bacterias fitopatógenas	13
2.5.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.5.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	16
2.5.3 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	16
2.5.4 <i>Erwinia amylovora</i>	16
2.5.5 <i>Pectobacterium carotovorum</i>	17
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES	18
3.1 Producción de antibióticos por hongos con actividad biocontrol	18
3.2 Biobactericidas	18
3.3 <i>Idriella bolleyi</i> e <i>Idriella</i> sp.	19
CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN	21
CAPÍTULO 5. HIPÓTESIS	22

CAPÍTULO 6. OBJETIVOS	23
6.1 Objetivo general	23
6.2 Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1 Material biológico	25
7.1.1 Cepa del hongo saprófito	25
7.1.2 Cepas bacterianas	25
7.2 Condiciones para las pruebas de susceptibilidad	27
7.2.1 Escala de Macfarland	27
7.2.2 Cinética de bacterias	28
7.3 Pruebas de susceptibilidad	29
7.3.1 Actividad bacteriostática	29
7.3.1.1 Interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	31
7.3.1.2 Porcentaje de inhibición	31
7.3.2 Actividad bactericida	32
7.3.2.1 Interpretación de la concentración mínima bactericida (CMB)	32
7.4 Condiciones de cultivo	33
7.4.1 Preparación del inóculo fúngico	33
7.4.2 Medios de cultivo	33
7.4.3 Fermentación líquida	33
7.4.4 Fermentación en estado sólido	33
7.4.5 Preparación de la PUF	34
7.4.6 Cultivo masivo	34
7.5 Tratamiento de las muestras	34
7.5.1 Técnicas analíticas	35
7.5.1.1 Determinación de pH	35
7.5.1.2 Determinación de biomasa en FL	35
7.5.1.3 Determinación de biomasa en FES-PUF	35
7.5.1.4 Determinación de azúcares totales	35
7.6 Extracción	36

7.6.1 Extracción con cloroformo	37
7.6.2 Extracción con acetato de etilo	37
7.6.3 Extracción con n-butanol	38
7.6.4 Extracción con metanol	38
7.7 Purificación de compuestos	38
7.7.1 Purificación del extracto butanólico del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp.	39
7.7.1.1 Obtención de compuestos del extracto butanólico del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp.	39
7.7.2 Purificación del extracto metanólico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	40
7.7.2.1 Obtención de compuestos del extracto metanólico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	41
7.7.3 Purificación del extracto clorofórmico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	42
7.7.3.1 Obtención de compuestos del extracto clorofórmico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	42
7.8 Caracterización estructural de compuestos	43
7.9 Identificación de los compuestos 1 y 2 por HPLC	43
CAPÍTULO 8. RESULTADOS	45
8.1 Establecimiento de las condiciones para la prueba de susceptibilidad	45
8.1.1 Escala de Macfarland	45
8.1.2 Cinéticas de crecimiento de las especies bacterianas en estudio	46
8.1.2.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano de tres cepas de interés clínico	47
8.1.2.2 Cinéticas de crecimiento bacteriano de cuatro cepas fitopatógenas	48
8.2 Efecto del medio de cultivo y tipo de fermentación sobre el crecimiento y la actividad antibacteriana de <i>Idriella</i> sp.	49
8.2.1 Introducción	49
8.2.2 Efecto del medio de cultivo y tipo de fermentación sobre el crecimiento de <i>Idriella</i> sp.	50
8.2.3 Efecto del medio de cultivo y tipo de fermentación sobre la actividad antibiótica de <i>Idriella</i> sp.	52
8.2.4 Efecto del tamaño de la espuma de poliuretano sobre la actividad antibiótica de <i>Idriella</i> sp.	55
8.3 Cultivo masivo	58

8.4 Purificación de compuestos producidos por <i>Idriella</i> sp.	59
8.4.1 Purificación del extracto butanólico del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp.	59
8.4.1.1 Compuesto 1	59
8.4.1.2 Compuesto 2	60
8.4.2 Purificación del extracto metanólico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	60
8.4.2.1 Ácido oleico	60
8.4.2.2 Manitol	61
8.4.3 Purificación del extracto clorofórmico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp.	61
8.5 Comprobación y evaluación antibiótica de los productos obtenidos	62
8.5.1 Actividad bacteriostática y bactericida del 5-hidroximetilfurfural y el 1-n-Butyl- β -D-fructopiranosido	63
8.5.2 Actividad biológica de los ácidos grasos aislados	64
8.6 Cinética de pH, biomasa, azúcares totales y producción de los compuestos 1 y 2	66
8.7 Identificación espectroscópica de los compuestos obtenidos	68
8.7.1 5-hidroximetilfurfural	68
8.7.2 Compuesto 1-n-Butil- β -D-fructopiranosido	76
8.7.3 Ácido oleico	88
8.7.4 Manitol	90
8.7.5 Ácido palmítico, linoleico, oleico y esteárico	92
CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES	93
CAPÍTULO 10. CONTRIBUCIONES	96
CAPÍTULO 11. BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXOS	109
A-1. Actividad antifúngica del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp.	109
A-2. Medios de cultivo	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras químicas de: ácido salicílico, α pineno y β pineno, respectivamente	11
Figura 2.	Plan de trabajo para la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por <i>Idriella</i> sp.	24
Figura 3.	Esquema de una microplaca utilizada en las pruebas de susceptibilidad	31
Figura 4.	Estrategia para la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por <i>Idriella</i> sp.	37
Figura 5.	Representación gráfica de la escala de Macfarland, ajustando dicha reacción a una regresión lineal	46
Figura 6.	Cinéticas de crecimiento de tres cepas bacterianas de interés clínico a) <i>E. coli</i> , b) <i>S. aureus</i> y c) <i>P. aeruginosa</i> , incubadas a 37 °C, con una agitación constante de 150 rpm. Los valores experimentales se representan por símbolos y la línea continua indica el ajuste por la ecuación logística	47
Figura 7.	Cinéticas de crecimiento bacteriano de cuatro cepas fitopatógenas a) <i>P. carotovorum</i> , b) <i>P. carotovorum</i> pv. <i>atroseptica</i> , c) <i>A. tumefaciens</i> y d) <i>X. campestris</i> , incubadas a 27 °C, con una agitación constante de 150 rpm. Los valores experimentales se representan por símbolos y la línea continua indica el ajuste por ecuación logística	48
Figura 8.	Efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento de <i>Idriella</i> sp. utilizando ambos sistemas de fermentación	51
Figuras 9.	Evaluación del porcentaje de inhibición del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp. utilizando MP 0.5X, realizado en ambas fermentaciones en contra de especies bacterianas de interés clínico y fitopatógeno	53
Figuras 10 y 11.	Se muestran los dos compuestos bioactivos obtenidos de la purificación cromatográfica del extracto butanólico del caldo de cultivo de <i>Idriella</i> sp.	59
Figuras 12 y 13.	Cromatografía en capa delgada de fracciones puras del ácido oleico y estructura química del mismo.	60

Figura 14.	Estructura química del manitol.	61
Figura 15.	Se muestran los cuatro ácidos grasos producidos por <i>Idriella</i> sp. a) ácido linoleico, b) ácido esteárico, c) ácido palmítico y d) ácido oleico	62
Figura 16.	Se muestra la evolución del pH, formación de biomasa, consumo de sustrato y la línea continua es el ajuste con el modelo de la ecuación logística en el medio de producción 0.5 X sobre fermentación líquida	66
Figura 17.	Cinéticas de producción de los compuestos 1 y 2 y la línea continua es el ajuste con la ecuación logística del crecimiento de <i>Idriella</i> sp. en el medio de producción 0.5 X sobre fermentación líquida	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Antibióticos utilizados en los Estados Unidos de América, en 1999 por cultivo	13
Tabla 2.	Bacterias fitopatógenas económicamente importantes	15
Tabla 3.	Bacterias de interés clínico	25
Tabla 4.	Bacterias fitopatógenas donadas por LATEX	26
Tabla 5.	Bacterias fitopatógenas donadas por el Colegio de Posgraduados ...	26
Tabla 6.	Condiciones de HPLC para la cuantificación de los compuestos 1 y 2	44
Tabla 7.	Relación de equivalencia entre la escala de Macfarland y las unidades formadoras de colonias	45
Tabla 8.	Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de <i>Idriella</i> sp. utilizando FL y FES-PUF	52
Tabla 9.	Evaluación del porcentaje de inhibición de <i>Idriella</i> sp. utilizando medio de producción 0.5X, realizado en Fermentación Líquida en contra de especies bacterianas patógenas de interés médico y fitopatógeno	54
Tabla 10.	Evaluación de la actividad bacteriostática del extracto metanólico de la biomasa producida por <i>Idriella</i> sp., realizado en el medio de producción 0.5 X y utilizando ambos sistemas de fermentaciones en contra de especies bacterianas patógenas de interés clínico y fitopatógeno	57
Tabla 11.	Actividad antibiótica del 5-Hidroximetilfurfural (1) y el 1-n-Butyl-β-D-fructopiranosido (2)	63
Tabla 12.	Datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C del 5-hidroximetilfurfural (1) (CDCL ₃ δ ppm)	72
Tabla 13.	Datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C del 1-n-Butyl-β-D-fructopiranosido (2) (CDOD ₃ δ ppm)	83

Tabla 14.	Desplazamientos químicos (δ) en ppm del espectro RMN ^{13}C del ácido oleico	88
Tabla 15.	Desplazamientos químicos (δ) en ppm del espectro RMN ^{13}C del manitol	90
Tabla 16.	Ácidos grasos producidos por <i>Idriella</i> sp.	92
Tabla 17.	Actividad Fungistática de caldos de cultivo de 5 hongos potenciales en contra de diversos hongos fitopatógenos, utilizando dos fungicidas comerciales como control	111
Tabla 18.	Actividad Fungicida (+) de caldos de cultivo en contra de hongos fitopatógenos, utilizando dos fungicidas comerciales como control ..	112

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1.	Espectro del IR del compuesto 1	69
Espectro 2.	Espectro de Masas del compuesto 1	69
Espectro 3.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 del compuesto 1	70
Espectro 4.	Ampliación del Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 del compuesto 1	70
Espectro 5.	Experimento COSY en CDCl_3 del compuesto 1	71
Espectro 6.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 del compuesto 1	73
Espectro 7.	Experimento DEPT en CDCl_3 del compuesto 1	74
Espectro 8 y 9.	Experimento HSQC en y HMBC en CDCl_3 del compuesto 1	75
Espectro 10.	Espectro de IR del compuesto 2	76
Espectro 11.	Espectro de RMN de ^1H en CD_3OD del compuesto 2	78
Espectro 12.	Experimento COSY en CD_3OD del compuesto 2	79
Espectro 13.	Ampliación del experimento COSY en CD_3OD del compuesto 2	80
Espectro 14.	Espectro de RMN de ^{13}C en CD_3OD del compuesto 2	81
Espectro 15.	Experimento DEPT en CD_3OD del compuesto 2	82
Espectro 16.	Experimento HSQC en CD_3OD del compuesto 2	84
Espectro 17.	Ampliación del experimento HSQC en CD_3OD del compuesto 2	85
Espectro 18.	Ampliación del experimento HSQC en CD_3OD del compuesto 2	85
Espectro 19.	Experimento HMBC en CD_3OD del compuesto 2	86
Espectro 20.	Ampliación del experimento HMBC en CD_3OD del compuesto 2	87

Espectro 21.	Ampliación del experimento HMBC en CD ₃ OD del compuesto 2	87
Espectro 22.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del ácido oleico	89
Espectro 23.	Espectro de RMN ¹³ C en CDCl ₃ del ácido oleico	89
Espectro 24.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del manitol	91
Espectro 25.	Espectro de RMN ¹³ C en CDCl ₃ del manitol	91
Espectro 26.	Espectro de CG del ácido palmítico, linoleico, oleico y esteárico	92

INDICE DE UNIDADES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

L	Litros
ml	Mililitros
mg/ml	Miligramos por mililitro
g/L	Gramos por litro
G	Gramos
Mg	Miligramos
µg	Microgramos
Ppm	Partes por millón
Nm	Nanómetros
H	Horas
%	Por ciento
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
CN	Control negativo
CP	Control positivo
M	Muestra
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
EM	Extracto de Malta
PW	Power White
MP 0.5 X	Medio de Producción 0.5 X
MS	Medio Sintético
MM	Medio Mínimo
PMY	Power Milk Yeast
FL	Fermentación Líquida
FES-PUF	Fermentación en Estado Sólido-Espuma de Poliuretano
NSD	No se detectó
UV	Ultravioleta
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Disportionless Enhancement Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
MS	Espectrómetro de Masas
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
CD ₃ OD	Metanol deuterado
δ	Delta
J	Constante de acoplamiento
S	Señal simple
D	Señal doble
T	Señal triple
Dd	Doble de dobles
Dt	Doble triplete
C	Compleja

1. INTRODUCCIÓN

Los elementos biológicos relacionados con las plantas superiores y animales, han sido extensamente estudiados; de igual manera, los microorganismos han tenido un importante papel en la solución de problemas ambientales. Los microorganismos participan en circulación y fijación de nitrógeno, así como en la desintegración de materia orgánica. Muchos lugares habitables no hubieran existido sin las actividades de los microorganismos, entre los que se encuentran los hongos, organismos que han influido en nuestras vidas, directa e indirectamente; de éstos, algunos viven en el subsuelo, bajo condiciones separadas de nuestras vidas por lo que muchas veces no entendemos su utilidad (Watanabe, 2002).

La diversidad de los hongos es muy amplia y éstos han explorado por medio de sus hifas el mundo de la materia orgánica, con mayor eficacia que cualquier otro tipo de organismos. Al parecer, la explicación de dicho comportamiento se encuentra en la capacidad de cada tipo de hifa para aprovechar todos los sustratos disponibles; cada especie de hongo tiene su propia versatilidad enzimática y cada una sintetiza los componentes necesarios para el aprovechamiento de los mismos. Así, una especie de hongo crecerá en raíces muertas, otra en troncos en descomposición; alguna más en una rama o pedazo de corteza, en el limbo de una hoja caída o en su pecíolo, en una semilla o en una inflorescencia que yace sobre la tierra, por citar algunos ejemplos (León, 2005).

Varios de estos hongos se involucran, de una u otra manera, en el antagonismo, simbiosis y relaciones cooperativas. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma que estos últimos contribuyen a que, en la mayoría de los casos, no se desarrollen enfermedades. En condiciones naturales, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la

superficie de las plantas (Orietta y Larrea, 2001). Sin embargo, no siempre se presenta dicha simbiosis o mutualismo con los cultivos, por lo que son frecuentes las pérdidas cuantiosas, tanto en cultivos en campo como en productos de poscosecha (Pérez y Gepp, 2005).

Uno de los principales patógenos son las bacterias, de las cuales se sabe que existe un gran número y que éstas provocan enfermedades en el hombre, en los animales y en las plantas. Dentro de la naturaleza existen alrededor de 1600 especies bacterianas, de las cuales menos de 200 son consideradas fitopatógenas; éstas se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo y han sido precursoras de enfermedades agrícolas, ocupando el primer lugar en la incidencia de ataques a diversos cultivos, provocando el deterioro de éstos, y como consecuencia, pérdidas en los rendimientos y en la comercialización (IICA, 2000).

El antagonismo que presentan algunos hongos, últimamente han sido tema de interés para varios investigadores, lo que ha incrementado su conocimiento y ahora se puede comprender más la relación de los patógenos con las plantas y la utilidad de los hongos desde un punto de vista ecológico. Cabe señalar que no todos los hongos son patógenos de plantas, no obstante, recientemente las prácticas de biocontrol han ayudado a controlar algunas enfermedades de plantas; por lo que varios hongos saprófitos han sido estudiados con la finalidad de encontrar agentes de biocontrol efectivos, además, de probar sustancias fisiológicamente activas (Watanabe, 2002).

Lo anterior justifica el estudio de ciertos hongos que conviven en un hábitat similar al de muchas especies bacterianas fitopatógenas, de los cuales es posible obtener compuestos nuevos o conocidos que presenten actividad antibacteriana y, por tanto, sean de gran utilidad para prácticas agrícolas convencionales dada su aportación en el combate de enfermedades ocasionadas por bacterias.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOTECNOLOGÍA DE HONGOS

La biotecnología de hongos se define como la aplicación de estos organismos, o sus componentes subcelulares, dentro de procesos tecnológicos que puedan ser empleados en servicios de manufacturación industrial y desarrollo ambiental entre otras aplicaciones. El manejo exitoso de los procesos biotecnológicos asociados con los hongos es llevado a cabo a través de la combinación e integración de un número de disciplinas científicas y tecnológicas, incluyendo la genética, la biología molecular, la bioquímica y la ingeniería química y de procesos. Así, los procesos biotecnológicos, en donde se utilizan hongos, normalmente involucran la producción de células o biomasa micelial con el propósito de catalizar transformaciones químicas deseadas, las cuales pueden ser divididas en la producción exitosa de productos finales como la conversión de esteroides, obtención de antibióticos y productos bioquímicos del metabolismo intermediario tales como aminoácidos, alcoholes, purinas y pirimidinas, lípidos, polisacáridos, al igual que otros componentes estructurales de la pared celular (Dilip *et al.*, 1992).

Durante la década de los cuarenta, las investigaciones sobre el metabolismo secundario se centraron particularmente en la producción de sustancias tóxicas en contra de microorganismos, como los antibióticos. La producción de moléculas con propiedades antibióticas es característica de muchos microorganismos que habitan en el suelo, teniendo en cuenta que en este hábitat predominan los hongos microscópicos y los actinomicetos, por lo que no es de extrañar que una buena parte de los antibióticos de uso clínico tenga su origen en el metabolismo secundario de dichos grupos de microorganismos (Parés y Juárez, 1997).

La actividad antibiótica de los metabolitos secundarios se fundamenta en su capacidad de inhibir procesos metabólicos primarios esenciales. En muchos casos, la bioactividad del antibiótico está asociada con una acción como antimetabolito, esto es, en función de su semejanza funcional con un metabolito, se unen al blanco (enzima, orgánulo celular, entre otros) e interfieren con un proceso vital; la actividad de las moléculas que presenten este comportamiento depende de su estructura y de los grupos funcionales que contengan. En cualquier caso, no puede generalizarse la idea de que todos los metabolitos secundarios que sean moléculas modificadas, derivadas de intermediarios primarios, han de tener actividad antibiótica (Vining, 1990).

La penicilina es el antibiótico más significativo, reconocido e iniciador de muchos agentes quimioterapéuticos, desarrollados durante los últimos 60 años. Una larga cantidad de relevantes investigaciones industriales se han llevado a cabo con el hongo productor de penicilina *Penicillium chrysogenum*, lo que ha hecho posible la elucidación coherente acerca de la biosíntesis de este antibiótico. Además, muchos de los principios activos derivan de estudios de *P. chrysogenum* y otros hongos productores de antibióticos e igualmente organismos sintetizadores de otros metabolitos secundarios (Ball, 1987). Estos estudios permitieron el mejoramiento de la productividad industrial, superando más de 1000 veces a las cepas silvestres de *Penicillium* (Queener y Swartz, 1979).

Hasta la fecha se conocen alrededor de 8,000 sustancias antibióticas y cada año se descubren varios cientos de antibióticos; seguramente aún quedan muchos por descubrir, ya que la mayoría de los microorganismos que se han examinado para determinar su capacidad de producir antibióticos pertenecen a unos pocos de géneros tales como *Streptomyces*, *Penicillium* y *Bacillus*. Muchos investigadores del campo de los antibióticos creen que seguirán descubriendo nuevos antibióticos, si se examinan otros grupos de microorganismos (Madigan *et al.*, 1999).

Por otro lado, una gran parte de los antibióticos utilizados hoy en día son derivados de agentes que clínicamente ya han sido utilizados; de ahí la necesidad de buscar nuevas sustancias, con nuevos mecanismos de acción, que no sean susceptibles a los mecanismos de resistencia existentes (Rosamond y Allsop, 2000).

Debido a que los antibióticos son productos del metabolismo secundario, su rendimiento es relativamente bajo en la mayoría de las fermentaciones industriales contrastando con su elevada actividad terapéutica, lo que trae como consecuencia su alto valor económico. Estos principios activos pueden producirse comercialmente por dos tipos de fermentación: líquida y sólida (Madigan *et al.*, 1999).

La Fermentación líquida (FL) puede ser definida como un cultivo de células microbianas dispersas de forma homogénea en un recipiente en agitación, que puede o no ser aireado por medios mecánicos. La forma de FL más utilizada en los laboratorios de investigación es el matraz agitado, cuyo desarrollo ha sido importante, debido a que ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas, con una densidad moderada de la biomasa lo que ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos (Henzler y Schedel, 1991).

La fermentación en estado sólido (FES) es un antiguo sistema de cultivo microbiano que ha sido transformado para nuevos objetivos; está puede ser definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido, en el cual el medio líquido se extiende sobre una capa muy fina en contacto con una interfase aérea. El modelo de crecimiento micelial es ventajoso para los hongos filamentosos, comparado con los microorganismos unicelulares en la colonización de la matriz sólida y en la utilización de nutrientes del medio de cultivo. El modelo básico de crecimiento de los hongos es una combinación del crecimiento apical con la generación de nuevas hifas por ramificación, en donde el crecimiento apical se lleva a

cabo de manera lineal, mientras que la ramificación se efectúa exponencialmente, dando como resultado un incremento en la velocidad de crecimiento y una gran capacidad para cubrir eficientemente la superficie del cultivo (Raimbault, 1998).

Los avances de la tecnología de FES han permitido un control sobre procesos de obtención de productos de alto valor como, por ejemplo, antibióticos y otros metabolitos secundarios. Uno de los aspectos más importantes de la FES es que los metabolitos, en muchos casos, son producidos en rendimientos mucho más altos que por fermentación líquida (FL) (Barrios-González *et al.*, 1988 Balakrishnan y Pandey, 1996; Robinson *et al.*, 2001).

2.2 METABOLISMO FÚNGICO

2.2.1 Metabolismo primario

Los hongos en su medio ambiente tienden a colonizar la superficie de líquidos y sólidos donde exponen sus hifas rápidamente para consumir los nutrientes presentes, debido a que éstos, han desarrollado mecanismos de translocación eficientes para tomar todos los sustratos disponibles, de manera que, tomando en cuenta que el oxígeno está disponible en forma gaseosa, los nutrientes pueden ser utilizados directa o indirectamente por la excreción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Boswell *et al.*, 2003).

El metabolismo primario de los hongos es esencialmente la utilización de nutrientes para la producción de moléculas pequeñas, involucradas en la generación de energía y construcción de estructuras celulares, reproducción y funciones fisiológicas. En las células de los hongos se producen algunos bloques biosintéticos, los cuales están conformados por compuestos como acetyl CoA, malonyl CoA, piruvato y α -

cetoglutarato. También se producen algunos cofactores tales como ATP/ADP, NADH/NAD y NADPH/NADP. Colectivamente, estos compuestos intermediarios son el sustrato para la vasta diversidad de metabolitos secundarios (Moss, 1984).

2.2.2 Metabolismo del carbono

Muchos de los hongos pueden utilizar una diversidad de carbohidratos, ácidos grasos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono para el crecimiento y requerimiento de energía. En principio, los hongos tomarán aquellos carbohidratos, monómeros solubles, ácidos grasos simples y ácidos orgánicos, sin la necesidad de sintetizar y excretar enzimas hidrolíticas. Por su parte, los disacáridos, polisacáridos y lípidos son hidrolizados por enzimas de la superficie celular, las cuales están controladas por la represión e inducción de la glucosa. Algunos azúcares son utilizados lentamente dada la velocidad de activación, como es el caso de la galactosa, o por la limitación de enzimas extracelulares, como en el metabolismo de la lactosa; sin embargo, la utilización de sustratos insolubles, como el almidón y la celulosa, está acompañada por una acción secuencial de diversas enzimas extracelulares. En términos de catabolismo, los hongos también presentan ciclos de glucólisis, ciclo de Krebs y mecanismos de fosforilación oxidativa, igual que ocurre en otros organismos vivos (Elander y Lowe, 1992).

2.2.3 Metabolismo del nitrógeno

La mayoría de los hongos son saprófitos, éstos pueden utilizar un amplio intervalo de compuestos nitrogenados. Como en el caso de la utilización del carbono, donde se degradan inicialmente las unidades pequeñas, ya que no necesitan la producción de enzimas extras. El amonio puede ser utilizado por todos los hongos y la mayoría de éstos pueden emplear nitrato. En los hábitats naturales, la proteólisis es un proceso importante que produce aminoácidos utilizables como fuente de energía o como subunidades para la biosíntesis. Es posible que muchos hongos crezcan un solo

aminoácido como fuente de nitrógeno, siendo la asparagina y glutamina los mejores ejemplos. Los aminoácidos pueden ser utilizados directamente o por una desaminación inicial para liberar amonio. La mayoría de los aminoácidos son sintetizados por la fijación de amonio con glutamato/glutamina y por su adicional transaminación (Parés y Juárez, 1997).

La naturaleza, y el nivel de varias fuentes de nitrógeno en el medio ambiente parece ser un importante control en el desarrollo de los hongos. Por ejemplo, la limitación de nitrógeno estimula la conidiación en algunos hongos, mientras que en otros, conduce a la autólisis. El metabolismo primario, particularmente de aminoácidos, es importante en la generación de precursores para el metabolismo secundario y es esta ruta metabólica la que ha sido exitosamente alterada por mutaciones que pueden dirigir a una sobreproducción de ciertos precursores primarios para una eventual polimerización de metabolitos secundarios (Elander y Lowe, 1992).

2.2.4 Metabolismo secundario

La actividad metabólica microbiana no siempre trae como consecuencia la proliferación celular. Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano, a lo largo de toda la curva de crecimiento, se observa la diferencia que existe entre los procesos metabólicos asociados al crecimiento celular y aquellos que tienen lugar en la fase estacionaria; como resultado del metabolismo secundario se producen diferentes tipos de compuestos que reciben, la denominación de metabolitos secundarios.

Los hongos microscópicos constituyen la segunda fuente más importante, después de las plantas superiores, en el aislamiento de metabolitos secundarios (Trigos y Zambrano, 1992). Así, estos organismos pueden producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales son caracterizados por sus complejas estructuras químicas, ya que muchos inician la polarización de simples precursores como el

acetato, azúcares, aminoácidos, nucleótidos o combinación de éstos (Turner y Aldridge, 1971, 1983; Cole *et al.*, 2003).

La razón de su producción es incierta, pero todos ellos son resultado de un metabolismo descontrolado o desbalanceado, que generalmente ocurre después de que la fase de crecimiento se ha detenido. Es quizás la adaptabilidad del hongo, por la rápida utilización de varios substratos, lo que dirige a una repentina limitación de algún nutriente en particular, siendo el carbono o el nitrógeno los que puedan crear un ambiente desbalanceado, propicio para la producción de metabolitos secundarios (Elander y Lowe, 1992).

Otra limitante para la inducción del metabolismo secundario es la disponibilidad del oxígeno y, a pesar de que existen muchos estudios sobre la eficiencia en la aireación de la producción de antibióticos, pocos son los autores que han mostrado estudios sobre el efecto en la limitación del mismo y su relación con la producción de antibióticos. Algunos ejemplos de lo mencionado son los reportes de Rollins y colaboradores (1988 y 1990) y de Virgilio y colaboradores (1964) donde muestran el efecto de muchos periodos cortos de limitación de oxígeno sobre el crecimiento y la capacidad para sintetizar antibióticos; de igual manera, Vandamme y colaboradores (1981) y Chen y Wilde (1991), describieron la influencia de reducir el oxígeno en medios de cultivo no definidos, donde observaron que la limitación de oxígeno puede actuar como un promotor del metabolismo secundario y, de igual manera, se relaciona con la inducción en la biosíntesis de antibióticos.

Otros reportes relacionados con la producción de antibióticos son los estudios de Martin y Bushell (1996), donde muestran que la producción de antibióticos en cultivos líquidos de actinomicetos está correlacionada con el diámetro de los fragmentos de

micelio, obteniendo evidencias de que los fragmentos de micelio con un diámetro menor a 80-90 μ no son productores de antibióticos (Bushell *et al.*, 1997).

Complementariamente, Pickup y colaboradores (1993), observaron que los fragmentos pequeños de micelio, aparentemente crecen a la misma velocidad que los fragmentos grandes, pero son incapaces de producir antibióticos de manera significativa. Este fenómeno confirma que, en los cultivos líquidos el proceso de biosíntesis de la producción de antibióticos es menor que cuando se produce sobre agar. También existen diferencias en la productividad de éstos a nivel de cultivo a pequeña escala (Bushell *et al.*, 1997). De esta manera, existen efectos de la morfología y su relación sobre la productividad en un fermentador (Martin y Bushell, 1996).

2.3 METABOLITOS PRODUCIDOS POR PLANTAS, ANIMALES Y HONGOS.

En estudios realizados con el hongo saprófito de color negro conocido como *Pseudoplectania nigrella*, que crece en el suelo de los bosques de pinos del norte de Europa, se reportó que produce un antibiótico que pertenece al grupo de las *defensinas* y que comúnmente se conoce como plectasina, lo que representó el primer aislamiento de una defensina aislada a partir de un hongo, la cual está constituida de [péptidos](#) antimicrobianos ricos en [cisteína](#), producidos por animales (vertebrados e invertebrados) y plantas complejas, que son muy activos contra bacterias, hongos y virus.

La plectasina es especialmente activa contra el *Streptococcus pneumoniae*, incluso contra aquellas cepas que son resistentes a los antibióticos convencionales. La plectasina aislada de *Pseudoplectania nigrella* tiene una estructura química muy semejante a la de otras defensinas halladas en arañas y escorpiones. Estos hallazgos

identifican a los hongos saprofitos como una nueva fuente de las sustancias antimicrobianas. Sugieren también, que las defensinas de los insectos, moluscos y hongos proceden de un mismo gen ancestral (Mygind *et al.*, 2005).

Otros ejemplos de metabolitos no tan complejos, inicialmente aislados de plantas y que también son producidos por hongos y animales son el α y β pineno, producido por *Cronartium fusiforme* y el limoneno producido de igual manera por *Cronartium fusiforme* y *Gyromitra esculenta* (Figura 1) (Turner y Aldridge, 1983; Rosengaus *et al.*, 2000). Dichos compuestos son monoterpenos y forman parte de aceites esenciales con propiedades insecticidas (Chirino *et al.*, 2001).

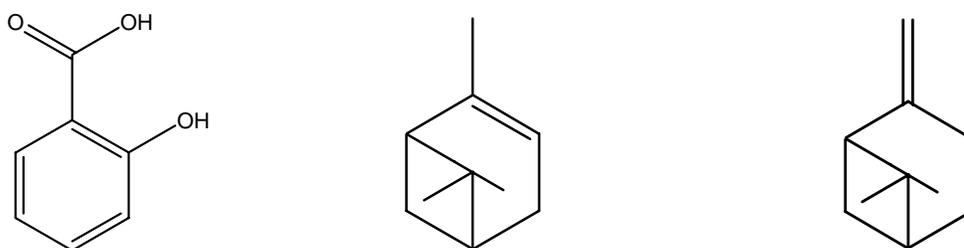


Figura 1. Estructuras químicas de: ácido salicílico, α pineno y β pineno, respectivamente.

Por último, la corteza del sauce ha sido desde tiempo inmemorial el tratamiento contra la fiebre y el dolor. Es decir, un antipirético y analgésico cuyo principio activo fue conocido como salicina, que sirve para sintetizar el ácido salicílico y su proceso de acetilación da lugar al conocido ácido acetilsalicílico. De igual manera existen reportes de la obtención del ácido salicílico (Figura 1), a partir del hongo macroscópico *Elaphomyces granulatus* (Turner y Aldridge, 1983).

2.4 USO DE ANTIBIÓTICOS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Los antibióticos han sido utilizados desde los años cincuenta para controlar ciertas enfermedades bacterianas en frutas de alto valor comercial, vegetales y plantas ornamentales. Hoy en día, los antibióticos más utilizados en plantas son la oxitetraciclina y la estreptomina. En los Estados Unidos de América, solo un 0.5 % de los antibióticos que conocemos se aplican en plantas y existen pocas evidencias de la resistencia de patógenos de plantas a la oxitetraciclina; no obstante, existen alternativas de emergencia para combatir las enfermedades ocasionadas por aquellos patógenos resistentes a la estreptomina como, por ejemplo, cepas de *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas spp.* y *Xanthomonas campestris* (McManus *et al.*, 2002).

Históricamente, el uso de antibióticos más significativo en plantas, a nivel mundial, ha sido para controlar el tizón de fuego del manzano, del durazno y del peral, debido a su alta eficiencia y baja fitotoxicidad, siendo la estreptomina el antibiótico de elección, en muchas ocasiones. En Estados Unidos las cepas de *Erwinia amylovora*, resistentes a estreptomina, han sido estabilizadas por los agricultores, combinando oxitetraciclina con estreptomina. La oxitetraciclina es menos eficiente que la estreptomina cuando el patógeno es sensible a ambos antibióticos (McManus y Jones, 1994; Norelli y Gilpatrick, 1982), pero más eficiente cuando el patógeno es resistente a la estreptomina (McManus y Jones, 1994); ver tabla 1. Así, la estreptomina erradica a cepas de *E. amylovora*, mientras que la oxitetraciclina sólo inhibe su crecimiento, por lo tanto, cuando los residuos de oxitetraciclina disminuyen sobre la superficie de la planta, la población de bacterias se hace presente nuevamente; sin embargo, el tizón de fuego puede ser controlado con aplicaciones sucesivas durante la floración.

Tabla 1. Antibióticos utilizados en los Estados Unidos de América, en 1999 por cultivo*.

Cultivo	Patógeno	Antibiótico	No. de Estados inspeccionados	Cantidad utilizada de activo en Kg.
Manzana	<i>Erwinia</i>	Oxitetraciclina	2	1,315
	<i>amylovora</i>	Estreptomicina	10	6,985
Durazno	<i>Xanthomonas arboricola</i>	Oxitetraciclina	3	3,130
Pera	<i>Erwinia</i>	Oxitetraciclina	2	5,398
	<i>amylovora</i>	Estreptomicina	4	2,722

* Datos obtenidos de (USDA National Agricultural Statistics Service, 2000).

2.5 BACTERIAS FITOPATÓGENAS

El origen y desarrollo evolutivo de las plantas superiores ha ocurrido en ambientes que han sido colonizados por bacterias, influyendo en la coevolución de asociaciones planta-bacteria, las cuales pueden ser consideradas en dos principales categorías: bacterias epifíticas (presentes fuera de la planta) y bacterias internas (infectando el tejido de la planta); las primeras están asociadas con la superficie de la planta, la cual generalmente se divide en dos partes: la raíz y la parte aérea (Sigeo, 2005). Así, muchas bacterias se han adaptado a los diversos micro ambientes del suelo y a la interfase aérea, y son importantes en aspectos como la captación de nutrientes, daño por bajas temperaturas y control biológico de patógenos. Muchas bacterias epifíticas son saprófitas, y obtienen nutrientes complejos de la planta; otras son parásitas, pasando parte de su ciclo de vida sobre la superficie de la planta y, la otra parte, sin tejido de planta.

Un patógeno vegetal (fitopatógeno) puede ser definido como un agente biológico que causa deterioro en la salud de la planta. Así, las bacterias fitopatógenas están presentes principalmente en sólo cinco grupos taxonómicos que comprenden los géneros *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y las bacterias corineformes (*Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Rhodococcus*), Bacterias Gram (+) en particular, las cuales constituyen una parte substancial en la microflora del suelo (Alexander, 1994; Schaadd *et al.*, 2001).

Las enfermedades bacterianas son de gran importancia económica, debido a las pérdidas financieras que supone la disminución de producción agrícola, ocasionada, muchas veces, por una mala implementación de medidas de control; asimismo, los daños poscosecha por patógenos bacterianos en productos vegetales son considerables. Algunos de los más importantes patógenos de plantas se muestran en la tabla 2, en donde se puede observar que las bacterias fitopatógenas, económicamente importantes, comprenden un amplio rango taxonómico de organismos y producen una gran variedad de enfermedades. La descripción más detallada de algunos de estos patógenos se mencionan a continuación (Sigeo, 2005).

Tabla 2. Bacterias fitopatógenas económicamente importantes.

Bacteria	Hospedero	Enfermedad	Localización geográfica
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rosáceas, crisantemo grapevine	Tumores	Zonas templadas y regiones mediterráneas
<i>Erwinia amylovora</i>	Manzanos, perales y algunos ornamentales	Tizón de fuego	Zonas templadas en todo el mundo
<i>Erwinia carotovora</i>	Papa	Pudrición de raíz	Zonas templadas
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Alrededor de 200 especies, ej. plátano, papa, tabaco, tomate	Mancha bacteriana	Trópicos y subtrópicos de todo el mundo
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	Frutas cítricas	Cáncer de cítricos	Asia, Sudamérica, Norteamérica (Florida) Nueva Zelanda
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	Arroz	Tizón de hoja	Asia, Sudamérica, Norteamérica, Australia, China

2.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Éste es un patógeno muy común y económicamente importante, perteneciente a las dicotiledóneas, con un amplio rango de hospederos, incluyendo muchos miembros de la familia Pomaceae (Frutos de hueso y especies de Rubís). Se manifiesta tanto de forma local (formación de tumores) como general; con frecuencia provoca pérdidas totales de vigor y rendimiento (Bradbury, 1986). La distribución de la enfermedad es frecuentemente complicada por el hecho de que las plantas infectadas pueden ser más susceptibles a la invasión de otros patógenos (hongos, bacterias e insectos), los cuales pueden causar más daño que el tumor en sí (DeCleene y Deley, 1976).

2.5.2 *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

Esta bacteria ocasiona la enfermedad llamada cáncer de los cítricos que fue descrita como nueva, después de haberse introducido en los Estados Unidos de América (Hasse, 1915). El tipo de cáncer más extendido es el cáncer Asiático (cáncer A), el cual afecta a una gran variedad de rutáceas como pomelos, limas y algunas naranjas (Lee, 1918). El cáncer B se presenta en Argentina, Paraguay y Uruguay, y ataca principalmente al limón (Bitancourt, 1957). El cáncer C, descrito en Brasil, se ha reportado en árboles de limas en México; esta variedad del patógeno es serológica y fisiológicamente distinta a las mencionadas (Namekata y Oliveira, 1972). Una cuarta enfermedad, el cáncer D fue también identificado en México y afecta árboles de lima, sin llegar a manifestarse en el fruto (Rodrigues *et al.*, 1985). Por otra parte, el cáncer E fue descrito en los Estados Unidos, en 1984, y difiere de los anteriores en apariencia y tipo de lesión, afectando sólo a árboles jóvenes (Schoultie *et al.*, 1987).

2.5.3 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Este microorganismo es el causante del tizón de la hoja, en el cultivo del arroz y provoca la reducción del crecimiento y maduración de la planta hospedera, resultando en un pobre desarrollo y una baja calidad del grano, al igual que la falta de desarrollo de un número considerable de granos. Aproximadamente, de 300,000 a 400,000 hectáreas han sido afectadas anualmente en Japón en años recientes, con rendimientos bajos del 20 al 30 % en campos afectados. Las pérdidas son mayores en Filipinas, Indonesia y en Asia, donde se han afectado severamente millones de hectáreas (Ou, 1984).

2.5.4 *Erwinia amylovora*

Este patógeno es el agente causal de la enfermedad del tizón de fuego de las plantas rosáceas (Van y Keil, 1979). Se ha comprobado que es extremadamente destructivo para las industrias de manzana y pera en varios países, al igual que en el cultivo de

varias ornamentales. En manzanas y peras, la enfermedad no sólo destruye la cosecha de temporada, sino que puede ocasionar pérdidas de ramas o, en el peor de los casos, del árbol entero, dominando la devastación a largo plazo de los huertos. Esta enfermedad tuvo sus orígenes en el área de Nueva York y causó plagas destructivas hacia el oeste; en Nueva Zelanda y en Europa provocó la principal pérdida económica, después de su aparición en Estados Unidos. En el Reino Unido, por ejemplo, entre 1958 y 1969, el tizón de fuego devastó en una pérdida estimada de 20,000 árboles de pera, 20,000 de espino, 15,000 arbustos de cotoneaster y 2,000 arbustos de piracanta (Great Britain Ministry of Agricultura, 1969).

2.5.5 Pectobacterium carotovorum

Este es el principal patógeno que causa la pudrición de raíz en climas templados, particularmente importante en el deterioro del cultivo de papa o en almacenamiento poscosecha. Las pérdidas del cultivo son generalmente consideradas como sustanciales, aunque la información disponible no es clara (Sigee, 2005). En los Estados Unidos, Kennedy y Alcorn (1980), estimaron que la pudrición de raíz ocasionó una pérdida de 14 millones de dólares en 1976, y de 11 millones, en 1977, sólo en 11 entidades, durante 1976 y posteriormente 16 entidades en 1978. Basándose en todo el mundo, Perombelon y Kelman (1980), dieron un estimado total, sobre todos los cultivos susceptibles a este patógeno que sumó pérdidas anuales entre 50 y 100 millones de dólares.

3. ANTECEDENTES

3.1 PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR HONGOS CON ACTIVIDAD BIOCONTROL

A pesar de que históricamente, el origen de los antibióticos de uso médico se basó en el descubrimiento de la penicilina por Fleming a partir del hongo *Penicillium notatum* (Dax, 1997). No existen ejemplos claros de hongos que se hayan utilizado para controlar enfermedades bacterianas en plantas, específicamente en la rizosfera (Whipps, 2001). Hay pocos trabajos que evidencien la utilización de hongos para la producción de antibióticos en contra de bacterias fitopatógenas (Howell, 1998; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998). La producción de antibióticos por hongos que exhiben actividad biocontrol fue reportada para géneros como *Trichoderma/Gliocadium* (Howell, 1998) y *Talaromyces flavus* (Klöcker) Stolk & Samson (Kim *et al.*, 1990; Fravel y Roberts, 1991), aunque en los últimos años también han sido parcialmente caracterizados para *Chaetomium globosum* (Kunze) (Di Pietro *et al.*, 1992), *Minimedusa polyspora* (J. W. Hotson) Weresub & Le Clair (Beale y Pitt, 1995) y *Verticillium biguttatum* Gams (Morris *et al.*, 1995).

3.2 BIOBACTERICIDAS

Hasta el momento, solamente existen productos basados en bacterias, utilizados como Agentes de Control Biológico para el control de enfermedades bacterianas en plantas.

Bacterias: *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck y van Delden) Conn cepa K86 empezó a comercializarse en 1973 para el control del tumor de cuello causado por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn. Su control se debió a la

presencia de agrocina 84 y 434. La producción de agrocina 84 es codificada por un plásmido (pAgK84) que también contiene genes que codifican para la resistencia a la agrocina 84 y a la transferencia por conjugación (Tra). Con el fin de prever la conjugación y transferencia del gen que dé la resistencia a agrocina al patógeno, transformándolo en resistente, la empresa australiana Bio-Care Technology desarrolló, en 1991, una cepa genéticamente modificada, sin el gen Tra, comercializándose como NOGALL[®] (Wilson y Backman, 1998; Penyalver *et al.*, 2000).

Pseudomonas fluorescens se aplica en forma de spray para combatir *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow en frutales y productos hortícolas, así como los efectos provocados por heladas (www.ars-grin.gov).

Natural Plant Protection, en Francia, ha desarrollado una suspensión bactericida a base de un bacteriófago, capaz de controlar la pudrición radicular causada por *Pseudomonas tolaasii* Paine en cultivos de champiñones (*Agaricus* spp.) y *Pleurotus* spp (www.ars-grin.gov). Esta misma empresa comercializa PSSOL[®], formulado para el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi basado en una cepa no-patogénica.

3.3 *Idriella bolleyi* e *Idriella* sp.

Las especies del género *Idriella* prosperan con más frecuencia sobre raíces y tallos de cereales y pastos (Sprague, 1948; Salt, 1977; Domsch *et al.*, 1980), pero en realidad no se consideran patógenas y pueden lograr un control significativo de todas las enfermedades que afectan a raíces y tallos de cereales y pastos (Waller, 1979; Kirk y Deacon, 1987a), y quizá también de otros patógenos de raíces de cereal (Kirk y Deacon, 1987b). Su crecimiento es como un parásito explotando las cortezas dañadas o tejidos de tallo (Kirk y Deacon, 1987a; Lascaris y Deacon, 1991a) y su propuesta como

control de patógenos es por la competencia de estos tejidos dañados (Kirk y Deacon, 1987b).

Idriella bolleyi fue identificado como un agente potencial de biocontrol para la protección de trigo en contra de infecciones producidas por *Gaeumannomyces graminis* (Kirk y Deacon, 1987b; Lascaris y Deacon, 1991b); esto debido a la capacidad de producir sustancias que inhiben el crecimiento de este microorganismo. *Gaeumannomyces graminis* es el responsable de las infecciones de raíz y tallo de los cultivos de este grano a través del mundo. Resultados obtenidos por Jadubansa y colaboradores (1994), sugirieron que la biomasa de la fracción conidial de *Idriella bolleyi*, tiene un potencial grande para la formulación del inóculo de biocontrol. Sin embargo, la fracción micelial podría sustituir a la fracción conidial, pero en estos experimentos sugieren que es más probable que esto ocurra en ambientes ricos en nutrientes, a diferencia del medio ambiente de la rizósfera donde muy a menudo existe una limitación de nutrientes.

Por último, *Idriella* sp. presentó actividad antibiótica en por lo menos 3 bacterias patógenas al ser humano; éstas son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Mendoza, 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran cantidad de antibióticos que se utilizan en la actualidad, muchos presentan estructuras similares; por lo tanto, el mal uso que se les ha dado durante su dispensación, ha provocado que muchos organismos patógenos hayan creado resistencia; sumado a lo anterior, el resurgimiento de enfermedades, aparentemente controladas, y el desinterés de las grandes potencias por combatir las llamadas enfermedades de países pobres, hace indispensable la búsqueda de nuevos antibióticos con mayor diversidad estructural que presenten novedosos mecanismos de acción.

Normalmente, para combatir las bacterias fitopatógenas, se utilizan antibióticos de uso clínico, o sus derivados, cuyo uso continuo crea resistencia en bacterias de interés clínico, por lo que la búsqueda de antibióticos contra bacterias fitopatógenas debe de realizarse a partir de enemigos naturales, como los hongos fitopatógenos, saprófitos y endófitos, que conviven con las bacterias en los mismos hospederos.

Por lo anterior, *Idriella bolleyi* se ha utilizado como un agente potencial en prácticas de biocontrol, lo cual indica que este género puede producir sustancias que inhiben el crecimiento de otras especies de microorganismos, al igual que en el caso de *Idriella* sp. (Mendoza, 2002).

Mediante el estudio complementario de *Idriella* sp. se pretende encontrar algunas sustancias responsables de dicha actividad antibiótica y su utilización en prácticas agrícolas convencionales, con el propósito de combatir y erradicar enfermedades originadas por bacterias fitopatógenas.

5. HIPÓTESIS

El hongo *Idriella* sp., al igual que otros hongos saprófitos, es capaz de producir compuestos bioactivos nuevos o conocidos, cuyos perfiles de producción varían según sea el sistema de cultivo.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener y caracterizar compuestos bioactivos a partir de *Idriella* sp. con posibles aplicaciones en áreas médicas y agrícolas.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar y seleccionar el medio de cultivo y tipo de fermentación con mayor bioactividad.
- Realizar el cultivo masivo en el medio y tipo de fermentación seleccionado.
- Aislar y purificar los metabolitos bioactivos, a partir del cultivo masivo de *Idriella* sp.
- Comprobar y evaluar la actividad antibiótica de los productos puros obtenidos.
- Realizar cinéticas de producción de los metabolitos bioactivos.
- Identificar los compuestos obtenidos a través de métodos espectroscópicos como UV, IR, Masas y RMN.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general empleada para la búsqueda de antibióticos se estableció de acuerdo a Espinoza (2000), y tomando en consideración publicaciones relacionadas con el tema (Kohno *et al.*, 1999), la cual se muestra en el siguiente plan de trabajo (Figura 2).

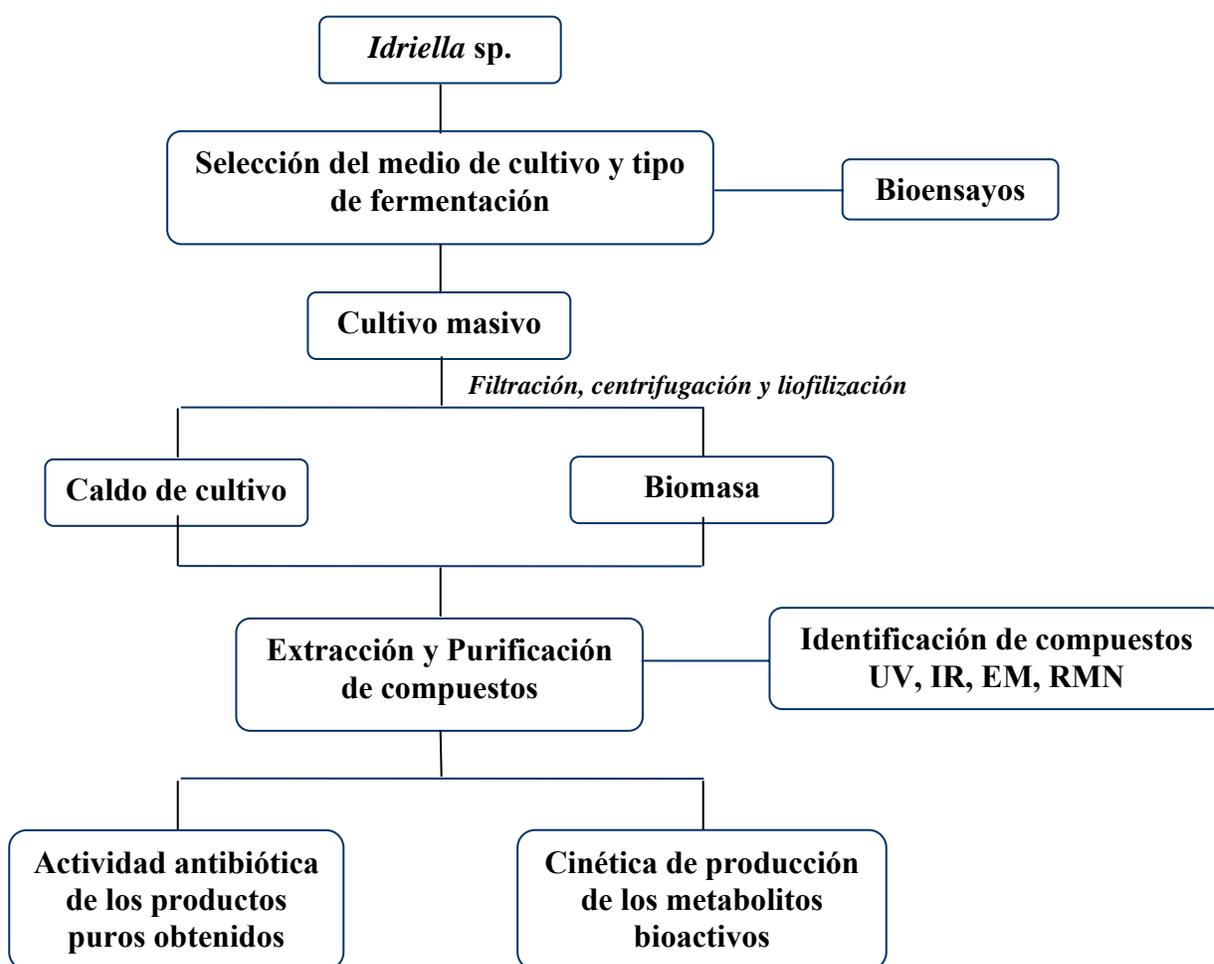


Figura 2. Plan de trabajo para la búsqueda de metabolitos bioactivos producidos por *Idriella sp.*

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó una cepa de un hongo saprófito y 10 especies bacterianas como testigos, tres de las cuales son de gran interés clínico por producir enfermedades graves en el hombre y siete, son consideradas especies fitopatógenas, ya que adquieren un especial interés en prácticas agrícolas, provocando enfermedades. Dichas cepas se describen a continuación.

7.1.1 Cepa del hongo saprófito

Idriella sp. HS-005 fue donada por la Dra. Gabriela Heredia Abarca, investigadora del Instituto de Ecología. *Idriella* sp. fue identificada por comparación morfológica y actualmente está en resguardo en el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, S.C. (LATEX). Fue resembrada en Agar Papa Dextrosa, para su esporulación y mantenimiento a una temperatura constante de 27 °C (Lascaris y Deacon, 1994).

7.1.2 Cepas bacterianas

Para la realización de las pruebas de susceptibilidad microbiana, se utilizaron tres cepas de bacterias de la colección ATCC que tienen importancia médica como control y que son ampliamente recomendadas por la NCCLS para realizar este tipo de pruebas (Tabla 3); (Koneman, 1999).

Tabla 3. Bacterias de interés clínico.

Bacterias de importancia médica	Clave LATEX
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	BM-001
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	BM-002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	BM-003

De igual manera, se emplearon cuatro cepas de bacterias fitopatógenas consideradas como un grave problema en la agricultura, por causar enfermedades en plantas alimenticias y ornamentales. Éstas fueron aisladas e identificadas por el Dr. Mauricio Luna Rodríguez, Investigador de la Universidad Veracruzana. En la tabla 4, se muestra el sustrato de donde fueron aisladas las bacterias fitopatógenas y la clave interna del LATEX.

Tabla 4. Bacterias fitopatógenas donadas por LATEX.

Bacterias fitopatógenas	Sustrato	Clave LATEX
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. atrosepticum	Maracuya	BF-001
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Tomate	BF-002
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Frambuesa	BF-005
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Chile	BF-006
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Caña de azúcar	BF-009

Por último, se emplearon tres cepas de bacterias fitopatógenas, donadas por la Dra. María de Jesús Yáñez Morales, investigadora del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados de Chapingo; ver tabla 5.

Tabla 5. Bacterias fitopatógenas donadas por el Colegio de Posgraduados.

Bacterias fitopatógenas	Sustrato	Clave LATEX
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	Crisantemo	BF-003
<i>Erwinia amylovora</i>	Pera	BF-004
<i>Xanthomonas campestris</i>	Arroz	BF-007

Todas las cepas bacterianas fueron resembradas en Agar Müeller Hinton, para su propagación y mantenimiento, las especies de interés clínico se incubaron a una temperatura constante de 37 °C y las especies fitopatógenas a 27 °C.

7.2 CONDICIONES PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

Para la realización de estas pruebas, una vez descritas las bacterias testigo a utilizar, fue necesario establecer la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mediante la Escala de Macfarland y el tiempo de incubación para cada una de ellas.

7.2.1 Escala de Macfarland

El patrón nefelométrico de Macfarland consiste en una serie de tubos con diferentes grados de turbidez que se utilizan en forma comparativa para ajustar con rapidez la concentración de bacterias en una suspensión. La turbidez se logra al combinar ácido sulfúrico al 1% con cloruro de bario al 1 %, de acuerdo a la reacción:



El incremento gradual de BaCl₂ conduce a la formación de sulfato de bario, el cual precipitará a medida que se incrementa la proporción de cloruro de bario; este precipitado dará una turbidez que será equivalente a la turbidez que resultará de un número cada vez mayor de bacterias por mL en la suspensión. Así, se obtienen tubos que equivalen en turbidez a suspensiones de bacterias de concentración conocida, que se describen a continuación (Gomazo *et al.*, 2005).

1. Se prepararon los reactivos a utilizar: H₂SO₄ al 1 % y BaCl al 1 %.
2. Se preparó una serie de tubos donde se fue incrementando la cantidad de BaCl.

3. A cada uno de estos tubos se les hizo corresponder una cantidad de bacterias/mL, tal y como se muestra en la presente tabla:

Tubo	BaCl₂ (1%) ml	H₂SO₄ (1%) ml	Turbidez equivalente UFC/ml
0.5	0.05	9.95	1.5 X 10 ⁸
1	0.1	9.9	3 X 10 ⁸
2	0.2	9.8	6 X 10 ⁸
3	0.3	9.7	9 X 10 ⁸
4	0.4	9.6	12 X 10 ⁸
5	0.5	9.5	15 X 10 ⁸
6	0.6	9.4	18 X 10 ⁸
7	0.7	9.3	21 X 10 ⁸
8	0.8	9.2	24 X 10 ⁸
9	0.9	9.1	27 X 10 ⁸
10	1.0	9.0	30 X 10 ⁸

4. Posteriormente, se midió la absorbancia generada de la reacción en cada uno de los tubos, en un lector de microplacas modelo Labsystems Multiskan MCC/340, marca Fisher Scientific, utilizando un filtro de 600 nm.
5. Dicha absorbancia fue para tener un control cuantitativo de la reacción y aprovechar la equivalencia con el número de unidades formadoras de colonias por mililitro.

7.2.2 Cinética de bacterias

1. Se sembraron las bacterias testigo 24 h antes de utilizarlas en las pruebas de susceptibilidad.
2. Se realizó una punción a una colonia, con un palillo de madera estéril; se introdujo en un tubo estéril que contenía 15 mL de caldo Müeller Hinton (Anexo A-1, pp. 127); se incubó a 37 ó 27 °C, dependiendo de la bacteria y se mantuvo en agitación constante, en un agitador orbital LAB-LINE, a 150 rpm durante 24 h.

3. Posteriormente, se tomaron 50 µl del inóculo estándar y se pasaron nuevamente a tubos de plástico estériles, con 15 mL de caldo Müeller Hinton; se mantuvieron en incubación a la temperatura correspondiente para cada una de las bacterias y en agitación constante de 150 rpm.
4. Se tomaron muestras cada media hora, después de los primeros 30 minutos de incubación.
5. Se midió la absorbancia generada en cada una de las muestras, con un lector de microplacas, utilizando un filtro de 600 nm y tomando como blanco el caldo Müeller Hinton.
6. La absorbancia obtenida estuvo relacionada con el número de UFC/mL, comparando con la escala de Mcfarland.

7.3 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

La realización de las técnicas descritas se llevó a cabo siguiendo el manual de protocolos *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; proposed Standards*. Publicada por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Subcommittee for on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing*, 1994 (M31-P).

7.3.1 Actividad bacteriostática

La actividad bacteriostática se determinó por el método de susceptibilidad de microdilución en caldo; dicha prueba es la adaptación de la realizada por macrodilución en caldo. Con ella pueden probarse, con relativa facilidad, un gran número de testigos, de modo que el procedimiento está bien adaptado al uso de rutina. Esta prueba suministra más información cuantitativa que la prueba de difusión de discos de Kirby-Bauer (Koneman, 1999). Las bacterias utilizadas como control fueron

expuestas a una serie de diluciones del extracto crudo o compuesto bioactivo aislado, calculando de esta manera la mínima concentración del compuesto bioactivo que fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, mediante observación visual.

El procedimiento para la prueba fue de la siguiente manera:

1. Para la preparación del inóculo, se ajustó una suspensión de bacterias aproximada a 4.5×10^6 UFC/30 μ L, tomando como referencia el tubo de 0.5 de McFarland (150×10^6 UFC/mL).
2. En todos los pozos de una microplaca estéril de 96 pozos (Figura 3), marca Corning-Costar de poliestiereno de fondo redondo y con 6.4 mm de diámetro de pozo, se agregaron 100 μ L de caldo Müller Hinton.
3. Al pozo A-1 se le adicionaron 100 μ L del extracto crudo del hongo y se mezclaron con el caldo, se tomaron 100 μ L y pasaron al pozo B-1, y así sucesivamente hasta el pozo F-1; el mismo proceso, se llevó a cabo con las demás columnas y con los diferentes extractos.
4. Se adicionaron 30 μ L de la suspensión bacteriana a los pozos de la fila A hasta la fila F; los pozos de la fila H y los pozos de la fila G, fueron para los controles positivos (caldo de cultivo y bacterias) y negativos (caldo Müller Hinton), respectivamente.
5. La incubación de las bacterias de interés clínico fue a 37 ± 2 °C, en tanto que las de interés fitopatológico, a 27 ± 2 °C, ambas durante 20 horas. Para evitar la evaporación de los pozos, se colocó la placa en una cámara húmeda.

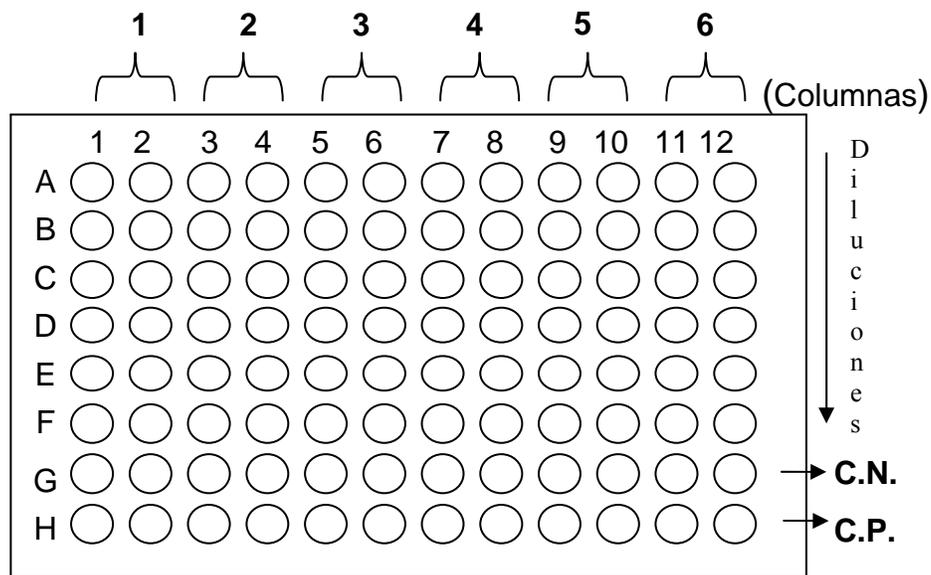


Figura 3. Esquema de una microplaca utilizada en las pruebas de susceptibilidad.

Donde:

1-6 = Representa las columnas donde se probaran los caldos de cultivo o extractos crudos.

C.N. = Control negativo

C.P. = Control positivo

7.3.1.1 Interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI es la menor concentración de un extracto crudo que inhibe el crecimiento de una bacteria. Ésta puede determinarse mediante la visualización de las placas, sin la ayuda instrumental, comparada con los pozos de controles positivo y negativo respectivamente (Koneman, 1999; Mendoza, 2002).

7.3.1.2 Porcentaje de inhibición

Se calcula mediante la siguiente fórmula (Sugie *et al.*, 2001).

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 \times [A_{600} (\text{C.P.}) - A_{600} (\text{M}) / A_{600} (\text{C.P.}) - A_{600} (\text{C.N.})]$$

Donde,

A₆₀₀ = es la absorbancia generada a 600 nm,

C.N. = control negativo

C.P. = control positivo

M = muestra (Caldo de cultivo ó extracto + suspensión de bacterias).

7.3.2 Actividad bactericida

La actividad bactericida se expresa mediante la Concentración Mínima Bactericida (CMB), siendo la menor concentración la que destruye por lo menos el 99.9 % de un inóculo bacteriano (Koneman, 1999).

El procedimiento para determinarla fue el siguiente:

1. Una vez que se determinó la CMI, se identificaron los pozos donde no hubo crecimiento.
2. Se agitó la microplaca para mezclar el contenido de los pozos y continuar la incubación durante 4 h, sumando un total de 24 h de incubación.
3. Se tomaron 10 mL de los pozos donde no hubo crecimiento bacteriano y se depositaron en placas de Agar Müeller Hinton, en forma de gota, o con la ayuda de un asa bacteriológica se diseminaron por la superficie de la placa.
4. Posteriormente, se incubaron durante 24 h, a 37 ± 2 °C ó 27 ± 2 °C, según el tipo de bacterias.

7.3.2.1 Interpretación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La CMB es la concentración del primer pozo donde no se aprecia crecimiento, después del subcultivo en el agar (Mendoza, 2002).

7.4 CONDICIONES DE CULTIVO

7.4.1 Preparación del inóculo fúngico

Se preparó una solución de Tween 80 al 0.01 %; se adicionaron 10 mL a un cultivo de 15 días de crecimiento en caja Petrí y, con ayuda de un bisturí estéril, se removió tanto el micelio como las esporas, obteniendo así una suspensión de esporas y micelio.

7.4.2 Medios de cultivo

Se compararon seis medios de cultivo, diferentes tanto en fermentación líquida (FL) como en fermentación en estado sólido con espuma de poliuretano como soporte inerte (FES-PUF). Los medios a comparar fueron: Extracto de Malta (EM), Power White (PW), Medio de Producción 0.5 X (MP), Medio Sintético (MS), Medio Mínimo (MM) y Power Milk Yeast (PMY) (Anexo A-2, pp. 114). Todos los cultivos se incubaron durante 7 días a una temperatura de 27 °C, con una agitación constante de 150 rpm para la FL, en un agitador orbital.

7.4.3 Fermentación líquida

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de cada uno de los medios de cultivo; el inóculo de *Idriella* sp. fue de 1 mL de una suspensión de esporas y micelio de un cultivo de 15 días de crecimiento. Se incubaron durante 7 días, a una temperatura de 27 °C, en un agitador orbital a 150 rpm.

7.4.4 Fermentación en estado sólido

Se adicionaron 20 mL de cada medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 1.0 g de Espuma de Poliuretano (PUF) como soporte inerte, y se mezcló perfectamente. El inóculo de *Idriella* sp. fue de 1 mL de una suspensión de células vegetativas de un cultivo de 15 días de crecimiento. Se incubaron durante 7 días, a una temperatura de 27 °C.

7.4.5 Preparación de la PUF

La PUF de baja densidad de 17 Kg/m³, se cortó en cubos de 5 mm; se lavó dos veces con agua destilada hirviente; se escurrió y se dejó secar en un horno a 70 °C durante toda la noche (Zhu *et al.*, 1996).

7.4.6 Cultivo masivo

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL del MP a 0.5 X; el inóculo de *Idriella* sp. fue de 2 mL de una suspensión de células vegetativas de un cultivo de 15 días de crecimiento. Se incubaron durante 10 días a una temperatura de 27 °C con una agitación constante de 150 rpm, inoculando un total de 100 matraces Erlenmeyer de 500 mL, dando un volumen total de 10 L.

7.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Terminado el periodo de incubación, se separó el caldo de cultivo de la biomasa producida por *Idriella* sp., con un filtro de nylon de 30 µm de diámetro. El caldo de cultivo, al igual que la biomasa, se congelaron en un refrigerador convencional (-4 °C); posteriormente, se redujo su volumen por liofilización (equipo LABCONCO FREE ZONE 6), obteniendo un volumen del caldo de cultivo de 3 L. La biomasa, una vez seca, se trató con nitrógeno líquido para romper completamente las células y poder realizar una mejor extracción de los metabolitos intracelulares, como se presenta a continuación.

7.5.1 Técnicas analíticas

7.5.1.1 Determinación de pH

La determinación de pH se realizó antes, durante y después de la incubación del medio de cultivo, con un potenciómetro Orion, modelo 420 A, calibrado con soluciones de referencia del Centro Nacional de Metrología (CENAM).

7.5.1.2 Determinación de biomasa en FL

Se realizó mediante el método de peso seco. Los cultivos se retiraron en los tiempos adecuados y se filtraron a través de papel filtro Whatman No. 1, previamente pesado, posteriormente la biomasa retenida se lavó con agua destilada y se secó el papel filtro en un horno a 70 °C. Y por diferencia de peso se calculó la biomasa.

7.5.1.3 Determinación de biomasa en FES-PUF

Se obtuvo mediante el método de peso seco. La PUF utilizada para el crecimiento del hongo se extrajo del matraz Erlenmeyer, se presionó para extraer el caldo de cultivo de la fermentación; los sólidos retenidos en la PUF se llevaron a peso constante en un horno a 70 °C. La biomasa calculada fue la diferencia de peso de la PUF, antes y después del cultivo (Zhu *et al.*, 1996).

7.5.1.4 Determinación de azúcares totales

Para la cuantificación de los azúcares totales se utilizó el método colorimétrico del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Este método se basa en la reacción de los carbohidratos con fenoles, en presencia de un ácido fuerte. Bajo condiciones fuertemente ácidas, los carbohidratos se deshidratan y forman furfural e hidroximetilfurfural, los cuales se condensan con el fenol. La reacción completa forma un complejo de color amarillo-naranja que se puede medir a 490 nm (hexosas) y a 480 nm (pentosas y ácidos urónicos). El color producido es estable y útil para la determinar

pequeñas cantidades de azúcares y sus metil derivados, oligosacáridos y polisacáridos, extraídos con diferentes disolventes.

Método:

1. Se midieron 2 mL de la muestra (solución de carbohidratos) en tubos.
2. Se adicionaron 0.5 mL de la solución de fenol al 80 %.
3. Inmediatamente, se incorporaron 5 mL de H₂SO₄ concentrados con agitación continua y se dejaron reposar durante 10 minutos en baño de hielo; se agitaron nuevamente y se colocaron en baño maría a 25-30 °C durante 10 a 20 minutos.
4. Finalmente, se leyó a 490 nm.

Curva de calibración:

La concentración de azúcares se determinó con ayuda de una curva patrón de 0 a 0.1 g/L. Los blancos se preparan utilizando agua destilada en lugar de la solución de azúcar. El azúcar utilizado en la curva estándar fue la sacarosa, ya que el MP 0.5 X contiene dicho disacárido. La curva de calibración realizada dio un coeficiente de regresión (R) de 0.9985.

7.6 EXTRACCIÓN

En esta etapa, se trabajó con disolventes destilados en columna de rectificación y aumentando el gradiente de polaridad para lograr una extracción completa de los metabolitos producidos por *Idriella* sp. (Figura 4).

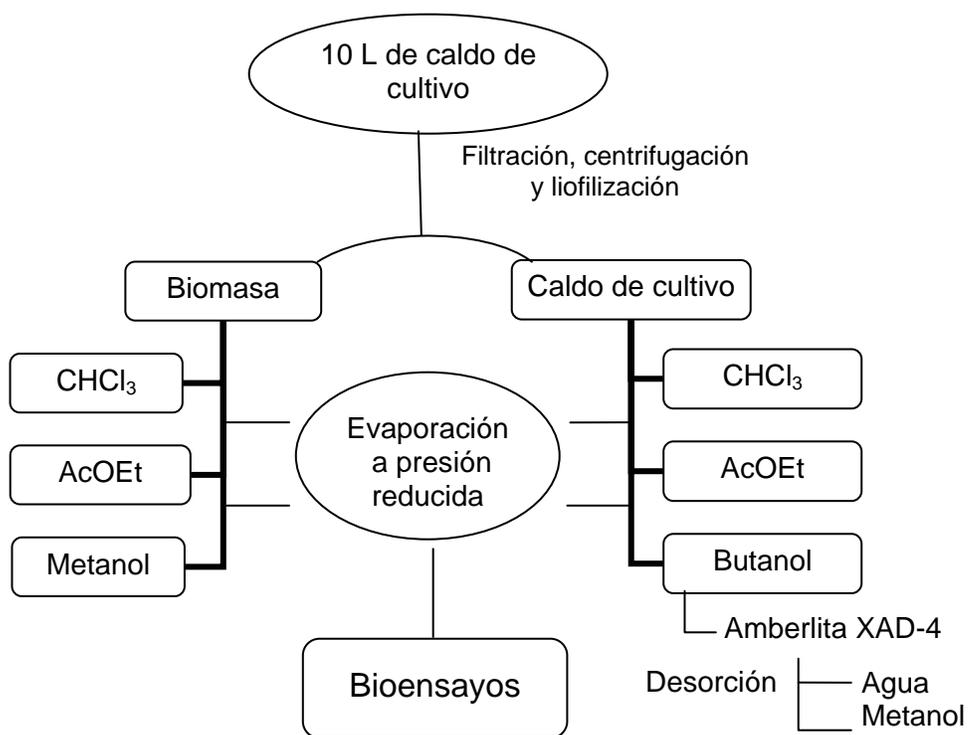


Figura 4. Esquema de trabajo para la extracción de metabolitos bioactivos producidos por *Idriella* sp.

7.6.1 Extracción con cloroformo

A partir de 10 L de caldo de cultivo de *Idriella* sp. reducido a 3 L mediante liofilización, se realizaron extracciones con cloroformo hasta casi agotamiento, utilizando un extractor líquido-líquido, marca SEV con capacidad de 5 L y evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor marca Büchi R-124. De igual manera la biomasa fue extraída con cloroformo (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.6.2 Extracción con acetato de etilo

Una vez finalizadas las extracciones con cloroformo, tanto del caldo de cultivo como de la biomasa producida por *Idriella* sp., se hicieron extracciones con acetato de etilo hasta casi agotamiento, utilizando embudos de separación con capacidad de 2 L para el

caldo de cultivo, en un frasco de vidrio ámbar para la biomasa y evaporando el disolvente a presión reducida, en un rotavapor marca Büchi R-124 (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.6.3 Extracción con n-butanol

Se realizaron extracciones del caldo de cultivo con n-butanol hasta casi agotamiento, utilizando embudos de separación con capacidad de 2 L y evaporando el disolvente a presión reducida, en un rotavapor marca Heidolph, modelo laborota 4000 (Kohno *et al.*, 1999).

7.6.4 Extracción con metanol

Únicamente para la biomasa producida por *Idriella* sp. se le realizaron extracciones con metanol hasta casi agotamiento, y evaporando el disolvente a presión reducida en un rotavapor marca Büchi R-124 (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.7 PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Los extractos obtenidos, se purificaron por medio de técnicas convencionales de laboratorio, como cromatografía en columna gravitatoria, compactada en seco, cromatografía en capa fina y cristalización. La prioridad que se tomó para la purificación de dichos extractos, fue en función a su bioactividad y por referencias bibliográficas donde se menciona que la mayoría de los antibióticos son de carácter polar (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.7.1 Purificación del extracto butanólico del caldo de cultivo de *Idriella* sp.

El extracto butanólico del caldo de cultivo de *Idriella* sp. se separó por cromatografía en columna compactada en seco, utilizando como soporte gel de sílice Merck de 0.040-0.063 mm. Se inició la separación con hexano para separar grasas u otros compuestos de baja polaridad y posteriormente con un gradiente de polaridad de hexano:acetato de etilo, hasta eluir únicamente con acetato de etilo y se finalizó la purificación con etanol como fase móvil. La separación de los compuestos se monitoreó por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios con soporte de aluminio y gel de sílice 60 F₂₅₄ como absorbente. Los reveladores para detectar los compuestos fueron luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), utilizando una lámpara de luz ultravioleta (marca Mineralight modelo UVGL-58), vapores de yodo y ácido fosfomolibdico (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.7.1.1 Obtención de compuestos del extracto butanólico del caldo de cultivo de *Idriella* sp.

De la purificación del extracto butanólico, se obtuvieron dos compuestos puros en las fracciones eluidas con 6:4 hexano:acetato de etilo y acetato de etilo, respectivamente. Del primer compuesto, se obtuvieron 8 mg de un aceite de color café, en las fracciones 62-71. Tras revelar con luz UV a 254 nm y con vapores de yodo, presentó un R_f de 0.44, al ser eluido con una mezcla 6:4 de hexano:acetato de etilo. Se denominó compuesto **1**. A continuación se muestran los datos espectroscópicos:

COMPUESTO 1:

IR (CHCl₃) v_{max}, (cm⁻¹): 3437, 1732, 1681.

MS m/z= 126 (C₆H₆O₃); 109 [M-17]⁺; 97 [M-29]⁺.

RMN H¹ (CDCl₃) δ, ppm: 9.57 (1H, s, H-1); 7.22 (1H, d, J=3.6 Hz, H-3); 6.52 (1H, dt, J=3.6 y 1.0 Hz, H-4); 4.71 (2H, s, 2H-6).

RMN C¹³ (CDCl₃) δ, ppm: 177.7 (C-1); 160.8 (C-5); 152.3 (C-2); 122.9 (C-3); 109.9 (C-4); 57.5 (C-6).

Del segundo compuesto, se obtuvieron 620 mg de unos cristales blancos, con un punto de fusión de 149-150 °C. Tras revelar con ácido fosfomolibdico presentó un R_f de 0.65 al ser eluido con una mezcla de 1:1 de acetato de etilo:metanol Se le denominó compuesto **2**. Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

COMPUESTO 2:

IR (CH₃OH) v_{max}, (cm⁻¹): 3377, 2954, 1370, 1120, 1050, 911, 890, 863, 779, 658.

RMN H¹ (CD₃OD) δ, ppm: 3.90 (1H, d, J=9.89 Hz, H-3'); 3.83 (1H, c, H-5'); 3.77 (1H, dd, J=3.45 y 3.48 Hz, H-4'); 3.75 (1H, dd, J=2.1 y 1.42 Hz, H-6'a); 3.72 (2H, dd, J=11.33 y 11.32 Hz, H-1'); 3.65 (1H, dd, J=1.88 y 1.88 Hz, H-6'b); 3.50 (2H, c, H-1); 1.56 (2H, c, H-2); 1.40 (2H, c, H-3); 0.93 (3H, t, J=7.4 Hz, H-4).

RMN C¹³ (CD₃OD) δ, ppm: 101.6 (C- 2'); 71.6 (C-4'); 71.1 (C-5'); 70.6 (C-3'); 65.2 (C-6'); 63.5 (C-1'); 61.6 (C-1); 33.3 (C-2); 20.5 (C-3); 14.3 (C-4).

7.7.2 Purificación del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp.

El extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp. se separó por cromatografía en columna compactada en seco, utilizando como soporte gel de sílice Merck de 0.040-0.063 mm. Se inició la separación con hexano para separar ceras u otros compuestos de baja polaridad; posteriormente, con un gradiente de polaridad de hexano:acetato de etilo, hasta eluir únicamente con acetato de etilo y se finalizó la purificación con etanol como fase móvil. La separación de los compuestos se evaluó por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios con soporte de aluminio y gel de sílice 60 F₂₅₄ como absorbente. Los reveladores para detectar los compuestos fueron luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), utilizando una lámpara de luz

ultravioleta, vapores de yodo y ácido fosfomolibdico (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.7.2.1 Obtención de compuestos del extracto metanólico de la biomasa producida por Idriella sp.

Finalizada la purificación del extracto metanólico, se obtuvieron dos compuestos puros en las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo 9:1 y etanol, respectivamente. Del primer compuesto se obtuvieron 20 mg de un compuesto, de aspecto graso de color blanco, en las fracciones 30-33. Tras revelar bajo luz UV a 365 nm y con vapores de yodo, presentó un Rf de 0.6 al ser eluido con una mezcla de hexano:acetato de etilo 9:1. Se denominó compuesto **3** y a él corresponden los siguientes datos espectroscópicos:

COMPUESTO 3:

RMN C¹³ (CDCl₃) δ, ppm: 179.8 (C-1); 129.8 (C-2); 129.6 (C-3); 34.1 (C-4); 32.0 (C-5); 29.7 (C-6, C-7); 29.6 (C-8); 29.5 (C-9, C-10); 29.1 (C-11, C-12, C-13); 27.2 (C-14, C-15); 24.7 (C-16); 22.7 (C-17); 14.2 (C-18).

Del segundo compuesto, se obtuvieron 71 mg de un compuesto de aspecto cristalino en forma de agujas transparentes, con un punto de fusión de 163-165 °C. Tras revelar con ácido fosfomolibdico presentó un Rf de 0.75, al ser eluido con una mezcla de acetato de etilo:metanol 1:1. Se le denominó compuesto **4**. Sus datos espectroscópicos son los siguientes:

COMPUESTO 4:

RMN C¹³ (CDCl₃) δ, ppm: 70.9 (C-3, C-4); 69.3 (C-2, C-5); 63.4 (C-1, C-6).

7.7.3 Purificación del extracto clorofórmico de la biomasa producida por *Idriella* sp.

El extracto clorofórmico de la biomasa producida por *Idriella* sp. se separó por cromatografía en columna compactada en seco, utilizando como soporte gel de sílice Merck de 0.040-0.063 mm. Se inició la separación con hexano para separar ácidos grasos u otros compuestos de baja polaridad; posteriormente, con un gradiente de polaridad de hexano:acetato de etilo, hasta eluir únicamente con acetato de etilo y para finalizar la purificación con etanol como fase móvil. La separación de los compuestos se evaluó por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios con soporte de aluminio y gel de sílice 60 F₂₅₄ como absorbente. Los reveladores para detectar los compuestos fueron luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), utilizando una lámpara de luz ultravioleta, vapores de yodo y ácido fosfomolibdico (Trigos *et al.*, 1995a; 1996; 1997; 2001).

7.7.3.1 Obtención de compuestos del extracto clorofórmico de la biomasa producida por *Idriella* sp.

Finalizada la purificación del extracto clorofórmico, se obtuvo una mezcla de ácidos grasos en las fracciones eluidas con 9:1 hexano:acetato de etilo, la cual se identificó mediante cromatografía de gases acoplada a masas. De la mezcla de ácidos grasos se obtuvieron 2.84 g de un compuesto de aspecto graso de color blanco, en las fracciones 34-36 que al revelar bajo luz UV a 365 nm y con vapores de yodo, presentó un R_f de 0.65 al ser eluido en 9:1 hexano:acetato de etilo. Estos compuestos se denominaron compuestos **5**, **6**, y **7**. Sus datos cromatográficos son los siguientes:

COMPUESTOS 5, 6 y 7:

CG-MS (Hexano): 22.22' (pico 1, 22.86 %); 21.82' (pico 2, 38.71 %); 21.65' (pico 3, 7.92 %); 18.35' (pico 4, 27.98 %).

7.8 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS

Para la caracterización estructural de los compuestos aislados se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HSQC, HMBC, a 500 y 75 MHz, en un espectrómetro BRUKER DMX500, y a 300 y 75 MHz, en un espectrómetro GEMINI 2000 marca Varian, empleando como disolventes cloroformo deuterado, metanol deuterado y óxido de deuterio, y tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) de los espectros están expresados en partes por millón (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las abreviaturas empleadas para los espectros de ^1H se muestran a continuación:

Abreviatura	Señal
s	Simple
d	Doble
t	Triple
dd	Doble de dobles
dt	Doble triple
c	Compleja

7.9 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1 Y 2 POR HPLC

Se realizaron cinéticas de producción de los compuestos **1** y **2** para identificar su máxima producción durante el tiempo de incubación, midiendo de igual manera, la evolución del pH en el medio de cultivo. En la tabla 6 se detallan las condiciones para la identificación de dichos compuestos, utilizando la cromatografía de líquidos de alta precisión:

Tabla 6. Condiciones de HPLC para la cuantificación de los compuestos **1** y **2**.

Condiciones	1	2
Columna	Waters (C-18, 300 x 4.5 x 5 μm)	Waters (C-18, 300 x 4.5 x 5 μm)
Fase móvil	Hx:AcOEt 6:4	MeOH:AcOEt 1:1
Flujo	1mL/min	1mL/min
Detector	UV, 281.9	UV-Visible, 334.4 nm
Temperatura	25 °C	25 °C
Inyección	20 μL	20 μL

8. RESULTADOS

8.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

8.1.1 Escala de Macfarland

Inicialmente se establecieron las condiciones para la prueba de susceptibilidad, en la Tabla 7 se muestran los resultados de una serie de tubos, como se indica en la metodología, los cuales equivalen a un número determinado de unidades formadoras de colonia (UFC).

Tabla 7. Relación de equivalencia entre la escala de Macfarland y las unidades formadoras de colonias.

Tubo	Promedio de A ₆₀₀ nm	A ₆₀₀ nm corregida	Turbidez equivalente a UFC/mL
0.25	0.123	0.0226	0.75X10 ⁸
0.5	0.1392	0.0388	1.5X10 ⁸
1	0.2242	0.1238	3X10 ⁸
2	0.3318	0.2314	6X10 ⁸
3	0.4092	0.3088	9X10 ⁸
4	0.5386	0.4382	12X10 ⁸
5	0.6252	0.5248	15X10 ⁸
6	0.7118	0.6114	18X10 ⁸
7	0.7918	0.6914	21X10 ⁸
8	0.8466	0.7462	24X10 ⁸
9	0.8948	0.7944	27X10 ⁸
10	0.944	0.8436	30X10 ⁸
Bco	0.1004 *		

* La absorbancia del blanco fue restada a cada uno de los promedios de absorbancia obtenidos. El promedio de las lecturas de A₆₀₀ nm se obtuvieron de muestras analizadas con 5 replicas.

Dicha reacción fue medida en un lector de microplacas a 600 nm observando una respuesta lineal a medida que aumenta la concentración de BaCl₂ (Figura 5). La absorbancia producida a 600 nm fue la variable respuesta utilizada para cuantificar el crecimiento de cada una de las especies bacterianas en estudio.

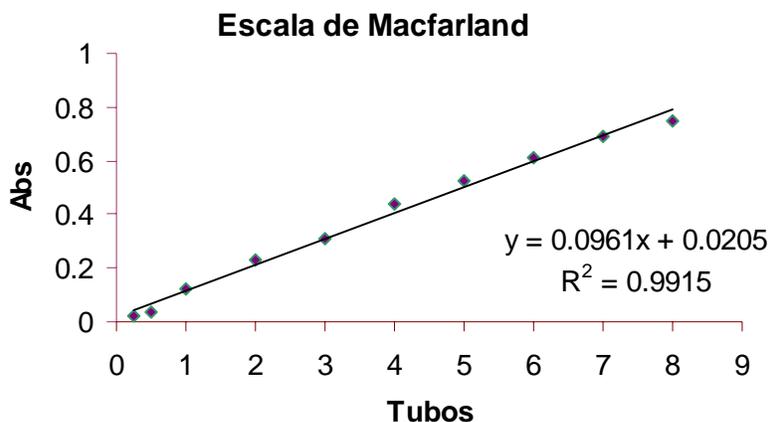


Figura 5. Representación gráfica de la escala de Macfarland, ajustando dicha reacción a una regresión lineal

8.1.2 Cinéticas de crecimiento de las especies bacterianas en estudio

Para determinar el tiempo de incubación de cada especie bacteriana en estudio, se realizaron cinéticas de crecimiento, como se indica en la metodología, con la finalidad de comparar la densidad óptica generada en un tiempo determinado, con las unidades formadoras de colonias/mL de la escala de Macfarland. En las figuras 6 y 7 se aprecian detalladamente dichas pruebas. De acuerdo con la equivalencia de dicha escala y los datos de absorbancia obtenidos, se pudo ajustar el número de bacterias a 4.5×10^6 UFC/30 μ L utilizadas en cada uno de los bioensayos.

8.1.2.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano de tres cepas de interés clínico

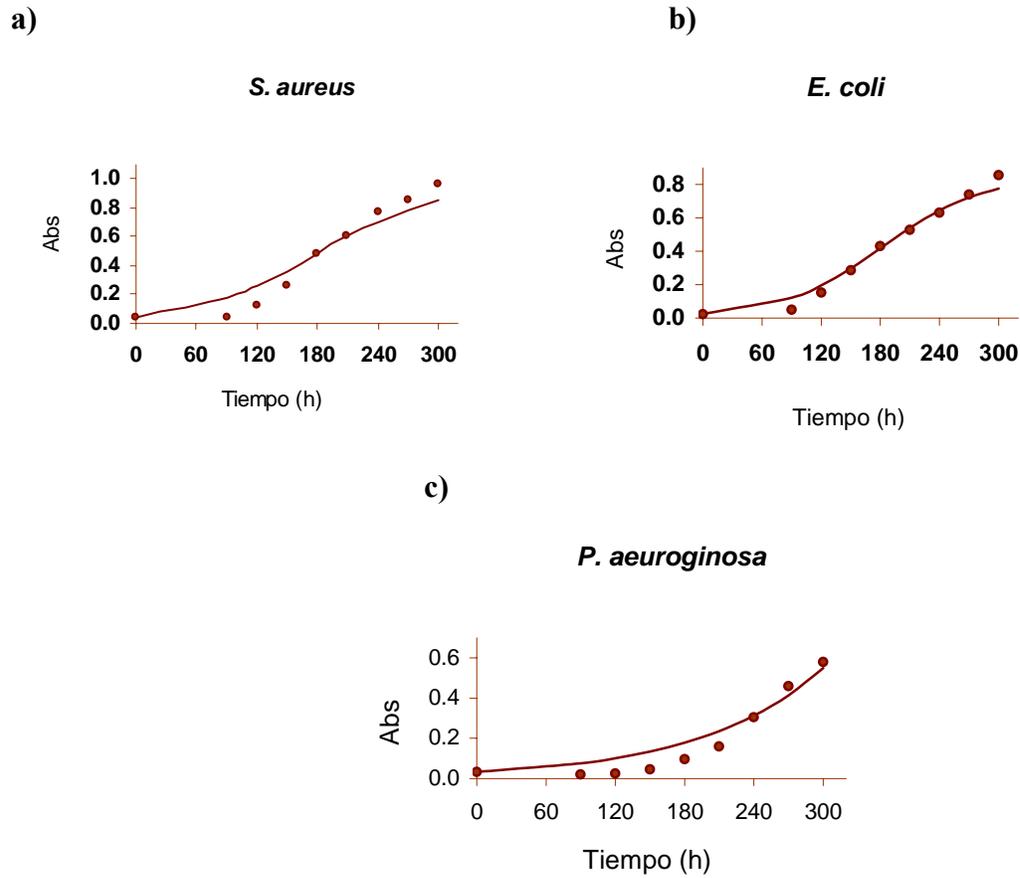


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de tres cepas bacterianas de interés clínico a) *Escherichia coli*, b) *Staphyococcus aureus* y c) *Pseudomona aeruginosa*, incubadas a 37 °C, con una agitación constante de 150 rpm. Los valores experimentales se representan por símbolos y la línea continua indica el ajuste por la ecuación logística.

8.1.2.2 Cinéticas de crecimiento bacteriano de cuatro cepas fitopatógenas

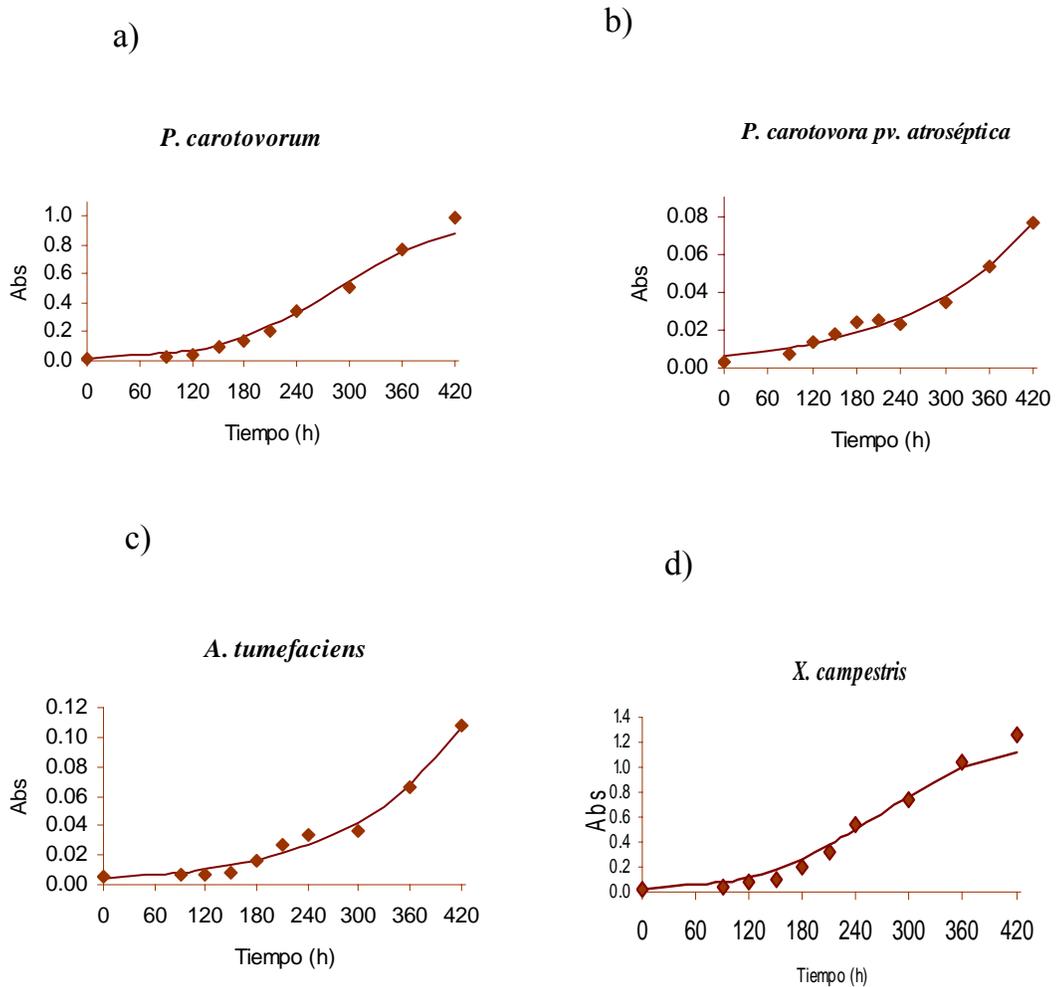


Figura 7. Cinéticas de crecimiento bacteriano de cuatro cepas fitopatógenas a) *Pectobacterium carotovorum*, b) *Pectobacterium carotovorum* pv. *atroseptica* c) *Agrobacterium tumefaciens* y d) *Xanthomonas campestris*, incubadas a 27 °C, con una agitación constante de 150 rpm. Los valores experimentales se representan por símbolos y la línea continua indica el ajuste por la ecuación logística.

8.2 EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y TIPO DE FERMENTACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Idriella* sp.

8.2.1 Introducción

Los cultivos de hongos presentan distintos patrones de crecimiento de acuerdo al sistema de fermentación utilizado. Por ejemplo en FL, los hongos están expuestos a fuerzas hidrodinámicas y crecen formando pequeños agregados o esférulas y como micelio libre. Dicho patrón de crecimiento determina en muchas ocasiones la producción de metabolitos debido a que la difusión de oxígeno cambia de acuerdo al tamaño de las esférulas o al crecimiento miceliar, afectando la actividad biológica de los microorganismos (Papagianni *et al.*, 2001). Se conoce que el metabolismo de los hongos y por tanto la producción de metabolitos y enzimas es afectado de gran manera por el sistema de cultivo (Biesebeke *et al.*, 2002; Viniegra-González *et al.*, 2003).

En FL, el oxígeno contenido en las burbujas de aire difunde a través de la capa límite donde se disuelve en la interfase gas-líquido. Luego el oxígeno disuelto difunde a través de la película líquida que envuelve la burbuja gaseosa antes de entrar en el seno del líquido donde queda disponible para los microorganismos (Thibault *et al.*, 2000).

En las fermentaciones aerobias, la transferencia de oxígeno a los microorganismos es indudablemente el fenómeno más importante para mantener la actividad microbiana. La velocidad de transferencia de oxígeno a las células es el factor limitante que determina la conversión biológica (Thibault *et al.*, 2000). Dadas las características de los sistemas descritos, los rendimientos de productos

de fermentación obtenidos difieren considerablemente entre sí (Robinson *et al.*, 2001; Viniegra-González *et al.*, 2003).

Se ha observado que pequeños cambios en los medios de cultivo, condiciones de operación y sistemas de fermentación permiten explorar la diversidad metabólica de una misma cepa (Zahn *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2002). Bajo estas evidencias se decidió en primer lugar cultivar a *Idriella* sp. en diferentes medios y evaluar si era capaz de sintetizar metabolitos nuevos o conocidos y que presentarán actividad antibiótica.

8.2.2 Efecto del medio de cultivo y tipo de fermentación sobre el crecimiento de *Idriella* sp.

Con la finalidad de observar el crecimiento de *Idriella* sp. al variar considerablemente los nutrientes se compararon seis medios de cultivo tanto en FL como en FES con espuma de poliuretano como soporte inerte (FES-PUF). Los medios de cultivo ensayados fueron: Extracto de malta (EM), Power White (PW), Medio de Producción (MP), Medio Sintético (MS), Medio Mínimo (MM) y Power Milk Yeast (PMY) (Anexo A-2, pp. 114). El sistema de fermentación tuvo un efecto importante sobre el desarrollo de la biomasa, mostrando valores mayores en la FES-PUF comparado con la FL para cada uno de los medios en estudio (Figura 8).

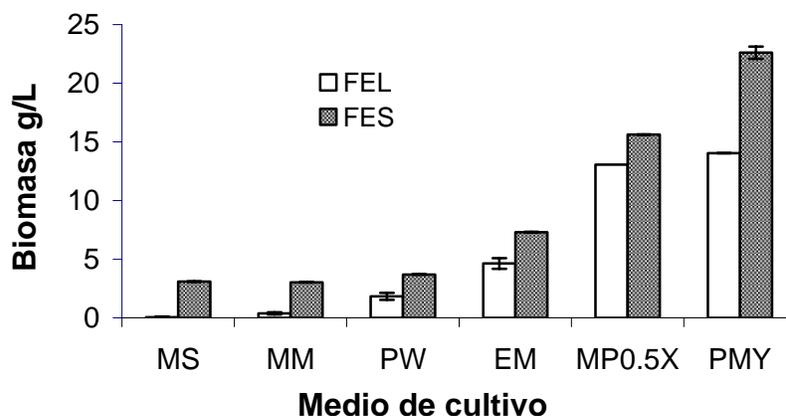


Figura 8. Efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento de *Idriella* sp. utilizando ambos sistemas de fermentación.

Los medios de cultivo MP 0.5 X y PMY sobre ambos sistemas de fermentación fueron los que presentaron un incremento notable en la producción de la biomasa, arrojando valores de 13.06 y 15.62 g/L para el MP 0.5 X, en FL y FES, respectivamente; mientras que para el medio PMY, estos valores fueron 14.04 y 22.06 g/L (Tabla 8).

Los medios de cultivo MS, MM y PW sobre FES-PUF no presentan diferencias en la formación de biomasa de *Idriella* sp. obteniendo valores de 3.1, 3.04 y 3.7 g/L respectivamente. En FL no se observan efectos favorables en cuanto a la producción de biomasa de *Idriella* sp. utilizando los medios de cultivo MS, MM y PW, siendo el MS en el que el crecimiento fue prácticamente nulo obteniendo 0.06 g/L.

Tabla 8. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Idriella* sp. utilizando FL y FES-PUF.

Medio de cultivo	X g L ⁻¹	
	FL	FES-PUF
MS	0.06 ± 0.05	3.1 ± 0.02
MM	0.38 ± 0.1	3.04 ± 0.02
PW	1.83 ± 0.3	3.7 ± 0.02
EM	4.64 ± 0.45	7.3 ± 0.03
MP 0.5 X	13.06 ± 0.6	15.62 ± 0.02
PMY	14.04 ± 0.0	22.6 ± 0.5

8.2.3 Efecto del medio de cultivo y tipo de fermentación sobre la actividad antibiótica de *Idriella* sp.

Para observar el efecto que tiene el medio de cultivo y tipo de sistema de fermentación se realizaron pruebas de susceptibilidad utilizando la técnica de microdilución en caldo, donde el poder bacteriostático expresado en porcentaje de inhibición fue la variable respuesta de cada uno de los medios de cultivo en estudio (Trigos *et al.*, 2005). Se compararon los seis medios de cultivo anteriormente descritos tanto en FL como en FES-PUF. Todos los cultivos se incubaron durante 7 días, a una temperatura de 27 °C y con una agitación constante de 150 rpm para la FL.

Los resultados obtenidos de dichas pruebas indicaron que sólo el MP 0.5 X fue el que presentó poder bacteriostático en contra de las especies bacterianas en estudio (Figura 9). Estos resultados coinciden con lo reportado con Trigos y

colaboradores (2005) quienes muestran el efecto bacteriostático de los caldos de cultivo de *Idriella* sp. cultivado en el mismo medio de producción mediante FL.

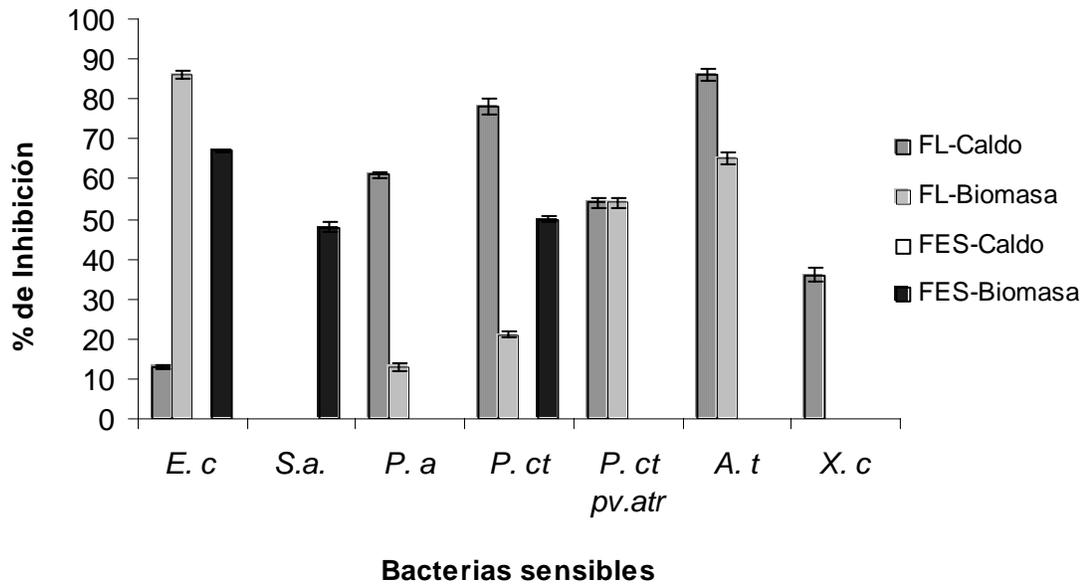


Figura 9. Evaluación del porcentaje de inhibición del caldo de cultivo de *Idriella* sp. utilizando MP 0.5 X, realizado en ambas fermentaciones en contra de *E. c.* = *Escherichia coli*, *S.a.*= *Staphylococcus aureus*, *P.a.*= *Pseudomonas aeruginosa* *P.a.*= *Pectobacterium carotovorum*, *P.a.*=*Pectobacterium carotovorum* pv. *atroséptica*, *A.t.*= *Agrobacterium tumefaciens* y *X.c.*= *Xanthomonas campestris*.

El MP 0.5 X realizado en FL presentó actividad bacteriostática, en contra de 2 especies bacterianas de interés clínico y 4 especies bacterianas de interés fitopatógico utilizadas como testigo (Tabla 9). De esta manera, el caldo de cultivo de *Idriella* sp., producido en MP 0.5 X mediante FL, inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeuroginosa* en un 61 % siendo una especie bacteriana de difícil control en el área médica, por tanto es uno de los patógenos más frecuentes en casos de bacteremias y de neumonías, además, suele ser multirresistente e incrementar la mortalidad asociada (Harris *et al.*, 2002). Por otra parte, también se observó el efecto bacteriostático sobre especies bacterianas de interés fitopatógico

Pectobacterium carotovorum y *P. carotovorum* subs. *atrosepticum* *Agrobacterium tumefaciens*, en un 78, 54 y 86 %, respectivamente.

Tabla 9. Evaluación del porcentaje de inhibición de *Idriella* sp. utilizando medio de producción 0.5 X, realizado en Fermentación Líquida en contra de especies bacterianas patógenas de interés clínico y fitopatógeno.

Cepas bacterianas	Dilución	% de inhibición en FL		% de inhibición en FES-PUF	
		Caldo de cultivo	Biomasa	Caldo de cultivo	Biomasa
Especies bacterianas de interés clínico					
<i>Escherichia coli</i>	1:8	13 ± 0.6	86 ± 0.9	0	67 ± 0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1:8	0	0	0	48 ± 1.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1:8	61 ± 0.7	13 ± 1.0	0	0
Especies bacterianas de interés fitopatógeno					
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1:8	78 ± 1.9	21 ± 0.7	0	50 ± 0.86
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subs. <i>atrosepticum</i>	1:8	54 ± 1.3	54 ± 1.3	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1:8	86 ± 1.5	65 ± 1.5	0	0
<i>Xanthomonas campestris</i>	1:8	35 ± 1.7	0	0	0

Nota: Las diluciones utilizadas del caldo de cultivo en los bioensayos son 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y son equivalentes a 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 µl/mL de caldo de cultivo, respectivamente.

De la misma manera el extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp. a partir del MP 0.5 X mediante FL, mostró efectos bacteriostáticos en contra de *Escherichia coli* en un 86 % lo que nos indica que algún compuesto intracelular es el responsable de dicha inhibición, por lo tanto, manipulando las condiciones de

cultivo y tipo de sistema de fermentación se pueden obtener mayores rendimientos de biomasa y con ello aumentar la concentración del metabolito bioactivo.

También presentó inhibición bacteriana en contra de *Pectobacterium carotovorum* subs. atrosepticum y *Agrobacterium tumefaciens* en un 54 y 65 % respectivamente. Estas últimas especies bacterianas son de gran importancia en la sanidad vegetal del país, ya que se encuentran infectando cultivos agrícolas de importancia económica; por lo que estos resultados contribuyen al conocimiento para su posible utilización como una alternativa en el control de dichas especies bacterianas. De igual forma se evaluó el poder bacteriostático del caldo de cultivo y biomasa producida por *Idriella* sp. en el MP 0.5 X realizado en FES-PUF (Tabla 9). El efecto bacteriostático sólo se pudo observar en el extracto metanólico de la biomasa, presentando un 67 % de inhibición en contra de *Escherichia coli*, en contraste con el obteniendo FL que fue de 86 %.

Un resultado interesante es el mostrado en contra de *Staphylococcus aureus*, y a pesar de que el efecto bacteriostático sólo se presentó en un 48 %, este es un dato que no había sido reportado en Trigos y colaboradores (2005), por lo que la utilización de otro sistema de cultivo, diferente al utilizando por estos autores, permite la síntesis de compuestos responsables del efecto bacteriostático en contra de dicha especie bacteriana.

8.2.4 Efecto del tamaño de la espuma de poliuretano sobre la actividad antibiótica de *Idriella* sp.

Se conoce que el metabolismo de los hongos y por tanto la producción de metabolitos y enzimas es afectado de gran manera por el sistema de cultivo (Biesebeke *et al.*, 2002; Viniegra-González *et al.*, 2003). Utilizando un modelo geométrico donde el volumen es igual al espesor de la superficie de la capa del

líquido, es posible estimar el área de un volumen disperso. Esta consideración geométrica muestra que los cultivos en FES tienen una mayor área superficial para el intercambio de gases (Viniegra-González *et al.*, 2003). En este sistema, una gran cantidad del soporte utilizado está conformado por espacio intersticial y la biomasa entra en contacto con los altos niveles de humedad absorbida en el soporte (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006).

Considerando el efecto bacteriostático que presentó el extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp. en FL, se planteó la siguiente hipótesis:

“El extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp. en FES-PUF mostrará porcentajes de inhibición más altos conforme aumenta el tamaño del soporte utilizado”.

De esta manera, se evaluó la actividad bacteriostática de los extractos metanólicos de la biomasa producida por *Idriella* sp. cultivado en el MP 0.5 X, utilizando ambos sistemas de fermentación. En la FES-PUF se realizaron pruebas con tres diferentes tamaños de cubos de espuma de poliuretano a utilizar (0.5, 1.0 y 2.0 cm). En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la actividad bacteriostática de todos los extractos metanólicos de la biomasa producida, observando interesantes variaciones según el tamaño del soporte inerte en la FES.

Se pudo observar un efecto del tamaño de soporte, puesto que aumentó el porcentaje de inhibición en contra de *Staphylococcus aureus* en los tamaños de 1 y 2 cm respectivamente, en comparación con el obtenido al utilizar el tamaño de 0.5 cm. Es decir, que conforme se aumenta el tamaño del soporte existe una menor área superficial por gramo de soporte, y por consiguiente una disminución en la concentración del oxígeno. Lo que hace pensar que los posibles compuestos

que presentan este efecto bacteriostático sean producto del metabolismo secundario. Los porcentajes de inhibiciones presentados en los tamaños de soporte de 1 y 2 cm pueden estar relacionados con un metabolismo microaerobio en donde la baja concentración de oxígeno conduce a un estrés dentro del sistema de fermentación induciendo a rutas metabólicas relacionadas con dichas condiciones.

Tabla 10. Evaluación de la actividad bacteriostática del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp., realizado en el medio de producción 0.5 X y utilizando ambos sistemas de fermentaciones en contra de especies bacterianas patógenas de interés clínico y fitopatógeno.

Cepas bacterianas	% de inhibición en FL	% de inhibición en FES, utilizando 3 tamaños de soporte inerte		
		0.5 cm	1.0 cm	2.0 cm
Especies patógenas de interés médico				
<i>Escherichia coli</i>	86 ± 0.9	67 ± 0.25	71 ± 0.37	71 ± 0.46
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	48 ± 1.04	76 ± 0.6	72 ± 0.74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 ± 1.0	0	0	0
Especies bacterias de interés fitopatógeno				
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	21 ± 0.7	50 ± 0.86	76 ± 1.02	72 ± 0.49
<i>Pectobacterium carotovorum subs. carotovorum</i>	54 ± 1.3	0	0	0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65 ± 1.5	0	0	0
<i>Xanthomonas campestris</i>	0	0	0	0

Con base en la característica química de los antibióticos o productos bioactivos, correspondería a lo citado por Berry y colaboradores (1977) quienes afirman que

la baja tensión de oxígeno en los medios de cultivo induce rutas metabólicas de formación de metabolitos secundarios.

Un resultado importante de esta etapa del trabajo fue lograr la síntesis de compuestos con efecto bacteriostático en contra de *Staphylococcus aureus* utilizando el MP 0.5 X en FES-PUF, lo cual abre la posibilidad de usar este sistema de producción para aislar compuestos específicamente antagónicos para esta especie bacteriana. De esta manera, se tienen dos sistemas de fermentación: líquido y sólido, en los cuales se presenta inhibición bacteriana, a partir del cultivo de *Idriella* sp.

Los resultados muestran que *Idriella* sp. presenta diferentes efectos bacteriostáticos de acuerdo al tipo de sistema de cultivo utilizado, lo cual no había sido descrito con anterioridad. Debido a ello, la prioridad que se tomó en cuenta para la elección del sistema de cultivo fue la disponibilidad de tener un sistema de fermentación en el que se presentarán efectos bacteriostáticos en contra de especies bacterianas de interés fitopatógeno. De esta manera, se eligió el sistema de FL para la producción de metabolitos nuevos o conocidos con actividad antibacteriana.

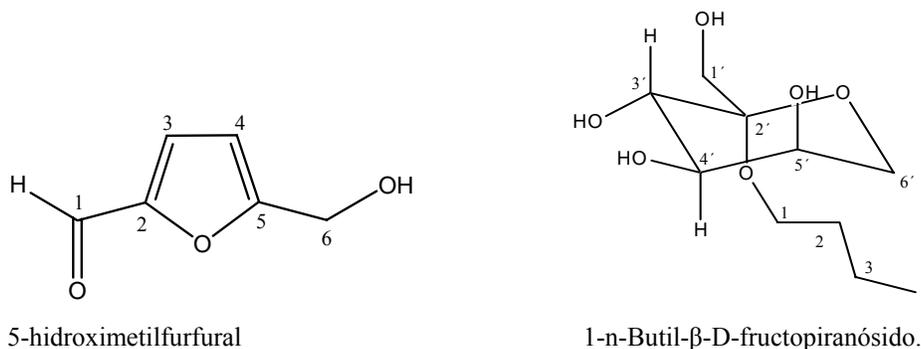
8.3 CULTIVO MASIVO

La FL se realizó en 100 matraces erlenmeyer de 500 mL (10 L) conteniendo 100 mL de medio MP 0.5 X e incubados durante 7 días, a una temperatura constante de 27 °C y una agitación de 150 rpm, una vez concluido el periodo de incubación un volumen total de 8 L fue utilizado para la siguiente fase del trabajo previa separación de la biomasa producida, como se indica en la metodología.

8.4 PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRODUCIDOS POR *Idriella* sp.

8.4.1 Purificación del extracto butanólico del caldo de cultivo de *Idriella* sp.

De la purificación por cromatografía en columna gravitatoria del extracto butanólico del caldo de fermentación de *Idriella* sp. se obtuvieron dos compuestos puros bioactivos, los cuales se identificaron de acuerdo a sus datos espectroscópicos y comparados con la literatura (Ayer y Racok, 1990; Zhu *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1996) como el 5-hidroximetilfurfural (1) figura 10 y 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido (2) figura 11.



Figuras 10 y 11. Se muestran los dos compuestos bioactivos obtenidos de la purificación cromatográfica del extracto butanólico del caldo de cultivo de *Idriella* sp.

8.4.1.1 Compuesto 1

De las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo (6:4) del extracto butanólico, se obtuvieron 8.0 mg de un compuesto de aspecto aceitoso de color café, el cual presentó un R_f de 0.44 en hexano:acetato de etilo (6:4) y que reveló con luz UV a 254 nm y con vapores de iodo. Este compuesto resultó ser el 5-hidroximetilfurfural de acuerdo a sus datos espectroscópicos de IR, RMN, MS y por comparación con los datos reportados en la literatura (Ayer y Racok, 1990).

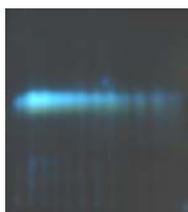
8.4.1.2 Compuesto 2

De las fracciones eluidas con acetato de etilo del extracto butanólico, se obtuvieron 620 mg de un compuesto de aspecto cristalino, en forma de agujas blancas, que funden entre 149-150 °C y con un Rf de 0.65 en acetato de etilo:metanol 1:1 y reveló con ácido fosfomolibdico. Este compuesto resultó ser el 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido de acuerdo con sus datos espectroscópicos de IR, RMN y por comparación con los datos reportados en la literatura (Zhu *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1996).

8.4.2 Purificación del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp.

8.4.2.1 Ácido Oleico

De las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo 9:1 del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp., se obtuvieron 20 mg de un compuesto de aspecto graso de color blanco, el cual presentó un Rf de 0.6 en hexano:acetato de etilo 9:1 (Figura 12), con un punto de fusión por abajo de los 37 °C y reveló bajo luz UV a 365 nm. Este compuesto resultó ser el ácido oleico (Figura 13) de acuerdo con sus datos espectroscópicos de RMN y por comparación con los datos reportados previamente en la bibliografía científica (www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html).

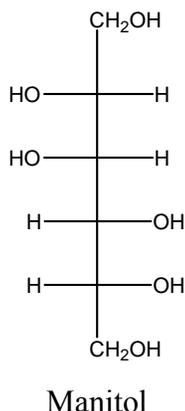


Ácido cis-9-octadecenoico (ácido. oleico)

Figuras 12 y 13. Cromatografía en capa delgada de fracciones puras del ácido oleico y estructura química del mismo.

8.4.2.2 Manitol

De las fracciones eluidas con etanol del extracto metanólico de la biomasa producida por *Idriella* sp. se obtuvieron 71 mg de un compuesto de aspecto cristalino, en forma de agujas transparentes, el cual presentó un R_f de 0.75 en acetato de etilo:metanol 1:1, con un punto de fusión entre 163-165°C y revelando con ácido fosfomolibdico. Este compuesto resultó ser manitol (Figura 14) de acuerdo con sus datos espectroscópicos de RMN y por comparación con los datos reportados en la literatura (Trigos, 1995).



Figuras 14. Estructura química del manitol.

8.4.3 Purificación del extracto clorofórmico de la biomasa producida por *Idriella* sp.

De la purificación por cromatografía en columna gravitatoria del extracto clorofórmico de la biomasa, producida por *Idriella* sp., se obtuvieron una serie de ácidos grasos, los cuales se identificaron por medio de cromatografía de gases acoplado a masas, resultando ser los ácidos linoleico (6), esteárico (7), palmítico (5) y oleico (Figura 15). De las fracciones eluidas en 9:1 hexano:acetato de etilo del extracto clorofórmico de la biomasa, producida por *Idriella* sp., se obtuvieron 2.84 g de una mezcla de compuestos de aspecto graso de color blanco, el cual

presentó un Rf de 0.65 en 9:1 hexano:acetato de etilo con un punto de fusión por debajo de los 37 °C y revelando con luz UV a 254 nm y con vapores de yodo.

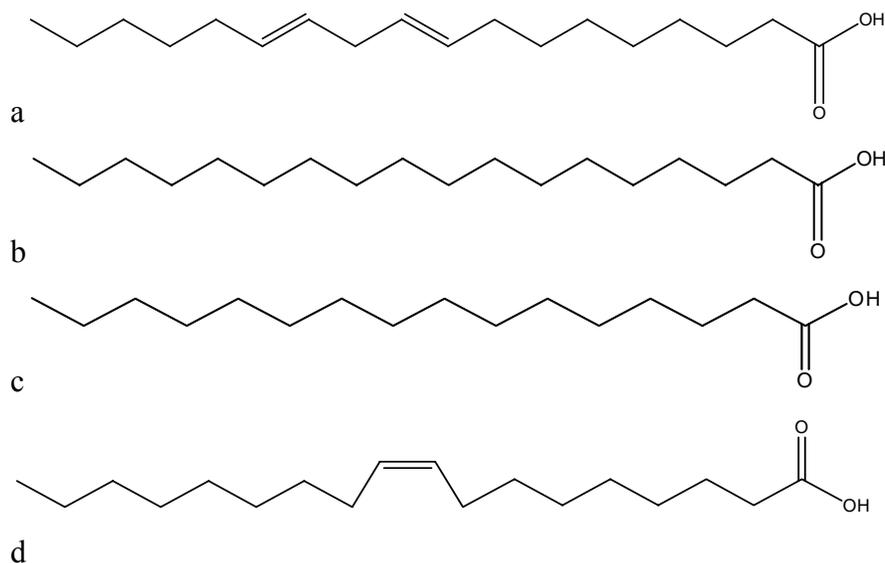


Figura 15. Se muestran los cuatro ácidos grasos producidos por *Idriella* sp.: a) ácido linoleico, b) ácido esteárico, c) ácido palmítico y d) ácido oleico.

8.5 COMPROBACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIBIÓTICA DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

Una vez purificados los compuestos de la fermentación de *Idriella* sp., se realizaron nuevamente pruebas de susceptibilidad para evaluar sus actividades bacteriostática y bactericidas. En la tabla 11, se resume la actividad bacteriostática y bactericida del 5-hidroximetilfurfural (**1**) y el 1-n-Butil- β -D-fructopiranosido (**2**).

8.5.1 Actividad bacteriostática y bactericida del 5-hidroxiacetilfurfural y el 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido

Cómo se puede observar tanto, el 5-hidroxiacetilfurfural (**1**) como el 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido (**2**) presentaron inhibición bacteriana semejante frente a *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovora*, *P. crhyssanthemi*, *Erwinia amylovora* y *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Contrastando con la actividad bacteriostática, el poder bactericida sólo se presentó frente a *Xanthomonas axonopodis* y *Pectobacterium carotovorum*.

Tabla 11. Actividad antibiótica del 5-hidroxiacetilfurfural (**1**) y el 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido (**2**) frente a especies bacterianas fitopatógenas.

Cepas bacterianas	1		2	
	CMI mg/mL	CMB mg/mL	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	0.625	2.5	0.625	2.5
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	0.625	1.25	0.625	1.25
<i>Pectobacterium crhyssanthemi</i>	0.625	NSD	0.625	NSD
<i>Erwinia amylovora</i>	0.625	NSD	0.625	NSD
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	1.25	NSD	1.25	NSD

NSD = No se detecto actividad; CMI = Concentración Mínima Inhibitoria; CMB= Concentración Mínima Bactericida

Adicional a la actividad antibiótica mostrada en este trabajo por el 5-hidroxiacetilfurfural y 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido, en la literatura existen reportes de Khondar y colaboradores (2005) donde se cita que aislaron, a partir de *Monicillium sp.*, el 5-hidroxiacetilfurfural, el cual mostró actividad citotóxica en larvas de camarón, con una DL₅₀ de 23.7 µg/mL; a partir de *Cornus officinalis*

aislaron el mismo furfural, observando actividad insecticida en contra de *Drosophila melanogaster* a una DL_{50} de 34 $\mu\text{g}/\text{adulto}$ (Miyazawa *et al.*, 2003). Mientras que para el 1-n-Butil- β -D-fructopiránosido, existen reportes de que al igual que otros n-alkil-fructopiránosidos mayores a tres carbonos en su cadena lateral, el 1-n-Butil- β -D-fructopiránosido es un inhibidor alergénico, además de mostrar actividad antiestrés en ratones (Japan Pat. 57088121, 1982, Japan Pat. 59163321, 1984).

A continuación se muestran algunas propiedades biológicas reportadas en la literatura del ácido oleico y manitol, respectivamente; Pedras y Ahiahonu (2004), mostraron que el ácido oleico presentó actividad tóxica frente a larvas de *Artemia salina*. Cabe hacer mención que dicho ácido ya está reportado en la literatura y que es uno de los principales ácidos grasos de muchos hongos, como por ejemplo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Pedras y Ahiahonu, 2004). La producción de compuestos de almacenamiento, típicos de hongos, como por ejemplo el manitol y triglicéridos insaturados, provocan efectos dominantes dentro de la comunidad microbiana aeróbica, como en el caso de *Sphagnum majus* (Harwood y Russell, 1984; Richards, 1987; Martin *et al.*, 1988).

8.5.2 Actividad biológica de los ácidos grasos aislados

Ácido Palmítico

Este ácido graso presenta diversas características dentro de las cuales destacan las siguientes: el colesterol sérico total y LDL en personas sanas no se ven afectados cuando este es consumido; así mismo, no se observan efectos colesterolémicos en presencia de ácido Linoleico (Cook *et al.*, 1999). Otros estudios demuestran que, al menos en conejos hipercolesterolémicos alimentados con una dieta rica en ácido palmítico, se observa menos agregabilidad plaquetaria (Scorza *et al.*, 1999).

Ácido Linoleico

Es un precursor de ácido Araquidónico, el cual juega un papel muy importante en la diferenciación celular y funcionamiento correcto de los órganos, así como en la formación del sistema lipídico de las membranas celulares, potenciando la formación de fosfolípidos. Sus propiedades más importantes son que reduce el colesterol LDL, tiene efectos hipocolesterolémicos, precursor de prostaglandinas y propiedades anticancerígenas (Weber, 2005).

Ácido Oleico

El ácido Oleico tiene la capacidad de aumentar el colesterol HDL, así como disminuir los niveles de glucosa sanguínea y el exceso de fosfolípidos y proteínas membranales de las células hemáticas; así mismo, se ha observado la capacidad que tiene de inhibir expresión de oncogenes y apoptosis, por lo cual se le atribuye propiedades antitumorales, además de incrementar la expresión de proteínas con dicha capacidad (Zwan, 2004). El ácido oleico presenta capacidad de sinergismo, ya que incrementa la concentración plasmática de ácido Docosahexanoico, Eicosapentanoico y Fólico, los cuales tienen la característica de disminuir los niveles de triglicéridos, colesterol total y LDL en el organismo (Carrero *et al.*, 2004).

Ácido Esteárico

A pesar de ser un ácido graso saturado, contrario a lo que se podría pensar, posee efectos hipocolesterolémicos, disminuye los niveles de colesterol en el hígado, así como el riesgo aterogénico y trombogénico (Imaizumi *et al.*, 1993; Hassel *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2001). También pueden ser observados efectos en el colesterol total y LDL menores (Yu *et al.*, 1995).

8.6 CINÉTICA DE PH, BIOMASA, AZÚCARES TOTALES Y PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS 1 Y 2.

Los resultados de las determinaciones de pH, biomasa, consumo de sustrato y producción de los compuestos **1** y **2** (Figuras 16 y 17). De esta manera en la figura 14 se puede observar que el pH inicial del MP 0.5 X en FL fue de 6.61, pero conforme se incrementó la formación de biomasa la evolución del pH mostró un rápido descenso al tercer día (72 h) de la fermentación, alcanzando un valor de 4.6 y manteniéndose durante el resto de la fermentación.

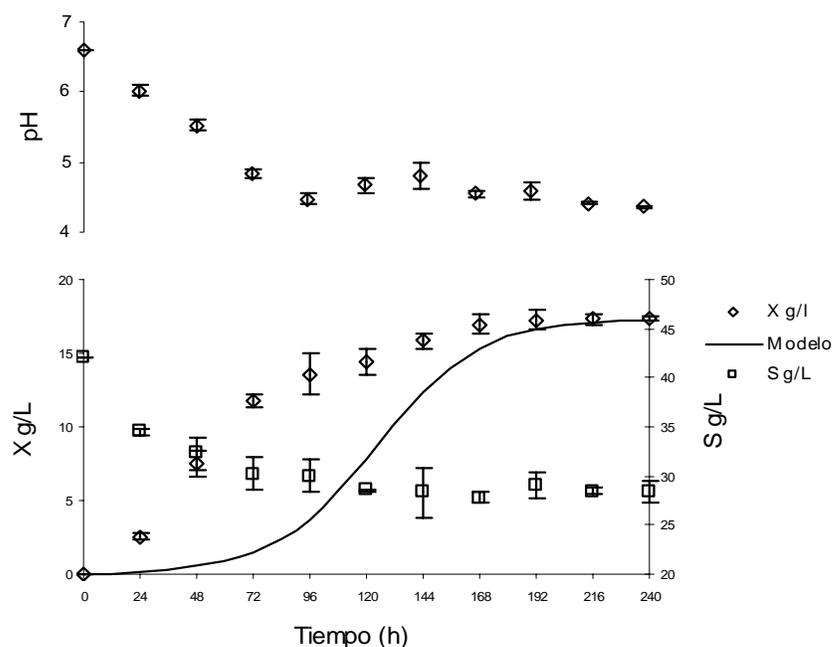
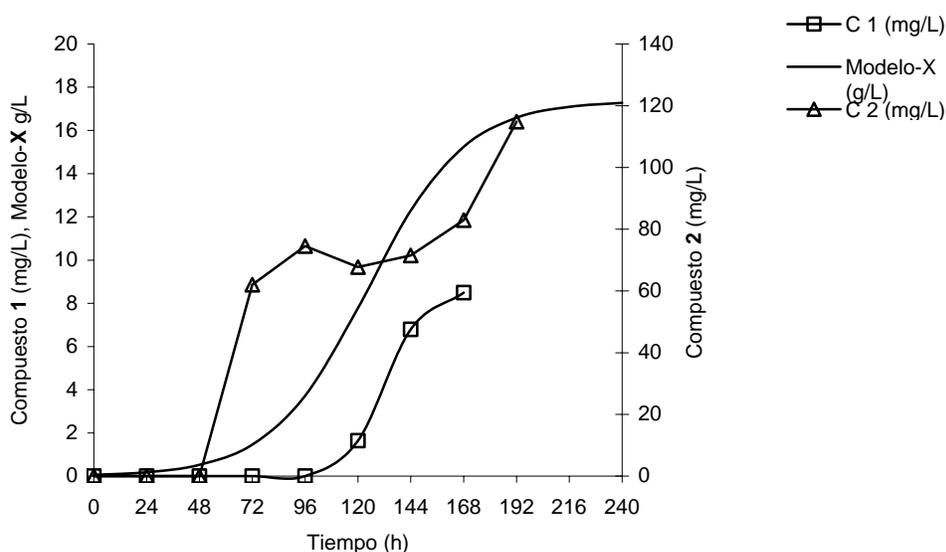


Figura 16. Se muestra la evolución del pH, formación de biomasa, consumo de sustrato y la línea continua es el ajuste con el modelo de la ecuación logística en el medio de producción 0.5 X sobre fermentación líquida.

La máxima producción de biomasa se obtuvo en el octavo día (192 h) con un valor de 17.3 g/L y el consumo de sacarosa por *Idriella* sp. fue de 14.2 g/L hasta las 192 h de fermentación, partiendo de 42 g/L (Figura 15).

Los datos del HPLC muestran que el compuesto **1** fue eluido en 7.4 minutos, mientras el compuesto **2**, a 4.1 minutos, bajo las condiciones descritas en la metodología. La producción del compuesto **1** fue observada después del quinto día (120 h) y alcanzando su valor máximo de (8.5 mg/L) en el séptimo día (168 h), en comparación con el compuesto **2**, el cual se observa a partir del tercer día (72 h) y alcanzando su valor máximo de (115 mg/L), al octavo día (192 h) de fermentación, (Figura 17).



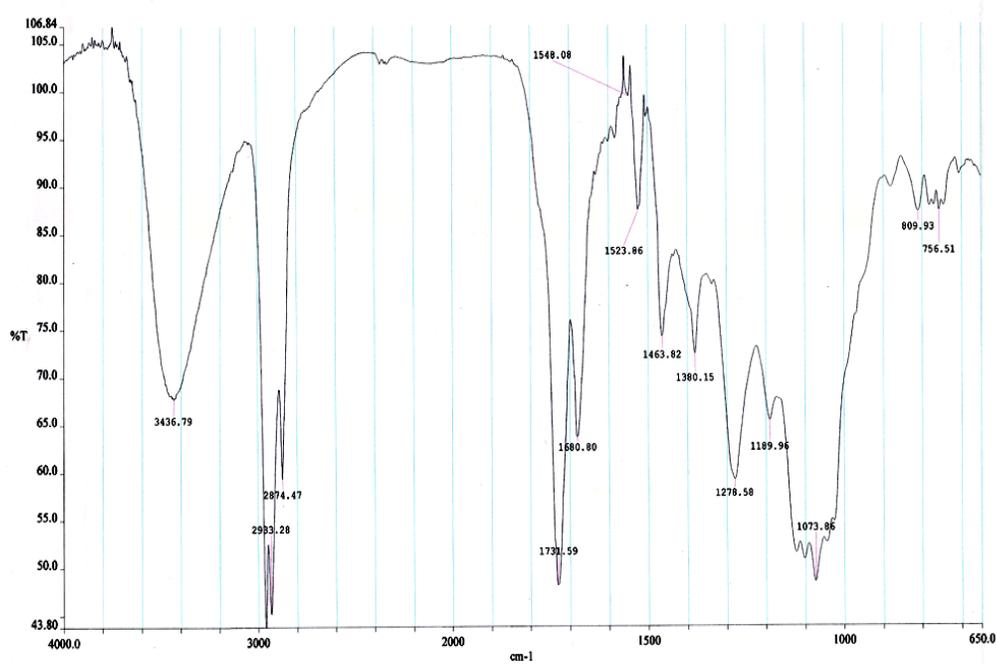
Figuras 17. Cinéticas de producción de los compuestos 1 y 2 y la línea continua es el ajuste con la ecuación logística del crecimiento de *Idriella* sp. en el medio de producción 0.5 X sobre fermentación líquida.

Esto indica que cada compuesto es producido por diferentes procesos relacionados al crecimiento de *Idriella* sp. De esta manera, podemos mencionar que el compuesto **2** está más relacionado al crecimiento que el compuesto **1**, el cual está ligado al metabolismo secundario. Esta observación da la pauta para una posible manipulación sobre la fisiología de *Idriella* sp. para la producción específica de cualquiera de los dos compuestos.

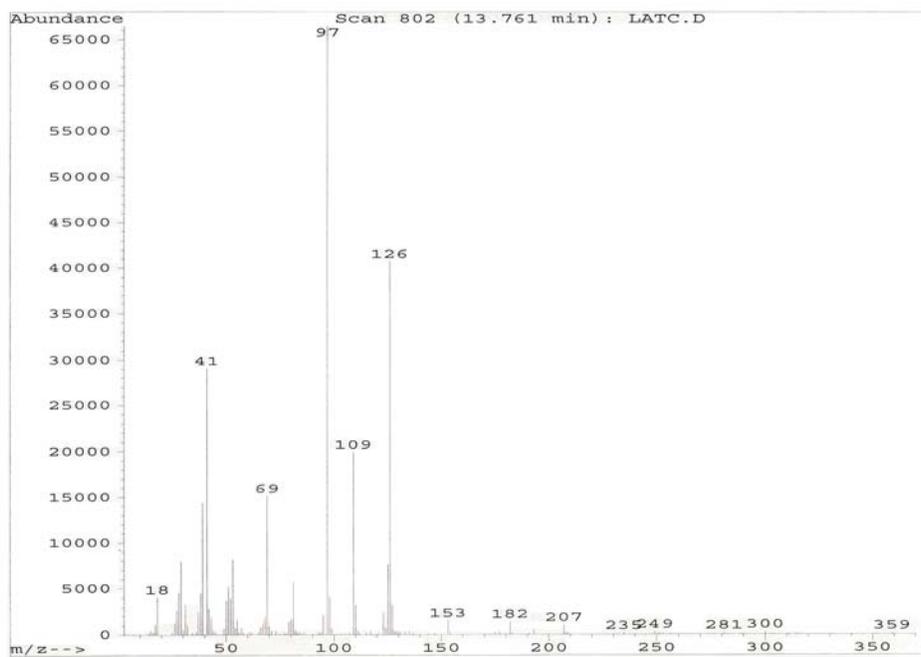
8.7 IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.

8.7.1 5-hidroximetilfurfural

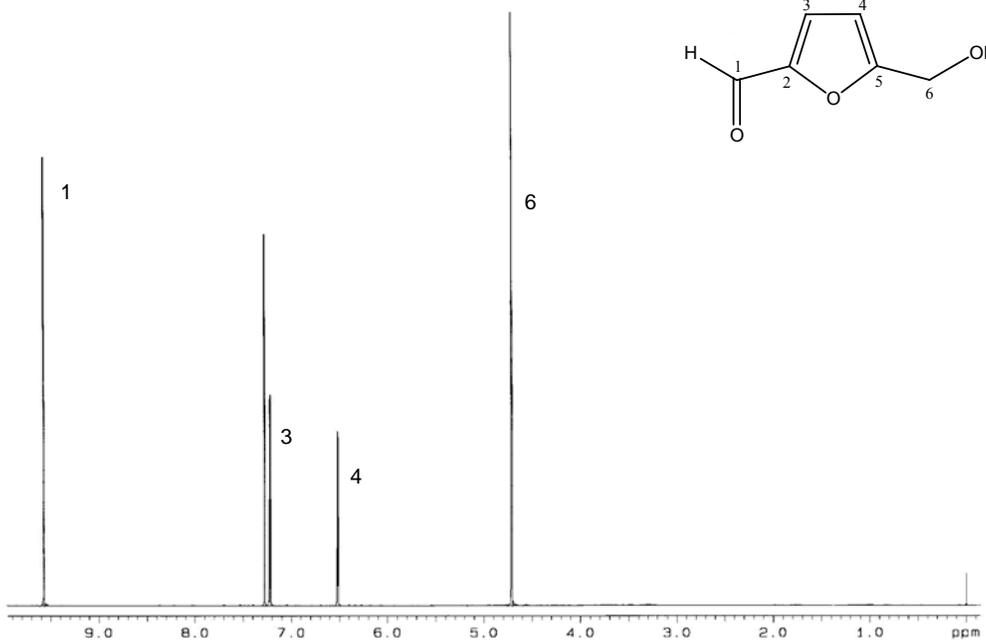
En el espectro de IR (espectro 1), realizado en cloroformo seco, se pueden observar tres bandas, principalmente a 3437, 1732 y 1681 cm^{-1} que corresponden a un grupo hidroxilo y un aldehído α,β -insaturado. En el espectro de masas (espectro 2) se aprecia el ión molecular m/z 126 $[\text{M}]^+$ que corresponde a una fórmula molecular de $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$; adicionalmente, destacan dos fragmentos m/z 109 $[\text{M}-17]^+$ y m/z 97 $[\text{M}-29]^+$ que evidenciaron las pérdidas de un grupo hidroxilo y un carbaldehído. En el espectro de **RMN H^1** (espectro 3) realizado con cloroformo deuterado, se observa a 9.57 ppm una señal simple, atribuible al protón del aldehído H-1; a 7.22 ppm (3.6 Hz) y 6.52 ppm (3.6 Hz) se observaron dos señales aparentemente dobles que integraron cada una para un protón, correspondientes a los protones vinílicos H-3 y H-4, que después de una ampliación (espectro 4), se pudo verificar que la segunda de estas señales, era una señal doble triplete y las constantes de acoplamiento, de 3.6 Hz para la primera, mientras que la segunda fue menor que cero, indicando la casi planaridad del anillo. Finalmente, a 4.71 ppm se aprecia una señal doble, aparentemente simple, que integra para los dos protones del metileno (H-6).



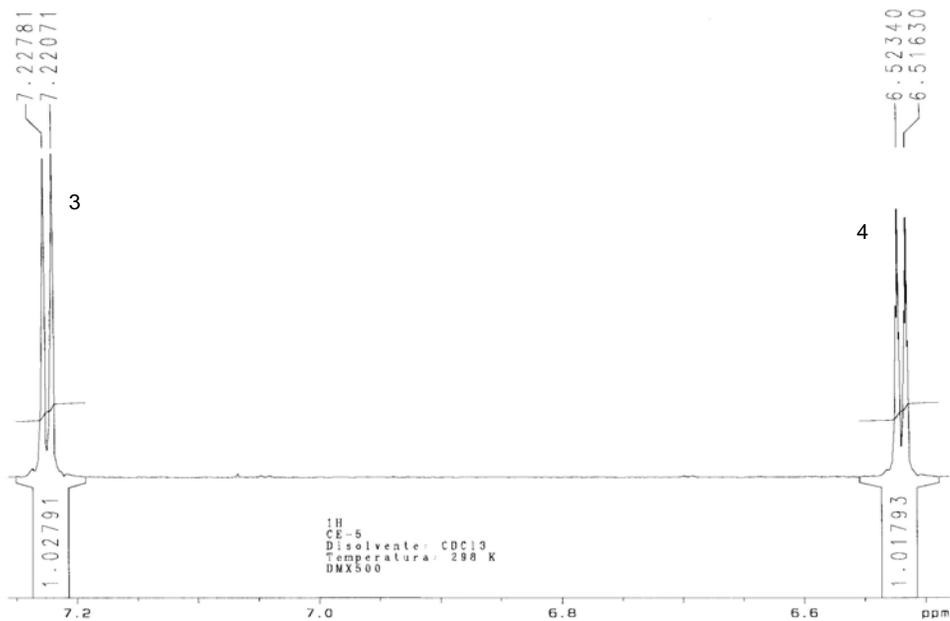
ESPECTRO 1. Espectro de IR del compuesto 1.



ESPECTRO 2. Espectro de Masas del compuesto 1.

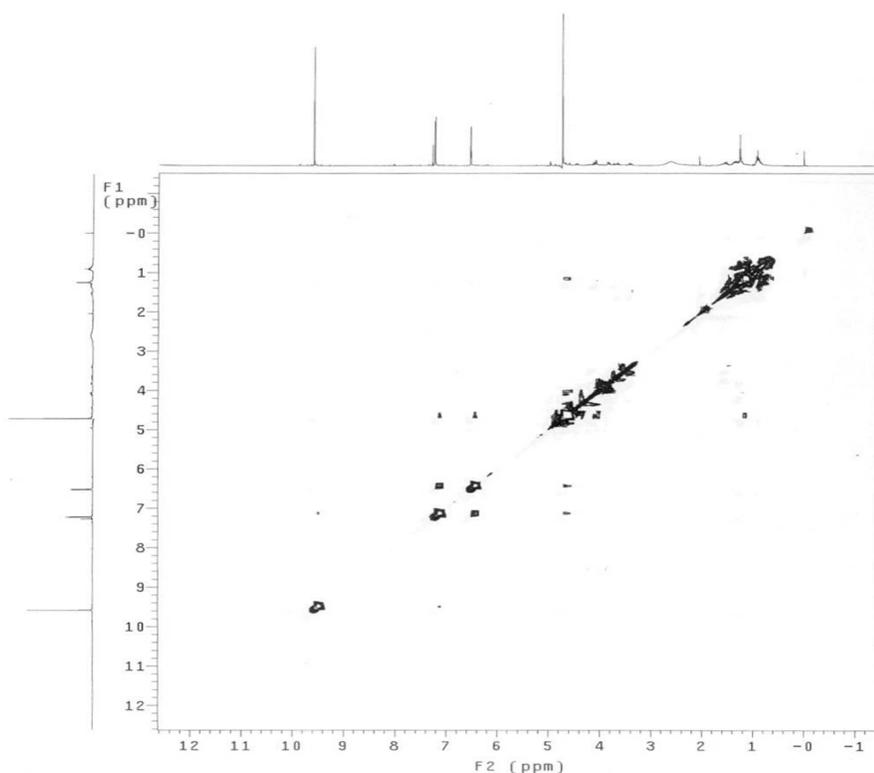


ESPECTRO 3. Espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ del compuesto 1



ESPECTRO 4. Ampliación del espectro de RMN de ¹H en CDCl₃ del compuesto 1

Mientras que en el experimento **COSY** (espectro 5) se pudieron confirmar los acoplamientos entre H-6 con H-3 y H-4 y H-3 con H-1.



ESPECTRO 5. Experimento COSY en CDCl₃ del compuesto 1

Complementariamente, en el experimento de **RMN C¹³** (espectro 6) se observaron 6 señales a 177.7, 160.8, 152.3, 122.9, 109.9 y 57.5 ppm de los 6 carbonos presentes en la molécula. Con la ayuda del experimento **DEPT** (espectro 7) se constata la presencia de 2 carbonos cuaternarios, 2 terciarios y 1 secundario.

Finalmente en el experimento **HMBC** (espectro 8) se confirmó la correlación existente entre C-4 con H-6; C-2 con H-3, H-4 y H-1 y por último C-5 con H-3, H-4 y H-6. Finalmente, con el experimento **HSQC** (espectro 9) se pudieron confirmar todas las asignaciones anteriores. En la tabla 12 se puede apreciar un resumen de todos los desplazamientos químicos de este compuesto, denominado 5-hidroximetilfurfural.

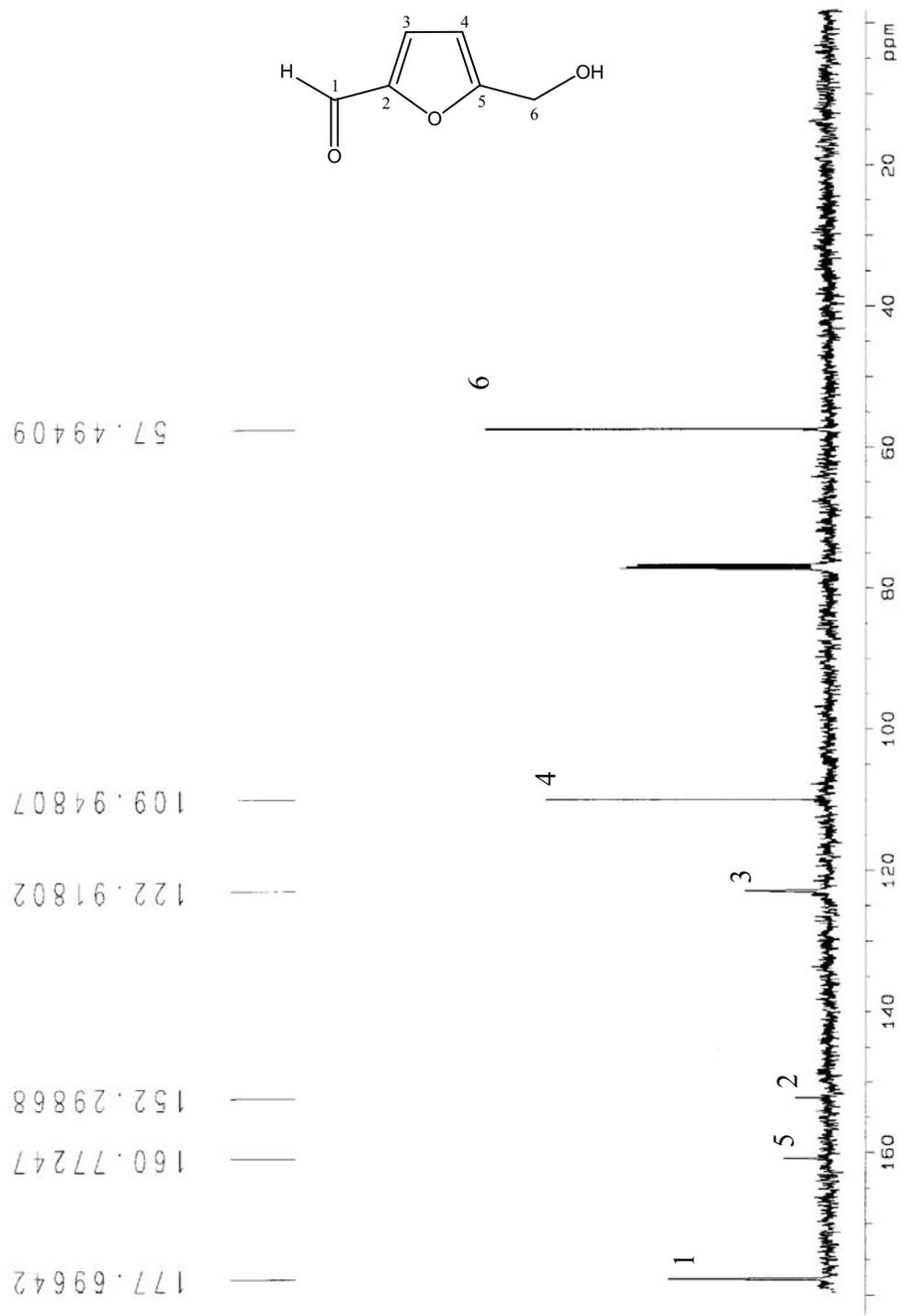
Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del 5-hidroximetilfurfural (**1**) (CDCl_3 , δ ppm).

C	δ	Multiplicidad* DEPT	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ ** Conectividad	Multiplicidad*** RMN ^1H	$^1\text{H} / ^1\text{H}$ ** Conectividad	$^{13}\text{C} / ^{13}\text{H}$ ** Correlación
1	177.7	CH	H-1 (δ , 9.57)	S	H-3	
2	152.3	C				H-1, H-3, H-4
3	122.9	CH	H-3 (δ , 7.22)	d (3.6 Hz)	H-1, H-6	
4	109.9	CH	H-4 (δ , 6.52)	dt (3.6, 1.0 Hz)	H-6	H-6
5	160.8	C				H-3, H-4, H-6
6	57.5	CH_2	H-6 (δ , 4.71)	S	H-3, H-4	

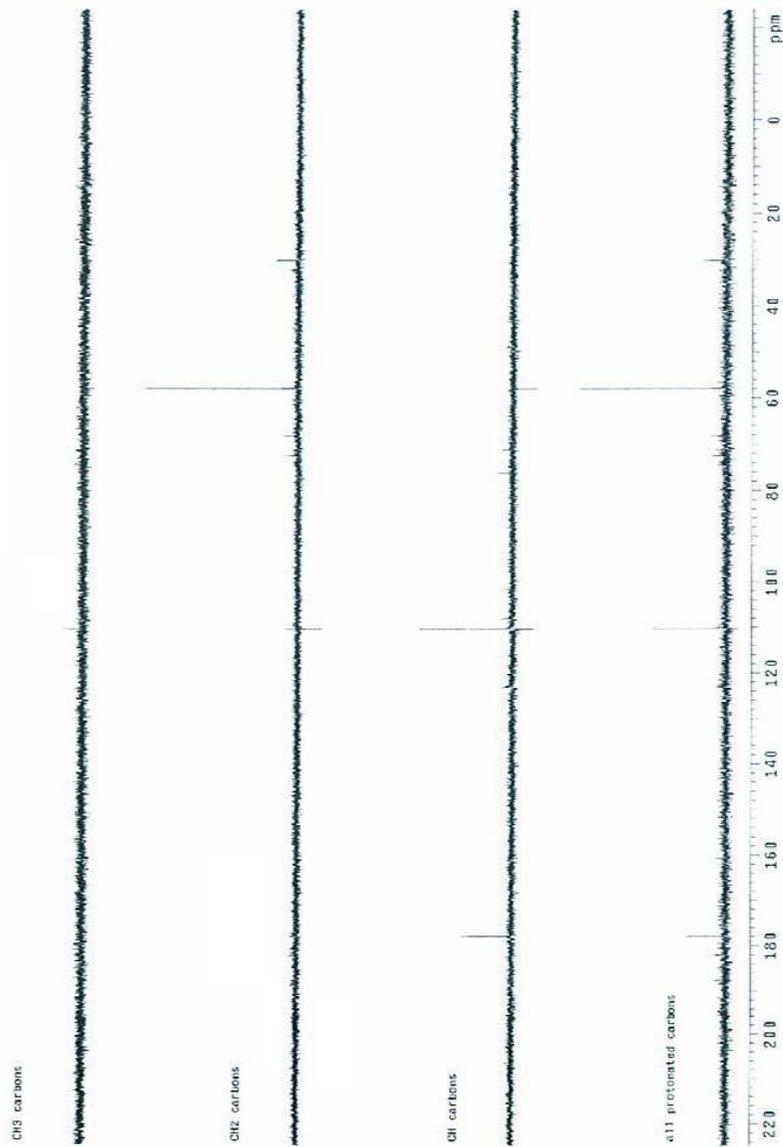
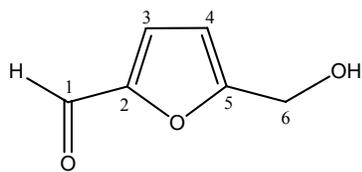
* Multiplicidad del experimento de RMN (DEPT- ^{13}C).

** Asignaciones confirmadas por los experimentos ^1H -COSY, HSQC y HMBC.

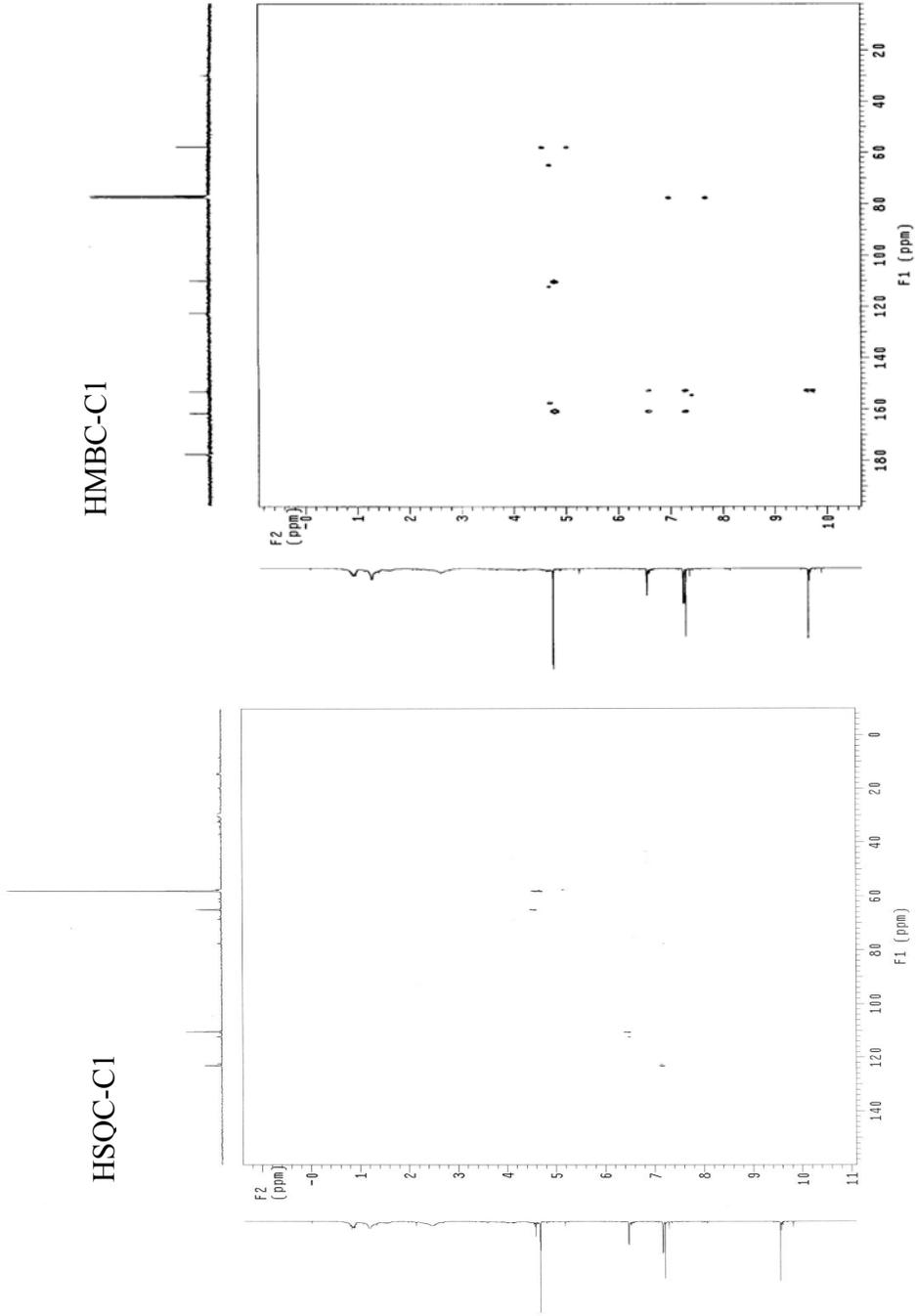
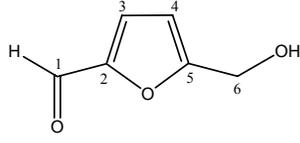
*** Multiplicidad observada en el experimento de RMN ^1H . Constantes de acoplamiento (J en Hz) entre paréntesis.



ESPECTRO 6. Espectro de RMN de ¹³C en CDCl₃ del compuesto 1



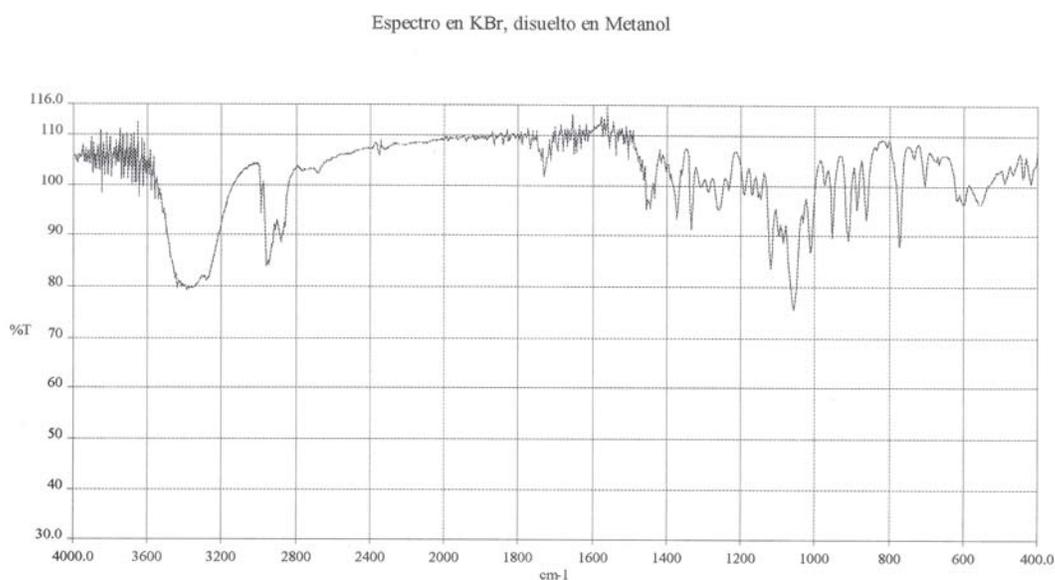
ESPECTRO 7. Experimento DEPT en CDCl₃ del compuesto 1



ESPECTROS 8 y 9. Experimentos de HSQC y HMBC en CDCl₃ del compuesto 1

8.7.2 Compuesto 1-n-Butil- β -D-fructopiranosido

En el espectro de IR (espectro 10) realizado en metanol seco, se observaron bandas de absorción características de la molécula a 3377, 2954, 1370, 1120, 1050, 911, 890, 863, 779, 658 cm^{-1} .

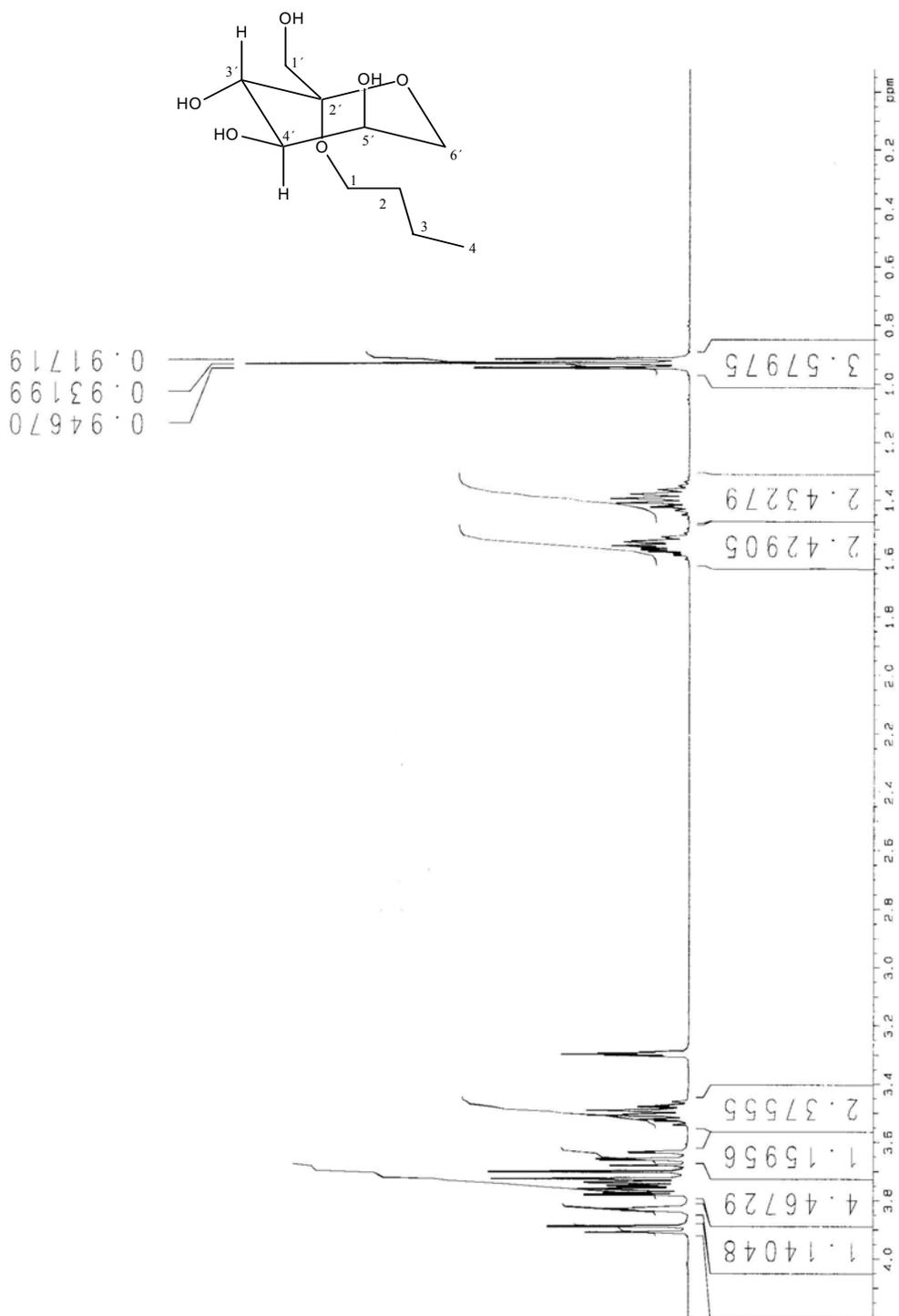


ESPECTRO 10. Espectro de IR del compuesto 2.

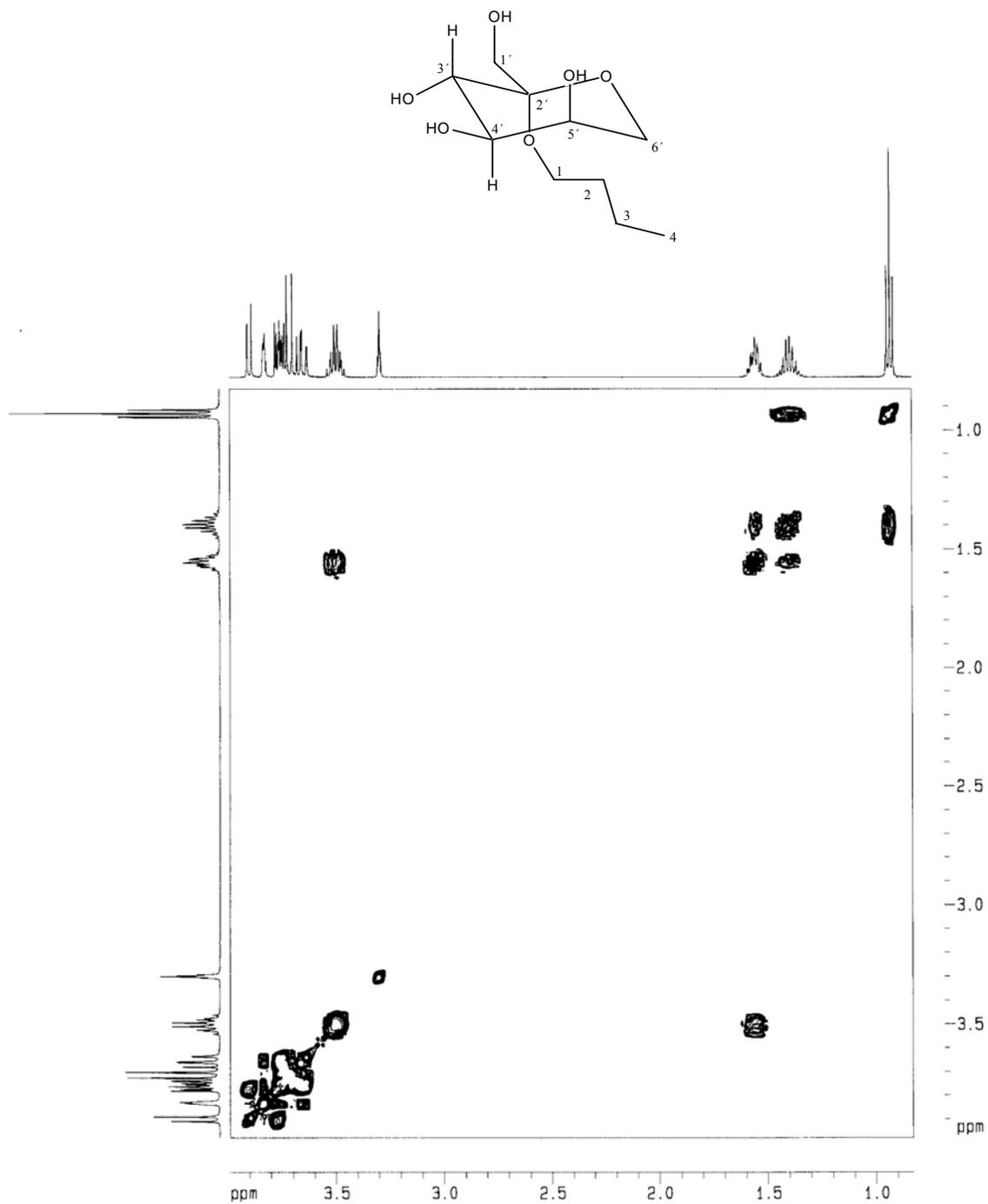
Mientras que en el espectro de **RMN H^1** de 500 MHz (espectro 11) realizado en metanol deuterado, se aprecia un doblete a 3.9 ppm (9.89 Hz) que integra para un protón que correspondió al protón β axial geminal al grupo hidroxilo en 3'; en 3.83 ppm aparece una señal múltiple angosta que integró para un protón y se atribuyó al protón α ecuatorial geminal del grupo hidroxilo en 5'; entre 3.73 y 3.79 ppm aparecen dos señales parcialmente solapadas con constantes de

acoplamiento para la primera de 3.45 y 3.48 Hz y, para la segunda, de 2.1 y 1.42 Hz, que se atribuyeron a los protones α axial geminal al grupo hidroxilo en 4' y a uno de los protones en 6'; a 3.72 ppm se observa un doble de dobles (11.33 y 11.32 Hz) que integra para dos protones y se asignó para los dos protones en 1'; otro doble de dobles se observó a 3.65 ppm (1.88 y 1.88 Hz) y correspondió al otro protón en 6'; a 3.5, 1.56 y 1.4 ppm se aprecian 3 señales múltiples que integran cada una para dos protones y que fueron atribuibles a los tres metilenos presentes en la cadena lateral butoxílica unida al carbono 2' del anillo piránico; finalmente, a 0.93 ppm aparece un triplete (7.4 Hz) correspondiente al metilo de dicha cadena.

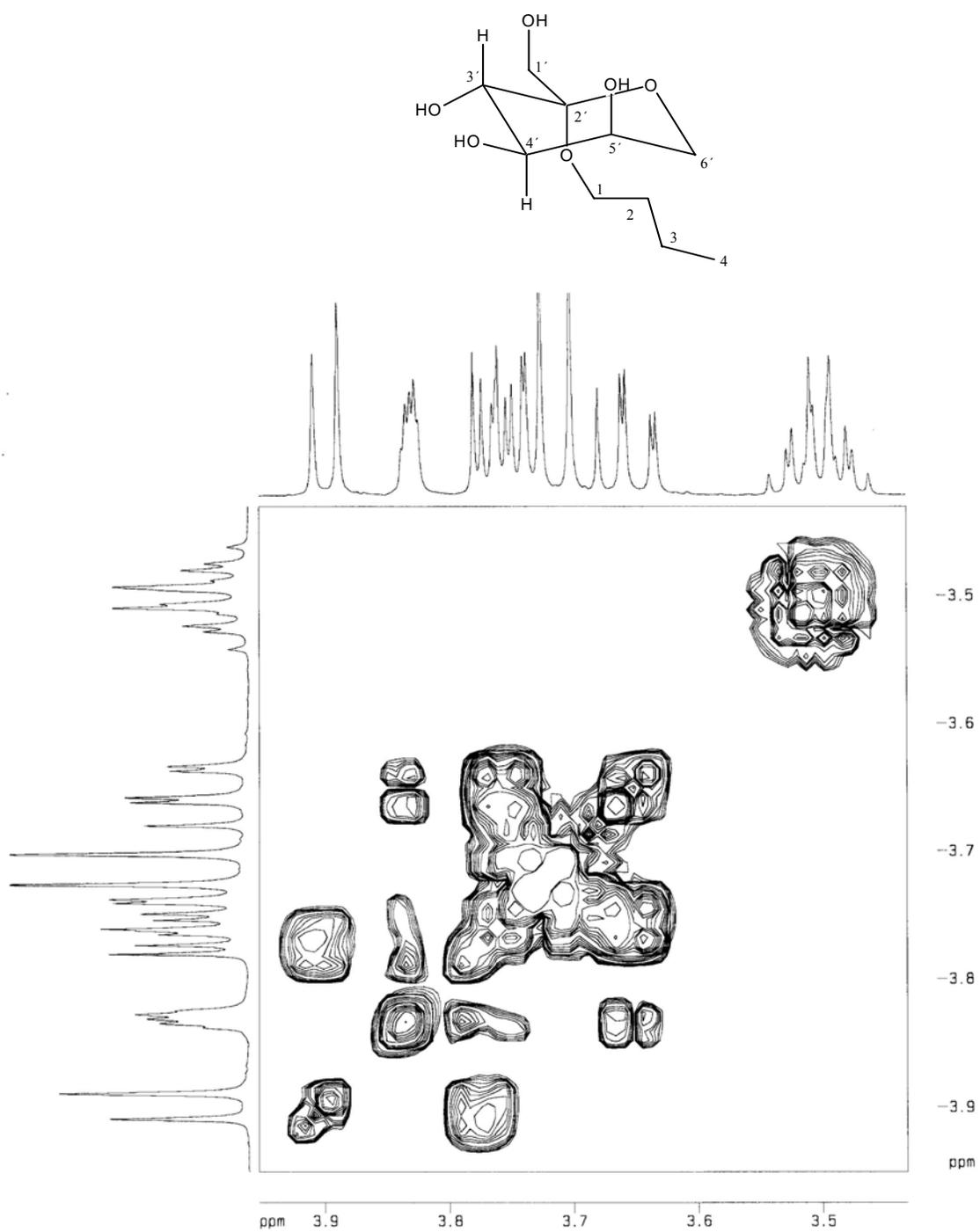
Por otro lado, en el experimento **COSY** (espectro 12 y 13) se observaron los siguientes acoplamientos H-3' con H-4', H-4' con H-3' y H-5', H-5' con H-4' y H-6'b, H-6' con H-6'a, H-6'b y H-5'; así como, H-1 con H-2; H-2 con H-1 y H-3; H-3 con H-2 y H-4; H-4 con H-3.



ESPECTRO 11. Espectro de RMN de ¹H en CD₃OD del compuesto 2

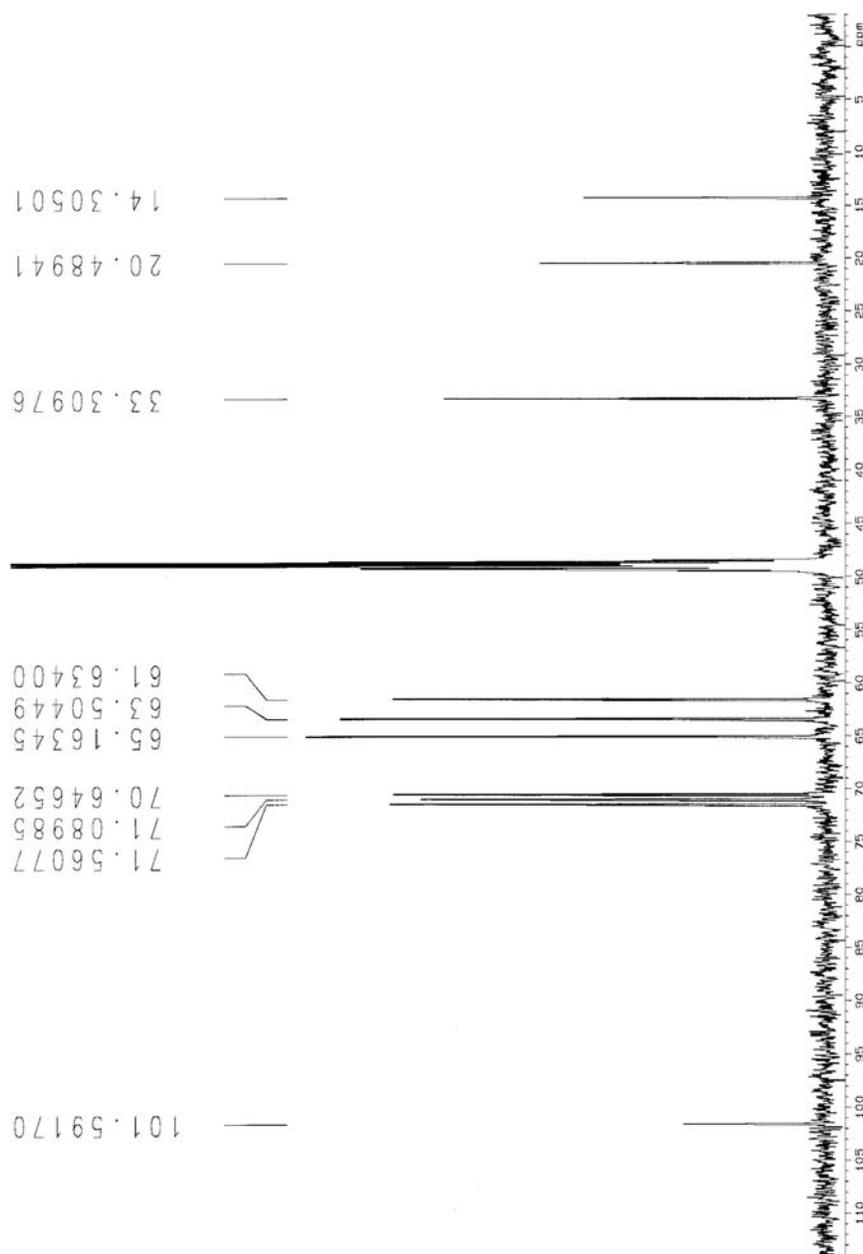


ESPECTRO 12. Experimento COSY en CD₃OD del compuesto 2



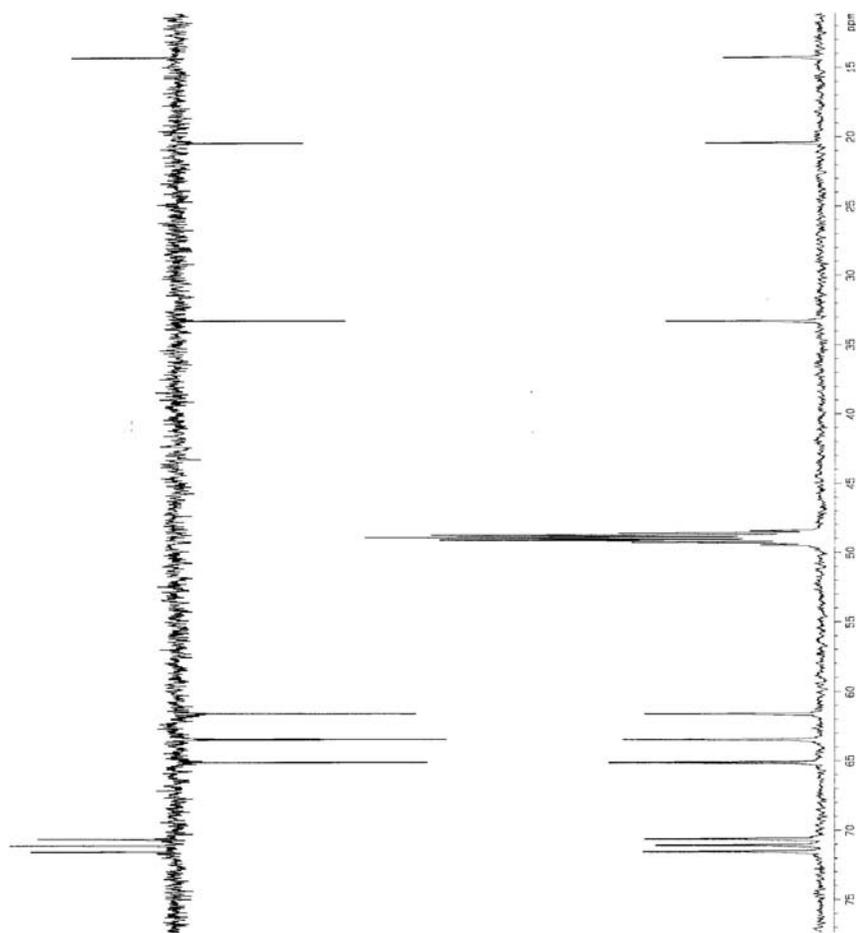
ESPECTRO 13. Ampliación del experimento COSY en CD₃OD del compuesto 2

En el espectro de **RMN ^{13}C** (espectro 14) se aprecian diez señales correspondientes a los 10 carbonos existentes en la molécula.



ESPECTRO 14. Espectro de RMN de ^{13}C en CD_3OD del compuesto 2

Complementariamente, en el experimento **DEPT** (espectro 15), se pudo distinguir que la señal, a 101.6 ppm, corresponde al carbono cuaternario en 2', mientras que 3 señales terciarias, a 71.6, 71.1 y 70.6 ppm, confirman la presencia de C-4', C-5' y C-3', así como a 65.2, 63.5, 61.6, 33.3 y 20.5 ppm aparecieron los cinco carbonos secundarios de la estructura propuesta (C-6', C-1', C-1, C-2 y C-3), respectivamente; finalmente, a 14.3 ppm se evidenció la presencia del metilo C-4 de la cadena lateral.



ESPECTRO 15. Experimento DEPT en CD₃OD del compuesto 2

Las asignaciones anteriores fueron confirmadas por los experimentos **HSQC** y **HMBC** (espectros del 16 al 21), las cuales se encuentran resumidas en la tabla 13, junto con el total de las asignaciones en ^1H y ^{13}C y demás datos espectroscópicos, que coincidieron con lo reportado en la literatura.

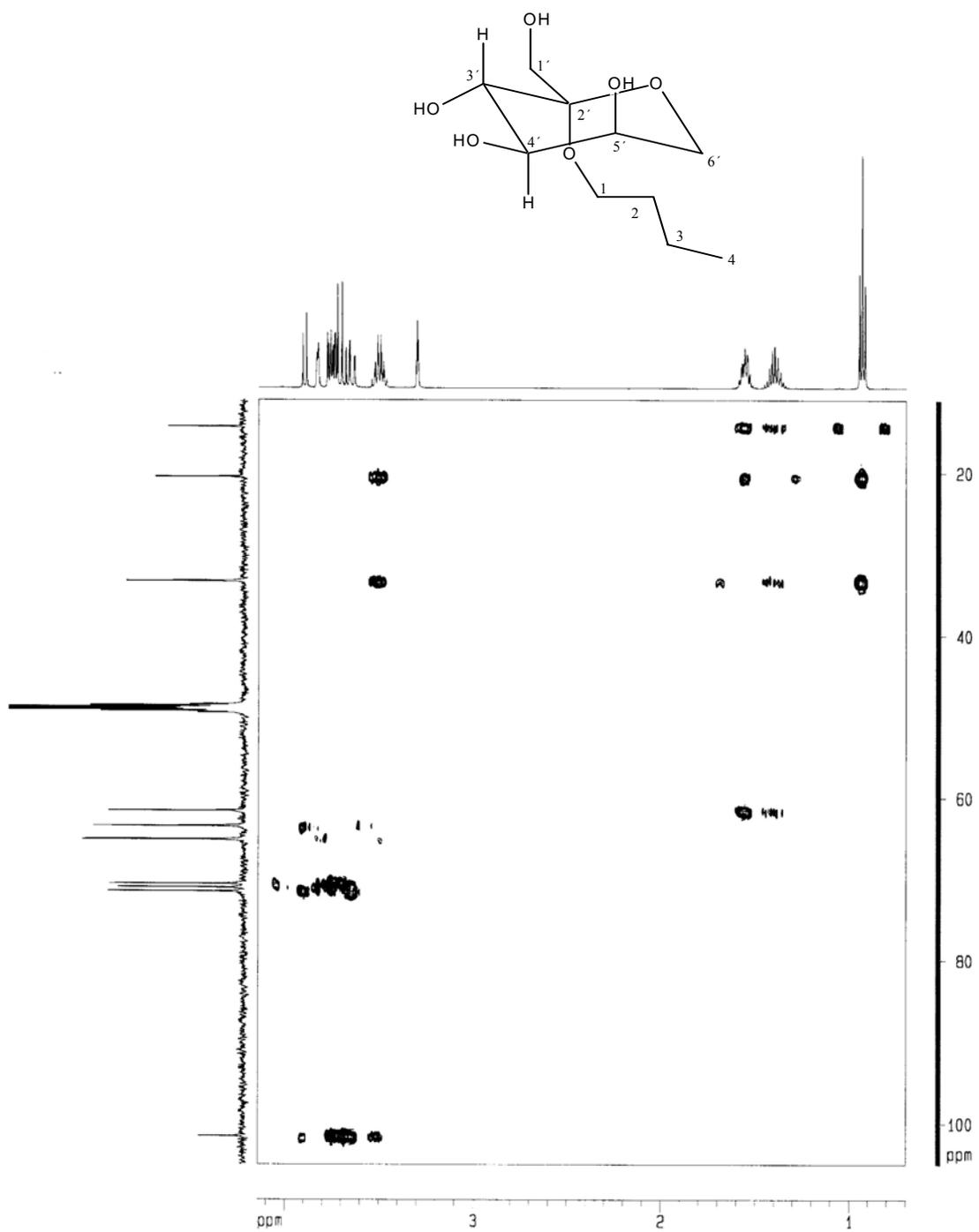
Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del 1-n-Butil- β -D-fructopiranosido (2) (CD_3OD , δ ppm).

C	δ	Multiplicidad * DEPT	$^1\text{H} / ^{13}\text{C}^{**}$ Conectividad	Multiplicidad*** RMN ^1H	$^1\text{H} / ^1\text{H}^{**}$ Conectividad	$^{13}\text{C} / ^1\text{H}^{**}$ Correlación
1'	63.5	CH ₂	H-1' (δ , 3.72)	dd (11.33, 11.32 Hz)		H-3'
2'	101.6	C				H-6', H-4', H-3', H-1', H-1
3'	70.6	CH	H-3' (δ , 3.90)	d (9.89 Hz)	H-4'	H-1'
4'	71.6	CH	H-4' (δ , 3.77)	dd (3.45, 3.48 Hz)	H-3', H-5'	H-6'b, H-3'
5'	71.1	CH	H-5' (δ , 3.83)	c	H-4', H-6'b	H-4', H-6'a, H-6'b
6'	65.2	CH ₂	H-6'a (δ , 3.75) H-6'b (δ , 3.65)	dd (2.1, 1.42 Hz) dd (1.88, 1.88 Hz)	H-6'b H-6'a, H-5'	
1	61.6	CH ₂	H-1 (δ , 3.50)	c	H-2	H-2, H-3
2	33.3	CH ₂	H-2 (δ , 1.56)	c	H-1, H-3	H-1, H-3, H-4
3	20.5	CH ₂	H-3 (δ , 1.40)	c	H-2, H-4	H-1, H-2, H-4
4	14.3	CH ₃	H-4 (δ , 0.93)	t (7.4 Hz)	H-3	H-2, H-3

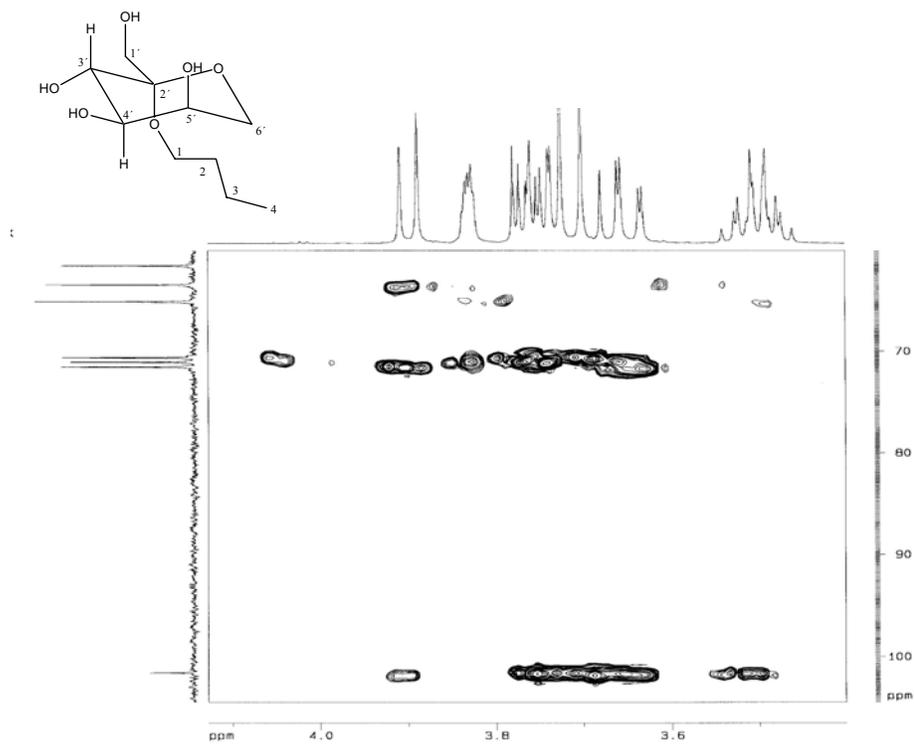
*Multiplicidad del experimento de RMN (DEPT- ^{13}C).

**Asignaciones confirmadas por los experimentos ^1H -COSY, HSQC y HMBC.

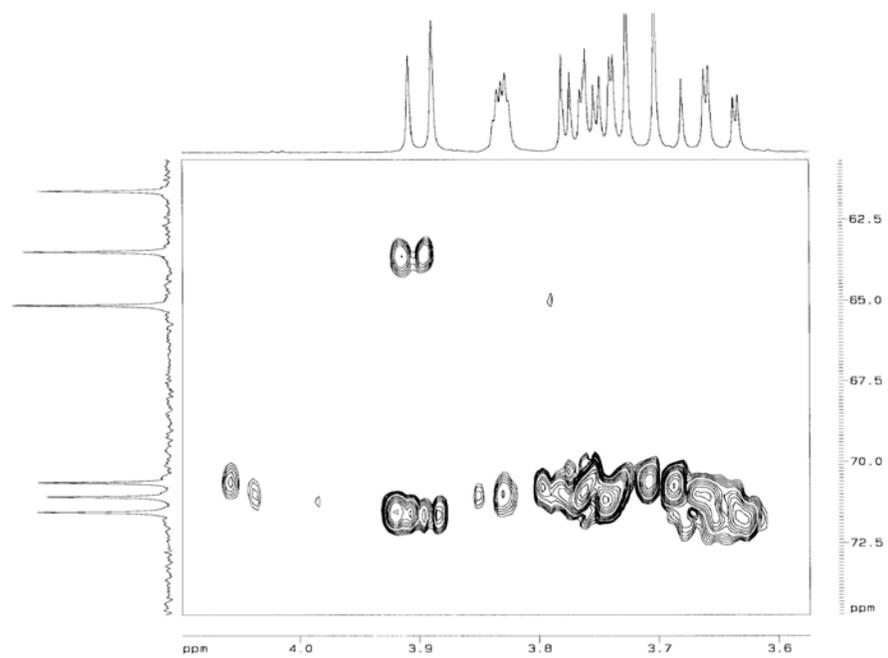
*** Multiplicidad observada en el experimento de RMN ^1H . Constantes de acoplamiento (J en Hz) entre paréntesis.



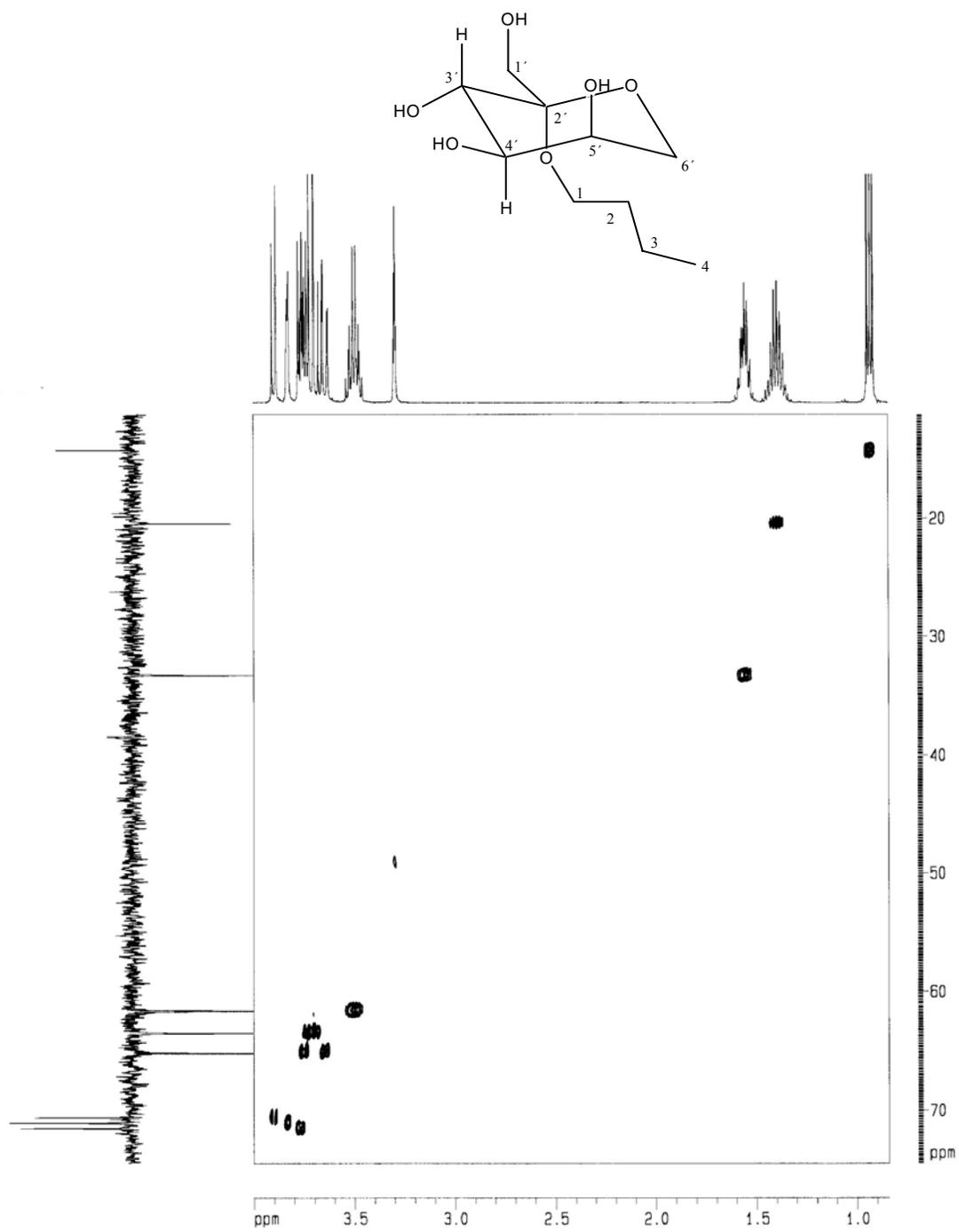
ESPECTRO 16. Experimento HSQC en CD₃OD del compuesto 2



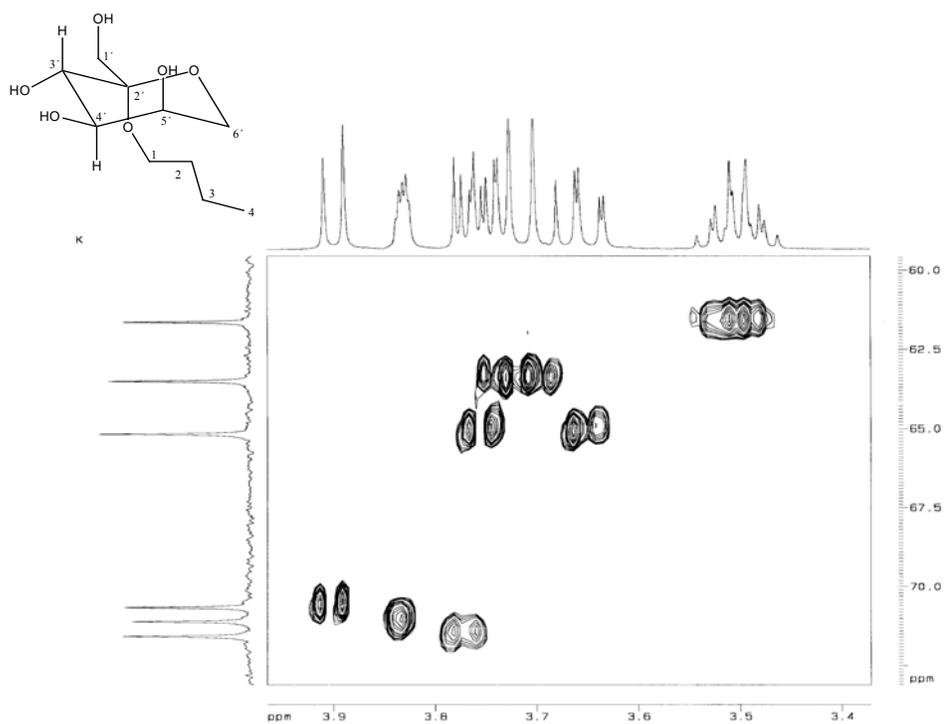
ESPECTRO 17. Ampliación del experimento HSQC en CD_3OD del compuesto 2



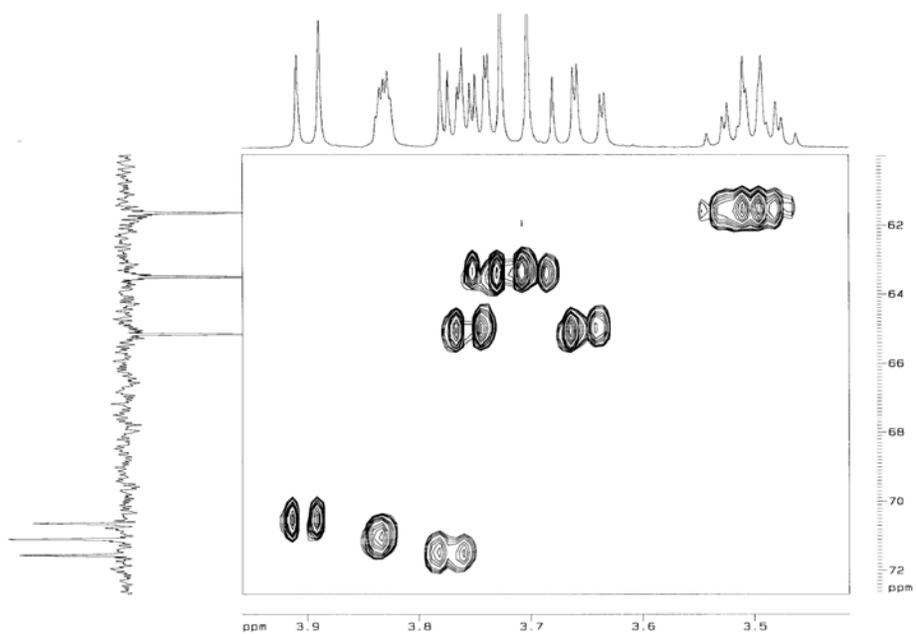
ESPECTRO 18. Ampliación del experimento HSQC en CD_3OD del compuesto 2



ESPECTRO 19. Experimento HMBC en CD_3OD del compuesto 2



ESPECTRO 20. Ampliación del experimento HMBC en CD₃OD del compuesto 2



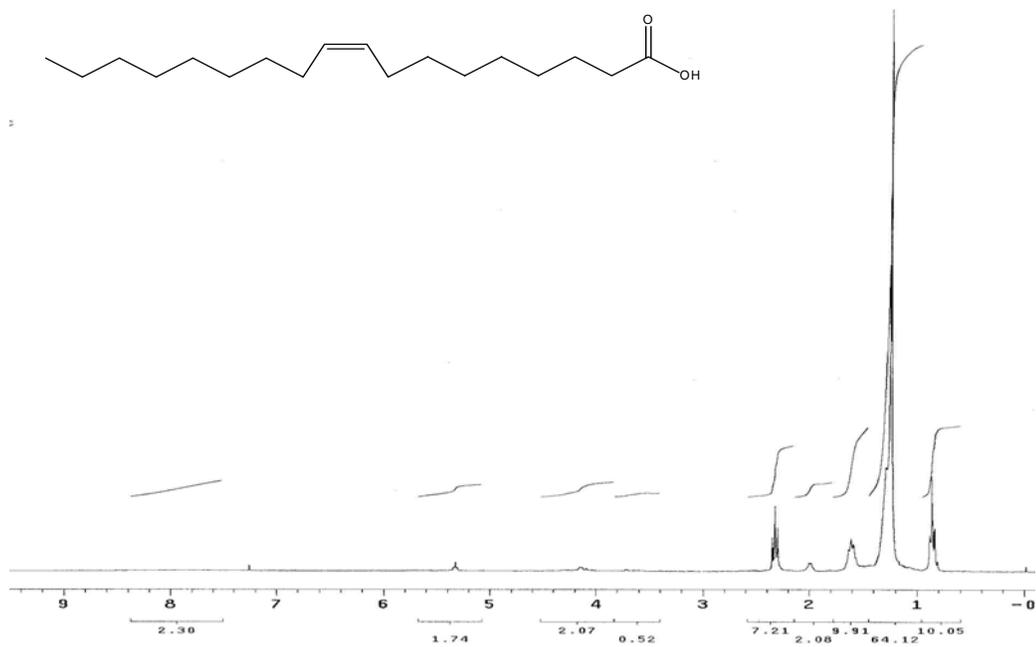
ESPECTRO 21. Ampliación del experimento HMBC en CD₃OD del compuesto 2

8.7.3 Ácido oleico

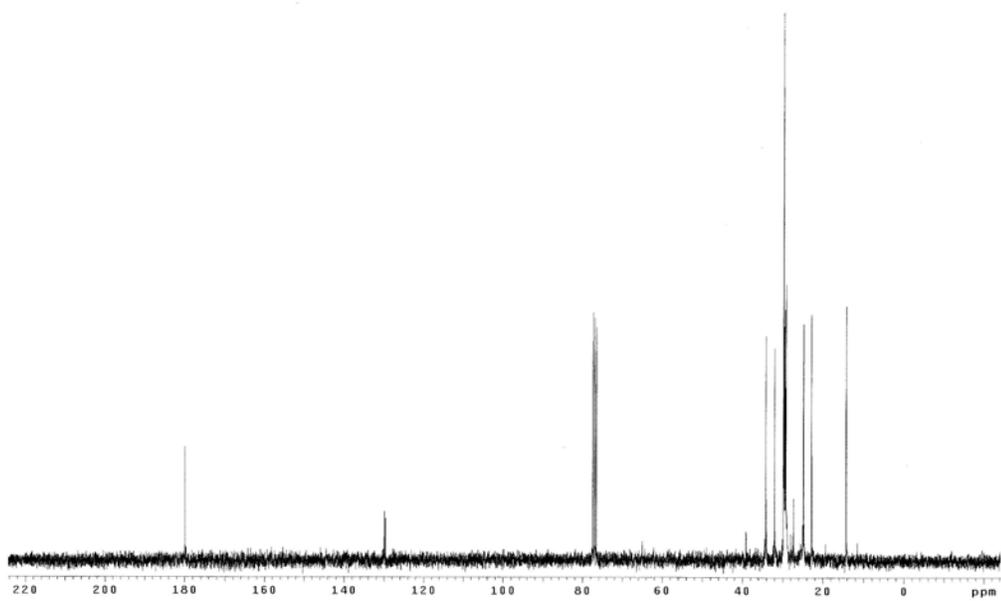
En el espectro de **RMN ¹H** (espectro 22) realizado en cloroformo deuterado, se observan a 5.34 ppm, una señal compleja correspondiente a los protones vinílicos de la molécula; a 2.32 ppm, una señal triple atribuible al metileno unido al grupo carboxílico del ácido; a 2.0 ppm, una señal que corresponde a los metilenos unidos a los carbonos vinílicos de la molécula y finalmente, a campo más bajo, aparecen las demás señales correspondientes a los demás metilenos de la molécula. Y en el espectro de **RMN ¹³C** (espectro 23) se aprecian dieciocho señales correspondientes a los carbonos presentes en la molécula; en la tabla 14 se pueden apreciar los desplazamientos químicos.

Tabla 14. Desplazamientos químicos (δ) en ppm del espectro de **RMN ¹³C** del ácido oleico.

C	δ	RMN ¹H
1	179.8	11.0
2	129.8	5.35
3	129.6	5.33
4	34.1	2.32
5	32.0	1.25
6 y 7	29.7	1.25
8	29.6	1.25
9 y 10	29.5	1.25
11, 12 y 13	29.1	1.25
14 y 15	27.2	2.0
16	24.7	1.61
17	22.7	1.25
18	14.2	0.86



ESPECTRO 22. Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ del ácido oleico



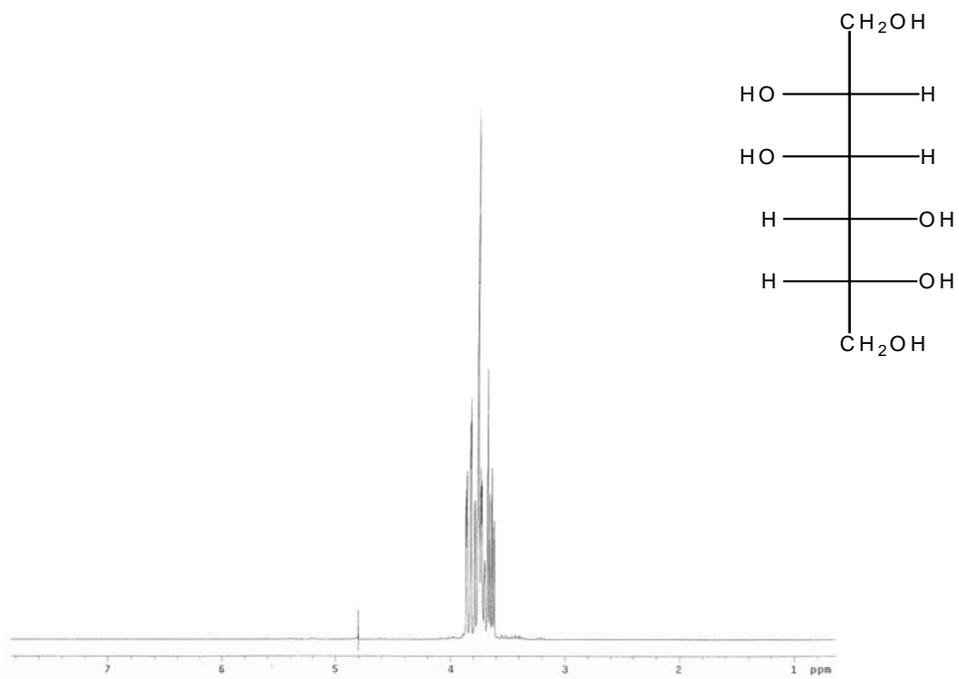
ESPECTRO 23. Espectro de RMN ¹³C en CDCl₃ del ácido oleico

8.7.4 Manitol

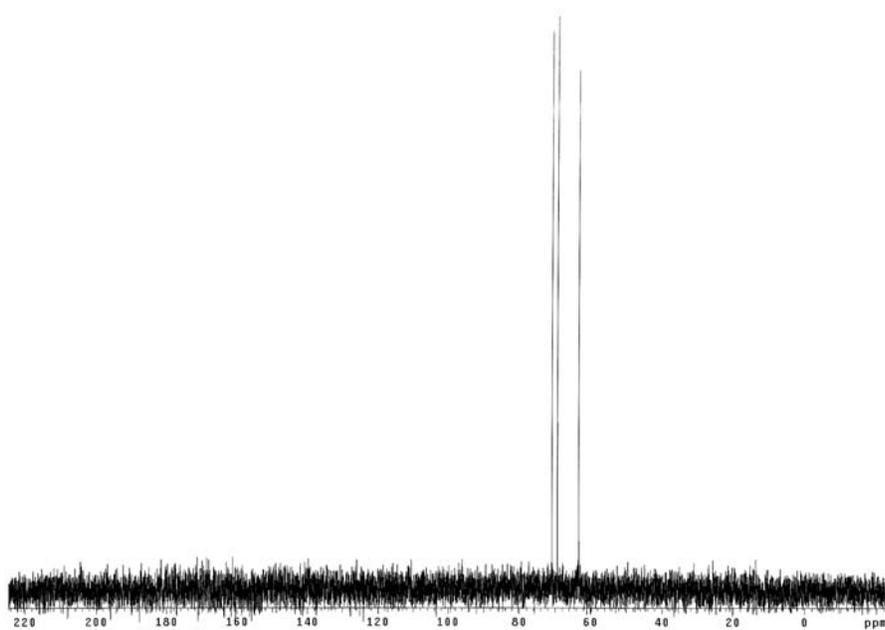
En el espectro de RMN de ^1H (espectro 24), realizado con óxido de deuterio, aparecen entre 3.9 y 3.5 ppm una serie de señales complejas de difícil interpretación, correspondientes a los protones de la molécula; no obstante, en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 25) debido a un elemento de simetría presente en el manitol, sólo aparecen tres señales simples a 70.9, 69.3 y 63.4 ppm que corresponden a los seis carbonos existentes en la estructura (Tabla 15).

Tabla 15. Desplazamientos químicos (δ) en ppm del espectro de RMN ^{13}C del manitol.

C	δ
1	63.4
2	69.3
3	70.9
4	70.9
5	69.3
6	63.4



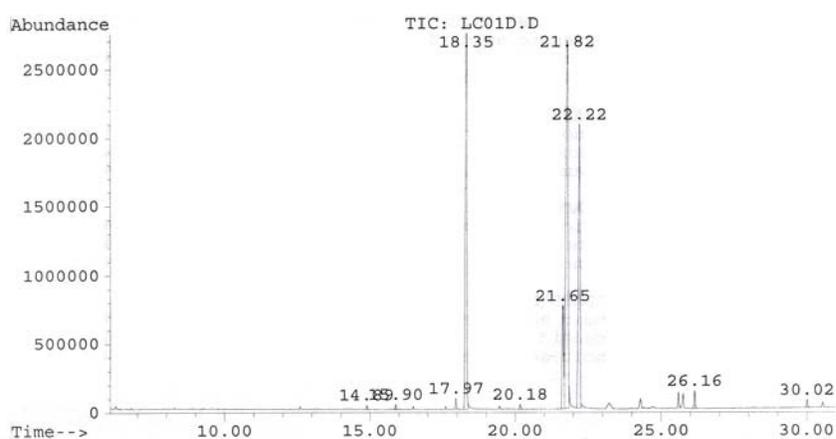
ESPECTRO 24. Espectro de RMN ^1H en CD_3OD del manitol



ESPECTRO 25. Espectro de RMN ^{13}C en CD_3OD del manitol

8.7.5 Ácido palmítico, linoleico, oleico y esteárico

En el espectro de GC-EM (espectro 26) realizado mediante una derivatización, se puede observar la presencia de 4 ácidos grasos distintos, de los cuales tres son los mayoritarios.



ESPECTRO 26. Espectro de GC-MS del ácido palmítico, linoleico, oleico y esteárico

Complementariamente en la tabla 16 se muestra el tipo de ácido graso y su porcentaje de abundancia.

Tabla 16. Ácidos grasos producidos por *Idriella* sp.

Ácido graso	Abundancia	Tr (min)
Ácido Linoleico	7.92 %	21.65
Ácido Esteárico	22.86 %	22.22
Ácido Palmítico	27.98 %	21.82
Ácido Oleico	38.71 %	18.35

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo comprobar que el hongo saprófito *Idriella* sp. produce, bajo ciertas condiciones de cultivo, metabolitos como el 5-hidroximetilfurfural el cual presenta actividad citotóxica e insecticida, así como el 1-n-Butil- β -D-fructopiránosido del cual se conoce que es un inhibidor alergénico, además de mostrar actividad antiestrés en ratones. Con los resultados obtenidos en este trabajo se pudo observar que dichos compuestos pueden utilizarse como antimetabolitos con propiedades antibacteriales en contra de especies de interés médico y agrícola, y cuyos perfiles de producción varían según sea el sistema de cultivo.

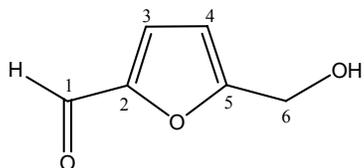
A continuación se detallan las conclusiones de toda la marcha analítica utilizada en el presente trabajo:

1. Las condiciones de inóculo y tiempo de incubación de cada una de las especies bacterianas utilizadas en las pruebas de susceptibilidad, se determinaron mediante cinéticas de crecimiento, donde se observó el tiempo necesario para alcanzar una $A_{600\text{ nm}} = 0.04$, la cual equivale a 1.5×10^8 UFC/ml de acuerdo con la escala de Macfarland y el inóculo se estandarizó a 4.5×10^6 UFC/30 μ l, siendo éste el volumen de trabajo en dichas pruebas.
2. La composición del medio de cultivo, las condiciones de operación y el sistema de fermentación modifican la producción de metabolitos con actividad antibacteriana. Es por ello que la selección del medio de cultivo y sistema de fermentación fue dependiente del efecto bacteriostático que presentara en contra de las especies bacterianas en estudio, concluyendo que sólo el medio de producción a una concentración de 0.5 X fue el único medio de cultivo que

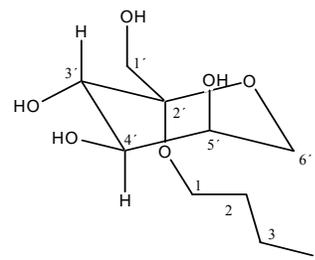
presentó actividad antibiótica en comparación con los otros cinco medios de cultivo ensayados.

3. Así, para el caldo de cultivo obtenido por FL se presentó actividad bacteriostática en contra de *Pseudomonas aeruginosa*, una especie bacteriana de interés clínico, y para *Pectobacterium carotovorum* y *Agrobacterium tumefaciens*, especies fitopatógenas. El caldo de cultivo obtenido por FES-PUF no presentó ningún efecto bacteriostático en contra de las especies de cultivo en estudio. Por otro lado, al comparar el efecto inhibitorio de los extractos metanólicos de la biomasa producida en ambas fermentaciones, se observaron resultados interesantes y más evidentes, al variar el tamaño del soporte en FES-PUF, mostrando porcentajes de inhibición en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, especies bacterianas de interés clínico, lo cuál abre la posibilidad de utilizar este sistema de producción para aislar compuestos específicamente antagónicos para estas dos bacterias. De esta manera, se tienen dos sistemas de fermentación en los cuales se presentan efecto bacteriostático frente a especies bacterianas de interés clínico y fitopatógeno, a partir del cultivo de *Idriella* sp.

4. De la fermentación líquida de *Idriella* sp. se lograron purificar e identificar 7 compuestos: 5-hidroximetilfurfural (1), 1-n-Butil-β-D-fructopiranosido (2), ácido oleico (3), manitol (4), ácido palmítico (5), ácido linoleico (6) y ácido esteárico (7), los primeros dos presentaron efectos bacteriostático y bactericida similares, en contra de *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovora*, *P. crhyssanthemi*, *Erwinia amylovora* y *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Contrastando con la actividad bacteriostática, el poder bactericida de ambos compuestos, sólo se presentó frente a *Xanthomonas axonopodis* y *Pectobacterium carotovorum*.



5-hidroximetilfurfural (1)



1-n-Butil-β-D-fructopiránosido (2)

Es importante destacar que éste es el primer reporte del aislamiento de 1-n-Butil-β-D-fructopiránosido a partir de un hongo, además de presentar actividad antibacteriana frente a especies fitopatógenas.

Un dato relevante del trabajo es que el 1-n-Butil-β-D-fructopiránosido es producido por *Idriella sp.* a partir del tercer día y continúa durante la mayor parte de la fermentación, mientras que el 5-hidroximetilfurfural, se produce a partir del quinto día y finaliza el octavo día de la FL de *Idriella sp.* Esto nos indica que cada compuesto es producido por diferentes procesos relacionados al crecimiento de *Idriella sp.* De esta manera, podemos mencionar que el 1-n-Butil-β-D-fructopiránosido puede estar más relacionado al crecimiento que el 5-hidroximetilfurfural, el cual está ligado al metabolismo secundario. Esta observación nos da la pauta para una posible manipulación sobre la fisiología de *Idriella sp.* para la producción específica de cualquiera de los dos compuestos.

10. CONTRIBUCIONES

- *Idriella* sp. es una fuente potencial de compuestos con efectos bacteriostáticos nunca antes reportados en este género, lo cual abre la posibilidad de utilizar este microorganismo en estrategias de biocontrol.
- *Idriella* sp. produjo el 1-n-Butil- β -D-fructopiránosido anteriormente aislado de plantas, de esta manera, *Idriella* sp. presenta ventajas en cuanto a su manipulación fisiológica para la obtención de mayores rendimientos de dicho compuesto.
- En el presente estudio se observó que modificando las condiciones de operación y el sistema de fermentación, se presentan diferentes efectos bacteriostáticos versátiles en contra de distintas especies bacterianas a partir de los extractos crudos del caldo de cultivo y biomasa producida por *Idriella* sp. lo cual abre la posibilidad de utilizar alguno de los dos sistemas de fermentación, para aislar compuestos antagónicos específicamente para un grupo de bacterias.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Halim, M.M., El-Sayed. 1992. Production of Penicillins and Cephalosporins by Fungi. Faculty of Pharmacy, Zagazig University, Zagazig Egypt. (Dilip K. A., Elander R. P. y Mukerji K.G.) Handbook of Applied Micology Fungal Biotechnology. Marcel Dekker. INC. Nueva York, Nueva York. 4(19): 517-518

Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, México, D. F. pp. 11-63.

Ayer, W.A., Racok, J.S. 1990. The metabolitos of *Talaromyces flavus*: part 1. Metabolites of the organic extracts. Canadian Journal of Chemistry 68: 2085-2094.

Balakrishnan, K., Pandey, A., 1996. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. Journal of scientific Industrial Research 55:365-372

Ball, C. 1987. Genetics in the development of Penicillium process. In *Antibiotics and Other Secondary Metabolites; Biosynthesis and Production*. FEMS Symp. (R. Hutter, T. Leisinger, J. Nuesch, and W. Wehrli, eds.). Academic press. Londres. 5:165-176.

Barrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-González, G., López, J. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. Biotechnology Letters 10(11): 793-798.

Beale, R.E., Pitt, D. 1995. The antifungal properties of *Minimedusa polyspora*. Micological Research 99:337-342.

Berry, D.R., Chmiel, A, Al Obaidi, Z. 1977. Citric acid production by *Aspergillus niger*. In: Smith JE, Patemon JA (eds) Genetics and physiology of *Aspergillus*. British Mycological Society Symp Ser Academic Press, Nueva York. 1: 405-426.

Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y., Hoogschagen, M., Heerikhuisen, M., Levin, A., van Driel, K., Schutyser, M., Dijksterhuis, J., Zhu Y., Weber, F., de Vos, W., Van den Hondel, K., Rinzema, A., Punt, P. 2002. *Aspergillus oryzae* in

solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. FEMS Yeast Research 2:245–248.

Bitancourt, A. A. 1957. O cancro citrico. Biológico 23, 101-11.

Bode H., Bethe B., Höfs R., Zeeck A. 2002. Bigg effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. Chemycal BioChemycal 3:619–627.

Boswell, P.G., Jacobs, H., Davidson, F.A., Gadd, G.M., Ritz, K. 2003. Growth and function of fungal mycelia in heterogeneous environments. Mathematical Biology 65(3): 447-477.

Bradbury, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International. Londres. pp. 332.

Bushell, M.E., Dunstan, G.L., Wilson, G.C. 1997. Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. Biotechnology Letters 19:849–52.

Carrero, J. J., Baro, L., Fonolla, J., González, S. M., Martínez, F. A., Castillo, R., Jiménez, R., Boza, J.J., López, E. 2004. Cardiovascular effects of milk enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia. Journal of Human Nutrition 20(6):521-527.

Chen, H.C., Wilde, F. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. Biotechnology and Bioengineering 37:591–5.

Chirino, M., Carriac, M., Ferrero, A.A., 2001. Actividad insecticida de extractos crudos de *Shinus Molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Bol. San. Veg. Plagas 27:305-314.

Cole J.R., Schweikert, M. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, Vol. II. Academic Press, Londres. 819 pp.

Cole J.R., Jarvis, B.B., Schweikert, M. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, Vol. II. Academic Press, Londres. 672 pp.

Cole, J.R., Schweikert, M. 2003. Handbook of secondary fungal metabolites, Vol. I. Academic Press, Londres. 1006 pp.

Cook, S.L., Konrad, S.D., Goh, Y.K., French, M.A. 1999. The effect of palmitic acid on lipoprotein cholesterol levels and endogenous cholesterol synthesis in hyperlipidemic subjects. Universidad de Alberta, Department of Agriculture Food & Nutrition SCI. 34(2):121-124.

Dax, S. L. 1997. Antibacterial Chemotherapeutic Agents. First edition, Chapman & Hall. Londres.

DeCleene, M., Deley, J. 1976. The host range of crown gall. Botanical Review 42:389-466.

Dilip, K.A., Elander, R.P., Mukerji, K.G. 1992. Handbook of Applied Micology Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, INC. Nueva York, Nueva York. 4:1-2.

DiPietro, A., Cut-Rella, M., Pachlatko, J.P. Schwinn, F.J. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a casual agent of damping-off. Phytopathology 82:131-135.

Domsch, K.H., Gams, W. Anderson, T.H. 1980. Compedium of Soil Fungi. Academic Press: Londres y Nueva York.

Dubois, M.K., Gilles, K.A., Hamilton, R.A., Rebers, R.A., Smith, F. 1956. Colorimeter method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350.

Elander, R.P., Lowe, D.A. 1992. Fungal Biotechnology: An Overview. Industrial Division, Bristol-Myers Squibb Company, Syracuse, New York. (Dilip K. A., Elander R. P. y Mukerji K.G.) Handbook of Applied Micology Fungal Biotechnology, Marcel Dekker, INC. Nueva York, Nueva York. 4(1): 1-2.

Espinoza, C. 2000. Estudio químico del hongo fitopatógeno *Fusarium semitectum*. Tesis de licenciatura, Xalapa, Ver., Facultad de Química Farmacéutica Biológica. pp. 19-21.

Fravel, D.R., Roberts, D.P. 1991. *In situ* evidence for the role of glucose oxidase in the biocontrol of *Verticillium* wilt by *Talaromyces flavus*. Biocontrol Science and Technology 1:91-99.

Gamazo, C., López-Goñi, Y., Díaz, R., 2005. Manual práctico de microbiología. Tercera edición. Elsevier, España pp. 231.

Great Britain Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1969. Fireblight of apple and pear. Londres: H.M.S.O. (Ministry of agriculture, Fisheries and Food Adv. Ref. Publ. 571.

Hadacek, F., Greger, H. 2000. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochemical Analysis* 11:137-147.

Harris, A.D., Smith, D., Johnson, J.A., Bradham, D.D., Roghmann, M.C. 2002. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 34:340-345.

Harwood, J.L., Russell, N.J. 1984. Lipids in plants and microbes. George Allen & Unwin. Londres. pp. 162.

Hasse, C.H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. *Journal of Agriculture Research* 4: 97-100.

Hassel, C.A., Mensing, E.A., Gallaher, D.D. 1997. Dietary stearic acid reduces plasma and hepatic cholesterol concentrations without increasing bile acid excretion in cholesterol-fed hamsters. *Journal Nutrition* 6(1):1148-1155.

Henzler, H.J., Schedel, M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Engineering* 7:123-131.

Hesseltine, C.W. 1982. Solid state fermentations. *Biotechnology Bioengineering* 14:517-532.

Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc., Japan, 1982. Novel allergy inhibitors. Coden: JKXXAF JP 57088121. Jpn. Kokai Tokio Koho, pp. 6.

Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G.E. Kubicek, C.P. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. *Enzymes, biological control and commercial applications* 2:173-184.

Imaizumi, K., Abe, K., Kuroiwa, C., Sugano, M. 1993. Fat containing stearic acid increases fecal neutral steroid excretion and catabolism of low density

lipoproteins without affecting plasma cholesterol concentration in hamsters fed a cholesterol-containing diet. *Journal of Nutrition* 1(10):1693-1702.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2000. Buenas prácticas agrícolas en frutas y hortalizas. Cuernavaca, pp. 185.

Jadubansa, P., Lethbridge, G., Bushell, M.E. 1994. Physiology of production of viable biomass and spore inoculum for the biocontrol agent *Idriella (Microdochium) bolleyi*. *Enzyme Microbiology Technology* 16: 24-28.

Kelly, F., Sinclair, A., Mann, N., Turner, A., Abedin, L., Li, D. 2001. A stearic acid-rich diet improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *European Journal of Clinical Nutrition* 55(2): 88-96.

Kennedy, B.W., Alcorn, S.M. 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64:674-676.

Khondar, P., Mukhlesur, R., Islam, A. 2005. Cytotoxic activities of ethyl acetate extract and a metabolite from a *Monocillium* species. *Phytotherapy Research* 19:816-817.

Kim, K.K., Fravel, D.R., Papavizas, G.C. 1990. Production, purification and properties of glucose oxidase from the biocontrol fungus *Talaromyces flavus*. *Canadian Journal of Microbiology* 36:199-205.

Kirk, J.J., Deacon, J.W. 1987 b. Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinosa* on cereal roots. *Plant and Soil* 98:231-237.

Kirk, J.J., Deacon, J.W. 1987 a. Invasion of naturally senescing root cortices of cereal and grass seedlings by *Microdochium bolleyi*, *Plant and Soil* 98:239-246.

Kohno, J., Asai, Y., Nishio, M., Sakura, M., Kawano, K., Hiramatsu, H., Kameda, N., Kishi, N., Okuda, T. Komatsubara, S. 1999. TMC-171 A, B and C TMC-154, Novel Poliketide Antibiotics produced by *Gliocladium* sp. TC 1304 and TC 1282. *The journal of antibiotics* 52(2):1114-1123.

Koneman, E., Allen S., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W. 1999. Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos. En *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 764-805.

- Lascaris, D., Deacon J.W. 1994. In vitro growth and microcycle conidiation of *Idriella bolleyi*, a biocontrol agent of cereal pathogens. *Mycological Research* 98(10):1200-1206.
- Lascaris, D., Deacon, J.W. 1991a. Relationship between root cortical senescence and growth of wheat as influenced by mineral nutrition, *Idriella bolleyi* (sprague) Von Arx and pruning of leaves. *New Phytologist* 118:391-396.
- Lascaris, D. Deacon, J.W. 1991b. Colonization of wheat roots from seed-applied spores of *Idriella (Microdochium) bolleyi*: a biocontrol agent of take-all. *Biocontrol Science and Technology* 1:229-240.
- Lee, H.A. 1918. Further data on susceptibility of rutaceous plants to citrus canker. *Journal of Agriculture Research* 15:661-5.
- León-Oyola, J.F. 2005. Química y síntesis de los principios activos aislados de hongos superiores y sus posibles aplicaciones farmacológicas. Serie de tesis digitales. Servicio de publicaciones, Universidad de la Laguna, Tenerife, España. pp. 283.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.B. 1999. *Biología de los Microorganismos*, octava edición, Prentice Hall Iberia, Madrid. pp. 986.
- Martin, F., Ramstedt, M., Söderhäll, K., Canet, D. 1988. Carbohydrate and amino acid metabolism in the ectomycorrhizal ascomycete *Sphaerospora brunnea* during glucose utilization. *Plant Physiology* 86:935-940.
- Martin, S.M., Bushell, M.E. 1996. Effect of hyphal morphology on bioreactor performance of antibiotic-producing *Saccharopolyspora erythraea* cultures. *Microbiology* 42:1783-8.
- McManus, P.S., Jones, A.L. 1994. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84:627-33
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G. W., Jones, A. L. 2002. Antibiotics use in plant agriculture. *Annual Review Phytopathology* 40:443-65.
- Mendoza, G. 2002. Evaluación antibiótica de extractos metabólicos de hongos microscópicos. (Tesis de licenciatura). Universidad Veracruzana.

Miyazawa, M., Anzai, J., Fujioka, J., Isikawa, Y. 2003. Insecticidal compounds against *Drosophila melanogaster* from *Cornus officinalis* sieb. et zucc. Natural Product Research 17(5):337-339.

Moreno, J. 2001. Uso actual de las penicilinas clásicas. Director Médico. Antibióticos Farma, S.A.

Morris, R.A.C., Ewing, D., Whipps, J.M. Coley-Smith, J.R. 1995. Antifungal hydroxymethyl-phenols from the mycoparasite *Verticillium biguttatum*. Phytochemistry 39: 1043-1048.

Moss, M.O. 1984. The mycelial habit and secondary metabolite production. In: Jennings DH, Rayner ADM, eds. The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984.

Murado, M.A. González, M.P., Torrado, A., Pastrana, L.M. 1997. Amylase production by solid-state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. Process Biochemistry 32:35-42.

Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M.V., Christensen, B.E., Kjærulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M., Kristensen, H.H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. Nature 437:975-980.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 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, pp. 1994.

Namekata, T., Oliveira, A.R. 1972. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime, in Proceedings of the Third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (ed. H.P. Maas Gesteranus), Centre for Agricultural Publication and Documentation, Wageningen, The Netherlands, pp. 151-2.

Norelli, J.L., Gilpatrick, J.D. 1982. Techniques for screening chemicals for fire blight control. Plant Disease 66:1162-65

- Orietta, F., Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 62:96-100.
- Ou, S.H. 1984. Rice diseases, 2nd edition. Slough: Commonwealth Agriculture Bureaux.
- Papagianni, M., Nokes, S.E., Filer, K. 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. Food Technology and Biotechnology 39: 319–326.
- Parés, R., Juárez, A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverte, S.A., Barcelona, España. pp. 380.
- Pedras, M.S.C., Ahiahonu, P.W.K. 2004. Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus. Journal of Chemical Ecology 30 (11): 2163-2179.
- Penyalver, R., Vicedo, B., López, M. M. 2000. Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. European Journal of Plant Pathology 106:801-810.
- Pérez, E., Gepp, V. 2005. Bacterias fitopatógenas. Guía de estudio. Curso de Fitopatología. Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. Uruguay. Pp. 6.
- Perombelon, M.C.M., Kelman, A. 1980. Ecology of soft rot erwinias. Annual Review Phytopathology 18:361-387.
- Pickup, K.M., Nolan, R.D., Bushell, M.E. 1993. A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotic screens. Journal Fermentation and Bioengineering 76:89–93.
- Queener, S., Swartz, R. 1979. Penicillins, biosynthetic and semisynthetic. In *Economic Microbiology. Secondary Products of Metabolism* (A. H. Rose, eds.), Academic Press, Londres. 3:35-122.

- Raimbault, M. 1998. General and Microbiological aspects of solid state fermentation. *Process Biochemistry*. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3):1-15.
- Richards, B.N. 1987. *The microbiology of terrestrial ecosystems*. Ed. Logman. Inglaterra. 399 pp.
- Robinson T., Singh, D., Nigam, P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolites production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55:284–289.
- Rodrigues, G.S., Garza-López, J.G., Stapleton, J.J., Civerolo, E.L. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. *Plant Disease* 69:808-10.
- Rollins, M.J., Jensen, S.E., Westlake, D.W.S. 1988. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 3:357–64.
- Rollins, M.J., Jensen, S.E., Wolfe, S., Westlake, D.W.S. 1990. Oxygen derepresses deacetoxycephalosporin-c synthase and increases the conversion of Penicillin-N to Cephameycin-C in *Streptomyces- clavuligerus*. *Enzyme Microbiology Technology* 12: 40–5.
- Rosamond, J., Allsop, A., 2000. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* 287:1973-1976.
- Rosengaus, R.B., Lefebvre, M.L., Traniello, J.F.A. 2000. Inhibition of fungal spore germination by *Nasutitermes*: Evidence from a possible antiseptic role of soldier defensive secretions. *Journal of chemical ecology* 26(1):21-28.
- Salt, G.A. 1977. A survey of fungi cereal roots at Rothamsted, Woburn and Saxmundham, 1968-1975. Rothamsted Experimental Station, Report for 1976, Part 2, 153-168.
- Shaadd, N.W. J.B. Jones, W. Chun. 2001. *Plant pathogenic bacteria*. 3ra. Edición. Ed. APS PRESS. Minnesota. 373 p.
- Schoultie, C.L., Civerolo, E.L., Millar, J.W. 1987. Citrus canker in Florida. *Plant Disease*, 71:388-95.
- Scorza, T., Martucci, A., Torrealba de Ron, A.T. 1999. Derivados del aceite de

palma con concentraciones diferentes de ácido palmítico y antioxidantes. Efectos sobre lípidos plasmáticos y agregación plaquetaria. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 49(1):20-25.

Sigee, D. 2005. Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects. Cambridge University Press. pp. 1, 2, 4, 9-11.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek C.P., Harman G. E. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. 1:139-191

Spectral Basedata for Organic Compounds, SDBS. National Institute of Advance Industrial Science and Technology (AIST). Japón.

www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html. Consultado: junio, 2006.

Sprague, R. 1948. *Gloesporium* decay in Gramineae. Phytopathology 38:131-136.

Sugie, Y., Iria, H., Inagaki, T., Ishiguro, M., Kim, Y., Sakakibara, T., Sakemi, S., Sugiera, A., Suzuki, Y., Brennan, L., Duignan, J., Hsiung, H., Sutcliffe, J., Kojima, N. 2001. A new antibiotic CJ-17665 from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of antibiotics* 54 (11): 911-916.

Thibault, J., Pouliot, K., Agosin, E., Pérez-Correa, R. 2000. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and k_La in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 36: 9–18.

Trigos, A., Zambrano, N. 1992. *Educación Química* 3(4):290-297.

Trigos, A., Cancela, G. 1995. Estudio químico del hongo *Russula olivacea*. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. pp. 35.

Trigos, A., Reyna, S., Cervantes, L., 1995a. Three diketopiperazines from the cultivated fungus *Fusarium oxysporum*, *Natural Product Letters* 6:241-246.

Trigos, A., Reyna, S., Gutiérrez, L., Sánchez, M., 1996. Diketopiperazines from cultures of the fungus *Colletotrichum gloesporoides* *Natural Product Letters* 8:199-205.

Trigos, A., Reyna, S., Galindo, G., Ramos, J., 1997. Diketopiperazines from cultures of *Pestalotia palmarum*. *Natural Product Letters* 11:13-16.

- Trigos, A., Espinoza, C., Tovar, L., Guzmán, O., Cervantes, L. 2001. A fluorescent sterol from *Fusarium semitectum*. *Micología Aplicada Internacional* 13(2):93-96.
- Trigos, A., Mendoza, G., Luna, M., Heredia, G., Árias, R.M., 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología* 20:89-92.
- Turner, W.B., Aldridge, D.C. 1971. *Fungal Metabolites I*. Nueva York: Academic Press; Nueva York. Pp. 225-226
- Turner, W.B., D.C. Aldridge. 1983. *Fungal Metabolites II*. Nueva York: Academic Press, Nueva York. Pp. 23.
- Van der Zwet, T., Keil, H.K. 1979. Fireblight: A bacterial disease of rosaceous plants. *Agriculture Handbook 510*. Washington D.C.: U.S.D.A. Science and Education Administration.
- Vandamme, E.J., Leyman, D., DeVisscher, P., DeBuyser, D., Vansteenkiste, G. 1981. Effect of aeration and pH on gramicidin S production by *Bacillus brevis*. *Journal Chemistry Technology Biotechnology* 31:247-257.
- Vining, L.C. 1990. Functions of secondary metabolitos. *Annual Review Microbiology* 44:395-427.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S.J., Díaz-Godínez, G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 3643: 1–11.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. 2006. Why solid-state fermentation seems to be resutant to catabolite repression?. *Food Technology Biotechnology* 44(3): 397-406.
- Virgilio, A., Marcelli, E., Agrimino, A. 1964. Aeration-agitation studies on the rifamycin fermentation. *Biotechnology and Bioenginnering* 6:271– 83.
- Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Japan, 1984. Fructose derivates as stress inhibitors. Coden: JKXXAF JP 59163321. Japón, Kokai Tokkyo Koho. pp. 5.

- Waller, J.M. 1979. Observations on *Pythium* root of wheat and barley. Plant pathology 28:17-24.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, morphologies of cultured fungi and key to species. Second edition, CRC Press. Florida. pp. 1-3.
- Weber, C.H. 2005. Potencial benefits of linoleic acid consumption in human health. Journal of Medicinal Food 7(2):56-67.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.
- Wilson, M., Backman, P.A. 1998. Biological control of plant pathogens. Handbook of Pest Management. J. R. Ruberson, ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. pp. 309-335.
- www.ars-grin.gov. Consultado: junio, 2006.
- Yongxin, Z., Dakui, L., Linzhe, L. 1990. 1-n-Butyl- β -D-fructopyranoside from *Liriope spicata* var. *prolifera*. Phytochemical Notes 198.
- Yu, S., Derr, J., Etherton, T. D., Kris-Etherton, P. M. 1995. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypcholesterolemic. American Journal of Clinical Nutrition 61(5):1129-1139.
- Zahn J., Higgs R., Hilton M. 2001. Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from actinomycetes. Applied and Environmental Microbiology 67:377-386.
- Zhang, C.H., Xu, X.Z., Li, C. 1996. Fructosides from *Cynomorium Songaricum*. Phytochemistry 41(3): 975-976.
- Zhu, Y., Knol, W., Smits, J.P., Bol, J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. Biotechnology 16:643-648.
- Zhu, Y., Knol, W., Smits, J.P., Bol, J. 1996. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. Enzyme Microbiology and Technology 18:108-112.

Zhu, Y., Ling, D., Liu, L., 1991. 1-n-Butyl- β -D-fructopyranoside from *Liriope spicata* var. *prolifera*. *Planta Medica*. 57: 198.

Zwan, J.H. 2004. Cardiovascular disease and cancer, properties of oleic acid as a factor in human health. *Journal of Medicinal Food* 3(5):125-136.

A-1. ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL CALDO DE CULTIVO DE *Idriella* sp.

A-1.1 Introducción

En la naturaleza existen más de 40,000 especies de hongos, de los cuales aproximadamente 8,000 son fitopatógenos y causan 80,000 enfermedades en diversos cultivos (Agrios, 1998; Romero, 1998). Actualmente, el control de enfermedades se basa en la aplicación de productos químicos, generando a corto plazo resistencia de los patógenos a tales productos, por lo que existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas que coadyuven a implementar un manejo integrado de plagas (Zavaleta, 1999).

A-1.2 Efecto de los caldos de cultivo de 5 hongos potenciales sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos

El presente estudio consistió en evaluar la actividad antifúngica *in vitro*, mediante técnicas de microdilución, (Trigos *et al.*, 2005; 2006) a partir de cinco caldos de cultivo de hongos potenciales como *Ceratocystis adiposa*, *Curvularia sp.*, *Idriella sp.*, *Phytophthora drechleri* y *Rhizopus sp.* en contra de diez hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Determinando en primer lugar la actividad fungistática, seguida de la actividad fungicida y utilizando dos fungicidas comerciales como controles (benlate y captan). La actividad fungistática, se definió como la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico y fue determinada mediante la medición de absorbancia de la microplaca a 600 nm y la actividad fungicida, es la capacidad de ocasionar la muerte celular tanto de las esporas como de micelio de los hongos fitopatógenos en estudio.

Para comparar el potencial de los extractos crudos de nuestras cepas, se utilizaron dos fungicidas comerciales como el Benlate (PASSA Agrobiológicos): i.a. Benomilo: Metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato y Captan ultra (TomenAgro Mexicana): i.a. Cis-N-(triclorometil) tio)-4-ciclohexen-1,2-dicarboximina a una concentración de 1.25 mg/mL. Estos dos fungicidas tienen dos mecanismos de inhibición diferentes: El Benlate es sistémico y el Captan actúa por contacto.

Los cinco caldos de cultivo ensayados fueron capaces de inhibir el crecimiento fúngico en al menos uno de los organismos prueba (Tabla 17). Después del análisis estadístico de los promedios de las actividades antifúngicas, todos los caldos de cultivo mostraron resultados favorables en comparación con los porcentajes de inhibición obtenidos con el fungicida comercial Benlate (Tabla 17). Sólo el caldo de cultivo de *Rhizopus sp.* presentó porcentajes de inhibición similares a los de Captan. Estas propiedades pueden ser justificadas por la presencia de sustancias bioactivas reportadas anteriormente como el tirosol,

geraniol y citronelol aislados de especies de *Ceratocystis*; la curvularina y el ácido curvúlico obtenido de especies de *Curvularia*; o la rhizoxina y la fumigaclavina B de especies de *Rhizopus*.

Tabla 17. Actividad Fungistática de caldos de cultivo de 5 hongos potenciales en contra de diversos hongos fitopatógenos, utilizando dos fungicidas comerciales como control.

Organismos prueba	Actividad fungistática de caldos de cultivo (Porcentaje de inhibición)					Fungicidas	
	<i>Ceratocystis</i> <i>adiposa</i>	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Idriella</i> spp.	<i>Phytophthora</i> <i>drechsleri</i>	<i>Rhizopus</i> spp.	Benlate	Captan
<i>Alternaria citri</i>	89 ± 0.9	40 ± 0.6	46 ± 0.1	60 ± 0.8	87 ± 0.0	23	93
<i>Alternaria tenuis</i>	20 ± 0.1	68 ± 0.4	43 ± 0.5	87 ± 0.3	86 ± 0.7	55	90
<i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i>	12 ± 1.7	72 ± 0.9	58 ± 0.6	60 ± 0.2	80 ± 0.4	24	75
<i>Curvularia lunata</i> (aislada de maíz)	63 ± 1.0	67 ± 0.5	75 ± 0.2	73 ± 0.3	96 ± 0.2	93	100
<i>Curvularia lunata</i> (aislada de pasto)	51 ± 0.2	59 ± 0.3	77 ± 0.0	68 ± 0.3	95 ± 0.5	42	100
<i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	66 ± 0.6	53 ± 0.3	49 ± 0.6	75 ± 0.2	93 ± 0.4	90	95
<i>Geotrichum</i> spp.	59 ± 0.8	61 ± 0.8	69 ± 1.0	75 ± 0.9	99 ± 0.3	58	98

<i>Helminthosporium turcicum</i>	39 ± 0.1	59 ± 0.6	47 ± 0.5	58 ± 1.0	92 ± 0.1	88	100
<i>Pestalotia</i> spp.	84 ± 0.5	78 ± 0.7	64 ± 0.5	80 ± 0.4	96 ± 0.4	75	100
<i>Ulocladium</i> spp.	88 ± 0.9	56 ± 0.5	53 ± 0.9	71 ± 0.5	86 ± 0.3	86	100
Promedio	57.1 ^b	61.3 ^b	58.1 ^b	70.7 ^c	91. ^{a,c}	63.4 ^b	95.1 ^a
Desv. estándar	27.1	10.7	12.5	9.4	6.0	27	7.9

^{a,b,c} Las medias con la misma letra no significativamente diferentes, basado sobre una prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

Por otro lado, la actividad fungicida de los caldos de cultivo se determinaron a partir de una dilución 1:8 proveniente de la determinación de la actividad fungistática, (Tabla 18) y después de 96 h de incubación, se obtuvieron resultados que contrastan con lo observado en la actividad fungistática. El caldo de cultivo de *Idriella* sp. mostró actividad fungicida en contra de todos los organismos prueba. De hecho, el caldo de cultivo de *Idriella* sp. fué el único que mostró perfiles fungicidas similares al fungicida comercial Captan. De igual manera *Rhizopus* sp. presenta actividad fungicida en contra de la todas las cepas, excepto en contra de *Fusarium moniliforme* y *Geotrichium* sp.

Tabla 18. Actividad Fungicida (+) de caldos de cultivo en contra de hongos fitopatógenos, utilizando dos fungicidas comerciales como control.

Organismos prueba	Actividad Fungicida					Fungicidas	
	<i>Ceratocystis adiposa</i>	<i>Curvularia spp.</i>	<i>Idriella spp.</i>	<i>Phytophthora drieschleri</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	Benlate	Captan
<i>Alternaria citri</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>Alternaria tenuis</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	-	+	-	+	+	+

<i>Curvularia lunata</i> (aislada de maíz)	-	+	+	+	+	-	+
<i>Curvularia lunata</i> (aislada de pasto)	-	-	+	-	+	-	+
<i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>Geotrichum</i> spp.	-	-	+	-	-	-	+
<i>Helminthosporium</i> <i>turcicum</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>Pestalotia</i> spp.	-	-	+	+	+	-	+
<i>Ulocladium</i> spp.	-	-	+	-	+	-	+

Estos hallazgos sugieren que estas cepas pueden ser considerados como una excelente fuente de obtención de compuestos con actividad antifúngica. En este trabajo se describe por primera vez la actividad fungistática y fungicida de los caldos de cultivo de *Rhizopus* sp. e *Idriella* sp. en contra de una serie de hongos fitopatógenos. Lo anterior sugiere que los caldos de cultivo concentrados de estos hongos, podrían ser utilizados en el combate de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos mediante la aplicación directa sobre plantas enfermas, además de abrir la posibilidad de usar el antagonismo natural que presentan estas cepas en la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos.

A-2. MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS COMERCIALES

Agar PDA, marca Bioxon.

Infusion de papa (sólidos)	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g

Disolver 39 g en un litro de agua destilada, esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Agar extracto de malta, marca BBL.

Maltosa	12.75 g
Dextrina	2.75 g
Glicerol	2.35 g
Concentrado pancreático	0.78 g
Agar	15.0 g

Disolver 33.6 g en un litro de agua destilada, esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Extracto de malta al 2%, marca Bioxon.

Se disuelven 20 g en un litro de agua destilada, esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Agar Müller Hinton, Marca Fluka.

Infusion de carne (sólidos)	4.0 g
Almidón	1.5 g
Hidrolizado de caseína	17.5 g
Agar	15.0 g

Disolver 38 g en un litro de agua destilada, esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Caldo Müller Hinton, Marca Fluka.

Infusion de carne (sólidos) 4.0 g

Almidón 1.5 g

Hidrolizado de caseína 17.5 g

Disolver 23 g en un litro de agua destilada, esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

MEDIOS SINTÉTICOS

Medio PW

➤ Medio PM1 500 ml

➤ Medio Czapek-KCl 0.7 M 500 ml

PMI

Peptona de caseína 5 g

Lactosa 5 g

NaCl 4 g

Sólidos de maceración de maíz 1 g

KH₂PO₄ 60 mg

MgSO₄.7H₂O 50 mg

FeCl₃.6H₂O 3 mg

CuSO₄.5H₂O 1 mg

Se añade agua destilada hasta 1L, se ajusta el pH a 5.5 con H₃PO₄

Medio Czapek-KCl 0.7M

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
KCl	52.2 g

Se añade agua hasta 1L, se mezclan 500 ml de cada uno de los dos medios y se esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

Medio PMY

Glucosa	40 g
NaNO ₃	3 g
Extracto de Levadura	2 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g

Se añade agua destilada hasta 1L, se ajusta el pH a 6.0 y se esterilizar por autoclaveado a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

*Para un litro de medio sólido agregar 20 g/l de agar bacteriológico.

Medio Mínimo

Salt mix. Alacking MgSO ₄ (20X stock)	50 ml
MgSO ₄ solution (0.4M, 200X stock)	5 ml
Glucosa	10 g
Trace element stock solution	1 ml

Para preparar un litro de medio, adicionar los siguientes componentes a 950 ml de agua destilada. Para un litro de medio sólido agregue 15 g/l de agar bacteriológico.

Medio de Producción 0.5X

Sacarosa	40 g
Harina de maíz	25 g
Extracto de levadura	0.5 g

Se añade agua hasta 1L, mezclar, calentar con agitación frecuente y hervir durante 5 minutos (Mendoza y Trigos, 2002).

Medio MS

D-glucosa 35 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, K_2HPO_4 3 g/l, NaNO_3 2.38 g/l o NH_4Cl 1.5 g/l más 10 ml de una solución amortiguadora pH 7.0

Solución amortiguadora:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/l, CuCl_2 0.00053 g/l, CoCl_2 0.00055 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0138 g/l, ZnCl_2 0.0104 g/l, MnCl_2 0.0062 g/l, Na_2MoO_4 0.0003 g/l.

La glucosa, sales y solución amortiguadora fueron esterilizadas por separado D-glucosa y la solución amortiguadora por filtración a través de un filtro capsule Sartobran, de tamaño de poro 0.22 μm Sartorius) y después fueron mezclados asépticamente.

(J.F. McDermontt, G. Lethbridge,* y M. E. Bushell)

Iztapalapa, D.F. a 29 de Abril de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A
PARTIR DEL HONGO
MICROSCÓPICO *Idriella* sp.**

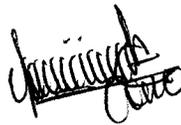
Que presentó
CÉSAR ESPINOZA RAMÍREZ

Comité Tutorial:

Director: **Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ**
Director: **Dr. ÁNGEL RAFAEL TRIGOS LANDA**
Asesor: **Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

Jurado:

Presidente: Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL



Secretario: Dra. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO



Vocal: Dra. MIRNA SUAREZ QUIROZ



Vocal: Dr. MAURICIO LUNA RODRIGUEZ

