

INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	8
Objetivos	14
Fundamento Teórico	15
1.1. Los hongos	15
1.2. Hongos endófitos	18
1.3. Cultivo de hongos	22
1.4. Antagonismo microbiano	24
1.4.1. Mecanismo de acción	25
a. Antibiosis	25
b. Competencia	26
c. Interacción directa con el patógeno	27
d. Inducción de resistencia	28
1.5. Fermentación microbiana	29
1.5.1. Requerimientos fisiológicos del crecimiento microbiano	29
1.5.2. Nutrientes requeridos para el crecimiento de microorganismos	32
1.5.3. Etapas para la producción de un producto microbiano	33

II. MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1. Cultivo de hongos	40
2.2. Mantenimiento de cepas	40
2.3. Cultivo doble	41
2.4. Obtención de metabolitos bioactivos	45
2.4.1. Activación y enriquecimiento de cada uno de los microorganismos	45
2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana	45
2.5.1. Preparación de la suspensión inóculo	46
2.5.2. Siembra de bacterias	46
2.5.3. Preparación e incubación de las cajas Petri	47
2.5.4. Determinación de la actividad antifúngica	47
III. RESULTADOS	49
3.1. Hongos ensayados en las pruebas de bioactividad	49
3.2. Antagonismo <i>in vitro</i> entre hongos endófitos y <i>Aspergillus niger</i> por el método de cultivo doble	50
3.3. Antagonismo <i>in vitro</i> entre hongos endófitos y <i>Microsporum canis</i> por el método de cultivo doble	52
3.4. Antagonismo <i>in vitro</i> entre hongos endófitos y bacterias patógenas por el método de cultivo doble	54

3.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por el método de difusión en caja Petri	55
IV. DISCUSIÓN	56
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
VI. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

El presente trabajo consistió en evaluar la actividad antimicrobiana de nueve cepas de hongos endófitos (*Epicoccum sp.*, *Stilbacea*, *Phoma sp.*, *Nigrospora sp.*, *Alternaria sp.* (1), *Alternaria sp.* (2), *Micelia sterilia* (1), *Micelia sterilia* (2), *Micelia sterilia* (3)), aislados de cuatro plantas medicinales (*Piper barbatum*, *Borreria laevis*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis latifolia*) frente a cepas de microorganismos patógenos causantes de muchas enfermedades en humanos.

Se empleo para ello la técnica de enfrentamiento dual para determinar el grado de antagonismo con cada una de las cepas elegidas productoras de sustancias antimicrobianas frente a los patógenos antes mencionados, dando como resultado que el hongo endófito *Nigrospora sp.* mostró el mayor porcentaje de inhibición frente al fitopatógeno *Aspergillus niger*, mientras que en los resultados obtenidos frente al patógeno *Microsporun canis*, todas las cepas endófitas ensayadas mostraron actividad antagónica; por otro lado, en las pruebas dirigidas frente a bacterias patógenas y la levadura *Candida albicans*, se pudo notar la existencia de inhibición.

A si mismo los ensayos se dirigieron a la obtención de metabolitos activos de las nueve cepas y por el método Excavación-Placa-Cultivo

respectivamente frente a cepas de (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*); a partir de los extractos obtenidos se elaboraron antibiogramas por triplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados. Los extractos de los hongos endófitos no mostraron actividad antimicrobiana. La ausencia de actividad antifúngica de los extractos seleccionados, sugiere la ausencia de sustancias bioactivas.

Palabras clave: Actividad Antimicrobiana; Hongos Endófitos; Sustancias Bioactivas; Excavación-Placa-Cultivo, Enfrentamiento Dual.

ABSTRACT

The present work was to evaluate the antimicrobial activity of nine strains of endophytic fungi (*Epicoccum* sp., *Stilbacea*, *Phoma* sp., *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. (1), *Alternaria* sp. (2), *Micelia sterilia* (1), *Micelia sterilia* (2), *Micelia sterilia* (3)), isolated of four medicinal plants (*Piper barbatum*, *Borreria laevis*, *Baccharis obtusifolia*, *Baccharis latifolia*) in front of stumps of pathogens microorganism causing of many illnesses in human.

It was used the technique of dual confrontation to determine the degree of antagonism to each of the strains producing of antimicrobial substances against the pathogens above, giving as a result endophytic fungi *Nigrospora* sp. showed a bigger inhibition percentage in front of the fitophatogen *Asperguillus niger*, while the results against the pathogen *Microsporun canis*, all the endophytic strains investigated showed antagonic activity; and the other hand, the evidence led against of pathogens bacteria and the yeast *Candida albicans*, there was inhibition.

Similarly assays were conducted to obtain active metabolites of the nine strains and by the method Excavation-Plate-Cultivation against strains of stumps of (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*);

beginning with the extracts obtained was prepared in triplicate antibiograms, the diameter of the halos formed inhibition was measured. The extracts of the endophytic fungi did not show antimicrobial activity. The absence of antimicrobial activity of the selected extracts, suggests the absence of substances bioactivas.

Keywords: Antimicrobial Activity; Endophytic Fungi; Bioactive Substances; Excavation-Plate-Cultivation, Dual Confrontation.

I. INTRODUCCIÓN

Nuestro país posee una riqueza en biodiversidad única en el mundo, convirtiéndolo en una región con grandes posibilidades para el desarrollo de la investigación y la transferencia de conocimiento aplicado en el campo de la biotecnología.

Los microorganismos y en especial los hongos constituyen dentro de las fuentes de productos naturales una de las menos estudiadas y que sin embargo ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras ingeniosas y actividades biológicas potentes (Brizuela *et al.* 1998; Donadio *et al.* 2002; Sohrab 2005); y debido al potencial farmacéutico de sus metabolitos secundarios los hongos se han estudiado por más de 70 años. Hasta ahora más de 4000 metabolitos fúngicos se han descubierto y alrededor de 5000 a 7000 especies taxonómicas se han estudiado desde el punto de vista de su diversidad química. En 1995, Hawksworth estimó el número aproximado de hongos existentes en 1,5 millones, con solo 71000 descritos hasta el momento (Osterhage 2001).

Actualmente, los hongos endófitos se ven como una excelente fuente de productos naturales bioactivos, que inhiben o matan una amplia variedad de microorganismos, como las bacterias,

hongos, virus, y protozoarios que afectan humanos y animales (Sohrab 2005); además de proporcionar a las plantas protección contra nematodos, mamíferos e insectos herbívoros, patógenos bacterianos y fúngicos; y proporcionándole características favorables para su protección, crecimiento, mantenimiento y adaptación (Tan & Zou 2001).

Algunos de estos fármacos se han obtenido de plantas medicinales. Se sabe que en la mayoría de plantas existen hongos endófitos. Estos hongos viven en asociación con plantas en la mayor parte o en todo su ciclo de vida, y se encuentran en las hojas y los tallos. En algunos casos, los hongos endófitos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Salgado & Cerero 2005).

Muchos son los hongos endófitos que todavía no se conocen, así como muchos de los metabolitos producidos por éstos, representados con frecuencia por diversas clases de compuestos que van desde las toxinas (Bacon *et al.* 1996; Lorenzi *et al.* 2006; Osterhage; Schwarz *et al.* 2004; Wang *et al.* 1996) agentes fungicidas y bacterianos (Cabello *et al.* 2001; Castillo *et al.* 2002; Erza *et al.* 2004a, 2004b; Li *et al.* 2001; Mann 2001; Stinson *et al.* 2003; Vicente *et al.* 2001), importantes antitumorales y antivirales (Huang *et al.* 2001;

Kumar *et al.* 2005; Strobel 2002), y agentes nematocidas (Schwarz *et al.* 2004); con varias propiedades farmacológicas muy importantes, que abarcan un amplio espectro de actividades funcionales, que han dado un resultado prometedor en el tratamiento clínico de una serie de patologías a nivel humano y animal; e incluso ofreciendo la posibilidad de aplicaciones agrícolas potenciales.

Al igual que las plantas, la variedad de especies fúngicas va aumentando a medida que nos acercamos a las zonas tropicales. Los estudios que se han realizado acerca de este reino en el Ecuador, son escasos, si se tiene en cuenta la biodiversidad existente. En el sitio <http://www.mycokey.com/Ecuador.html> es posible encontrar información actualizada sobre especies fúngicas en Ecuador.

Además, el aumento de la frecuencia y gravedad de las micosis sistémicas, y la aparición de infecciones fúngicas; ha sido una tendencia clara en las últimas décadas del siglo XX. Este papel cada vez más importante de los hongos en la patología humana, ha supuesto un incremento en el empleo de los antifúngicos sistémicos y ha ejercido una importante presión sobre la necesaria investigación para la obtención y desarrollo de nuevas moléculas. Así mismo, los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos o de aparición de resistencias microbiológicas hacen imprescindible el desarrollo de nuevos y

mejores antibióticos y antimicóticos que aporten unas ventajas apreciables respecto a los existentes (Carrillo-Muñoz *et al.* 2001; Castillo *et al.* 2002).

A su vez, el aumento de resistencia por parte de bacterias patógenas a la terapéutica bacteriana tradicional ha obligado a la implementación de la terapéutica combinada, en la que más de un antibacteriano es empleado para lograr su objetivo, aumentando de esta manera los problemas de toxicidad acompañantes del tratamiento; situación que se agrava al momento de ser administrado a un paciente cuyas defensas se encuentran disminuidas como es el caso de personas inmunosuprimidas. Además, la terapia con antibióticos sintéticos no siempre es posible debido a su alto costo (Camporese *et al.* 2003) y a la complejidad estructural que presentan algunos antibióticos, su síntesis orgánica en muchos casos es muy costosa, por lo que aun en nuestros días se requiere de fuentes naturales para su producción y desarrollo. Sin duda, este tipo de principios activos ocupan un lugar importante dentro de los recursos terapéuticos; así mismo estas sustancias se utilizan ampliamente para tratar enfermedades bacterianas en plantas y animales (Trigos *et al.* 2005). Para superar este problema, la gente usa preparaciones obtenidas de plantas siguiendo métodos tradicionales en sus países pero sin ningún soporte científico (Camporese *et al.* 2003).

Es por eso, que de acuerdo a esta prevalencia en la población humana y la aparición de nuevas enfermedades, lo que se pretende realizar con este estudio de investigación del potencial bioactivo de los hongos endófitos aislados de plantas medicinales, es buscar y explorar los microorganismos como fuentes de compuestos terapéuticamente útiles, eficaces, fidedignos y disminuyendo los costos de las medicinas existentes; es así, que la existencia de una inmensa biodiversidad de metabolitos microbianos bioactivos aparecen como una fuente inagotable de estructuras para las nuevas drogas naturales con diferentes funcionalidades, tales como: antimicrobianas, antivirales, antitumorales, y en general agentes agrícolas, industriales y farmacológicos.

Por tal razón, la búsqueda de nuevos compuestos aislados de productos naturales con marcada actividad biológica, se constituye en una alternativa válida para el campo de la medicina tradicional, como para la industria farmacéutica. Es así que en un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio, muestra que el potencial bioactivo de los hongos aislados es prometedor, la mayoría muestran propiedad antagonista positiva tanto con bacterias patógenas como también con *Aspergillus niger* (Ramírez *et al.* 2006).

Por lo expuesto y con la finalidad de conseguir una posible aproximación de la actividad

antimicrobiana de los hongos endófitos aislados, se realizó el presente experimento con los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

a. Objetivo General:

- ✓ Screening de hongos endófitos aislados de plantas medicinales para la investigación de cepas con actividad biológica.

b. Objetivos Específicos:

- ✓ Cultivar los hongos endófitos de las cuatro diferentes especies de Plantas Medicinales en un medio de cultivo adecuado.
- ✓ Medir el porcentaje de inhibición de los hongos endófitos en estudios de cultivo doble, con pruebas antagonistas de interacciones entre hongos endófitos–hongos patógenos y hongos endófitos–bacterias.
- ✓ Realizar fermentaciones fúngicas para la obtención de sus respectivos metabolitos.
- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana y la actividad antifúngica de los extractos de hongos endófitos mediante ensayos de bioactividad.

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. LOS HONGOS

Constituyen un grupo muy numeroso de organismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas.

Son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos como: mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular.

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliales o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos (Carrillo 2003).

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador (Carrillo 2003).

La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente. En un grupo importante de hongos solamente se conoce la reproducción asexual, porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. La reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia. Los hongos

producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferencias características. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asco y los *Zygomycota* producen zigosporas

Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología. Los *Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio. Los *Ascomycota* y en menor grado los *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo. Según su tamaño se diferencian en macroconidios y microconidios (Carrillo 2003).

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Esta facilidad para crecer en cualquier medio de

cultivo y la presencia de conidios en el aire hace que sean contaminantes habituales en el laboratorio. Los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes, anaerobios facultativos. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40°C (Bial & Arístegui 2002).

Las células fúngicas se observan bien por microscopía convencional, aunque pueden requerir tinciones especiales para facilitar su visualización.

Crece fácilmente en los medios de cultivo convencionales dando lugar a colonias visibles macroscópicamente, con morfología bien diferenciada según estén formadas por levaduras u hongos filamentosos (Carrillo 2003).

1.2. HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos endofíticos forman parte de la microflora del suelo y el aire, interactúan con la planta y se definen como organismos no patogénicos, los cuales durante algún momento de su ciclo de vida colonizan o no los tejidos internos de la planta sin causar ningún tipo de síntoma (Salazar & Cepero 2005).

El término endófito es aplicado a hongos o bacterias (Maheshwari 2006) que viven todo o parte

de su ciclo vital colonizando inter y/o intracelularmente dentro de los tejidos sanos de la planta huésped, típicamente sin causar ningún síntoma evidente de enfermedad (Tan & Zou 2001).

Los hongos endófitos son organismos que viven en asociación con plantas, se encuentran en las hojas y en los tallos de muchas plantas. Son simbioses, no producen síntomas de enfermedad en la planta, aunque algunas veces pueden presentar un grado de patogenicidad leve estando relacionados taxonómicamente con los hongos fitopatógenos. Viven en los espacios intercelulares y algunas veces intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la planta. En algunos casos, los hongos endófitos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos: utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y ésta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen (Salazar & Cepero 2005).

Casi todas las especies de plantas vasculares revisadas hasta la fecha se encuentran como refugio a bacterias y/o hongos endófitos. Además, la colonización de endófitos en algas marinas, musgos y helechos también ha sido registrado. En realidad, los endófitos son componentes importantes de la biodiversidad microbiana.

Comúnmente, los varios de cientos de especies de endófitos pueden ser aislados de una planta sola, entre otros, al menos una especie

exhibe especificidad por el huésped. Las condiciones ambientales bajo las que el huésped está creciendo también afectan a la población de endófitos y el perfil del endófito puede ser más diversificado en áreas tropicales.

Arnold *et al.* (2003) aisló 418 morfoespecies de endófitos (aproximadamente 347 taxa genéticamente distintas) de 83 hojas sanas de *Heisteria concinna* y *Ouratea lucens* en la tierra del bosque tropical de Panamá y propuso que los mismos endófitos tropicales pudieran ser hiperdiversos con preferencia al huésped y la heterogeneidad espacial (Tan & Zou 2001).

Algunas especies de hongos endófitos han sido identificadas como fuentes de componentes anticancerígenos, antidiabéticos, insecticidas e inmunosupresores. Además, los hongos endófitos también pueden producir metabolitos con función termoprotectiva (Maheshwari 2006).

Estos hongos promueven el crecimiento (Salazar & Cepero, 2005), mejoran la capacidad de adaptación ecológica del huésped aumentando su tolerancia estrés (Tan & Zou 2001) (biótico y abiótico) e incrementan la resistencia a enfermedades y plagas (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora & Pocasangre 2006; Pocasangre 2002; Petrini 1991) (Salazar & Cepero 2005).

Las plantas infectadas con endófitos crecen a menudo más rápido que las plantas no infectadas. Este efecto es por lo menos en parte a los endófitos debido a la producción de fitohormonas como indole-3-ácido acético (IAA), citoquininas y otras sustancias promotoras del crecimiento de las planta y/o en parte debido al hecho de que endófitos podrían aumentar el consumo de elementos nutritivos como nitrógeno y fósforo de los huéspedes (Tan & Zou 2001).

La promoción de crecimiento se atribuye a ciertos grupos de microorganismos, capaces de producir compuestos químicos (antibióticos y/o metabolitos secundarios), grupos ciano (HCN supresor de bacterias patógenas), sideróforos quelatantes de hierro y hormonas reguladoras de crecimiento, tales como: auxinas, citoquininas, ácido giberélico, ácido absínico etileno, entre otros (Raupach *et al.* 1996; Liu *et al.* 1995a, 1995b). En algunos casos esta promoción de crecimiento resulta como consecuencia de la reducción de microorganismos patógenos mediante un modo de acción antagónico contra el agente causal, dando como resultado un efecto positivo en el crecimiento de la planta (Harman 2006; Kloepper & Schroth 1981) (Salazar & Cepero 2005).

Los endófitos se encuentran en todas las plantas, son sumamente abundantes y son a menudo muy diversos (Stone & Petrini 1997; Schulthess & Faeth 1998; Arnold *et al.* 2000). La

mayoría de estos endófitos constituyen infecciones internas localizadas en follaje, raíces, tallos y corteza y son transmitidos horizontalmente vía esporas. Una fracción mucho más pequeña son transmitidos verticalmente vía crecimiento hyphae en semillas (Saikkonen *et al.* 1998) (Stanley & Faeth 2002).

1.3. CULTIVO DE HONGOS

Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc). El pH ha de ser ligeramente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos (Carrillo 2003).

Existen tres tipos de medios de cultivo para los hongos de acuerdo a su procedencia y origen de sus componentes:

1. *Medios naturales*, se caracterizan por estar preparados por compuestos de origen natural y su composición no es exacta, como pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición, no son fácilmente reproducibles, ni de amplio uso.

2. *Medios semisintéticos*, están conformados por compuestos de origen natural y químico, estos medios de cultivo están preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de procedencia desconocida o variable.
3. *Medios sintéticos*, presentan composición química definida cuantitativa y conocida. La mayoría de las fórmulas de los medios de cultivo utilizados para hongos contienen peptona, algún carbohidrato y agar (Pelczar *et al.* 1997) (Alean 2003).

Los hongos crecen bien en medios artificiales y tienen requerimientos nutritivos simples, una fuente de carbono orgánico, generalmente en azúcar y de nitrógeno suelen ser los elementos suficientes para obtener un buen crecimiento. Junto a ellos, un soporte sólido, el agar, permite a los hongos filamentosos el desarrollo del micelio aéreo, donde se localizan las estructuras reproductoras y el desarrollo de colonias en el caso de las levaduras. El medio de cultivo más utilizado para los hongos es el medio glucosado de Sabouraud, que reúne estas características y un pH de 5.6 que dificulta el crecimiento bacteriano (Carrillo 2003).

La adición al medio de antibióticos (como el cloranfenicol o la gentamicina) que inhiben el crecimiento de las bacterias contaminantes o antifúngicos especiales (como la actidiona o

cicloheximida) que inhiben el crecimiento de muchos hongos no patógenos, transforman al medio de Sabouraud en un medio más selectivo.

Los medios de cultivo después de sembrados, se incuban en aerobiosis y la temperatura óptima suele ser 25-30°C para los agentes de micosis superficiales y los oportunistas y de 35-37°C para los que producen infecciones profundas. Los hongos levaduriformes dan lugar en 24-48 horas a colonias de aspecto y morfología similar a las bacterianas. El desarrollo de las colonias de los hongos filamentosos es mucho más variable; algunos crecen muy lentamente, pero sus colonias son muy características y en general se diferencian fácilmente de las levaduras. (Carrillo 2003).

1.4. ANTAGONISMO MICROBIANO

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio

dinámico en la superficie de las plantas (Fernández 2001).

1.4.1. Mecanismos de acción

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández 2001) (Méndez & Mondino 1999).

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook & Baker 1983) (Méndez & Mondino 1999).

a. Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros

microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado.

Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Méndez & Mondino 1999).

b. Competencia

Otro de los posibles mecanismos de acción antagónica es la competencia. Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Méndez & Mondino 1999; Fernández 2001).

La competencia por espacio también ha sido reportada; Wilson y colaboradores mencionan que las levaduras son efectivas colonizadoras de la superficie de plantas y destaca la producción de materiales extracelulares (en especial

polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos (Wilson *et al.* 1996) (Méndez & Mondino 1999; Fernández 2001).

c. Interacción directa con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación:

1. Parasitismo

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Méndez & Mondino 1999; Fernández 2001).

2. Predación

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en

suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell 1989).

d. Inducción de resistencia

Las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. De esta forma se acostumbra a postular que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción. Si elegimos una planta cualquiera y comparamos el inmenso número de microorganismos que existe en su entorno sobre la tierra con el limitado número de microorganismos patógenos de ella debemos concluir que esto es así. Las plantas presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente. Se puede inducir resistencia mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la deacetilación de la quitina) y también mediante el uso de microorganismos antagonistas. Se ha demostrado que levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos de postcosecha además de competir por espacio y nutrientes son capaces de inducir resistencia en la planta. Tal es el caso de *Pichia guillermondii* (US-7), la cual ha mostrado ser

inductora de la producción de fitoalexinas en frutos cítricos (*Wilson et al.* 1994).

1.5. FERMENTACION MICROBIANA

Un proceso de fermentación se lleva a cabo en un fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos. (Flechter 1984).

1.5.1. Requerimientos Fisiológicos del Crecimiento Microbiano

a) Medio acuoso:

Todas las reacciones biológicas se realizan en presencia de agua. Esta última es por lo general el principal componente del medio de cultivo. Incluso aquellos microorganismos que crecen en un medio sólido como granos de cereales, pajas o heno, necesitan que estos sustratos estén humedecidos para poder colonizarlos (Mönckeberg 1988).

b) Temperatura de crecimiento:

Las temperaturas entre las cuales se puede desarrollar una célula microbiana varía entre 10 y 60 °C. Según el rango de temperatura en el cual el crecimiento es posible podemos distinguir microorganismos psicrófilos (4-25 °C), mesófilos (30-40 °C) y termófilos (40-65 °C y más) (Mönckeberg 1988).

c) Acidez:

El pH de crecimiento de los microorganismos varía entre 3.0 y 8.0. En forma general, las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 7.0) con la importante excepción de las bacterias lácticas que resisten pH ácidos. Por el contrario, la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras prefieren pH ácidos (alrededor de 5.0). Esta ácido-tolerancia otorga una ventaja importante a las fermentaciones con hongos, ya que el riesgo de contaminación bacteriana es bajo (Mönckeberg 1988).

d) Presión parcial de oxígeno:

Se distinguen dos tipos de microorganismos en función de su requerimiento en oxígeno: los microorganismos aerobios, para los cuales la disponibilidad del oxígeno es indispensable; y los microorganismos anaerobios, para los cuales el oxígeno es tóxico. Existen por último algunos

microorganismos capaces de adaptar su metabolismo a las condiciones de oxigenación imperantes en el medio y que son por lo tanto aerobios facultativos (éste es el caso de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros) (Mönckeberg 1988).

La fermentación aerobia es hasta hoy la más utilizada ya que el crecimiento es mucho más rápido en aerobiosis que en anaerobiosis. Sin embargo, los microorganismos anaerobios son capaces de sintetizar una serie de compuestos únicos (metano, etanol, etc.) lo que ha provocado un nuevo interés en su cultivo y estudio, en particular, para la industria química. Por otra parte es necesario mencionar dos limitantes que presentan las fermentaciones aerobias:

- Muy baja solubilidad del oxígeno en el agua, lo que hace necesario airear y agitar fuertemente el medio de cultivo.
- Producción elevada de calor que debe ser constantemente removida a fin de mantener estable la temperatura.

Las concentraciones de oxígeno y CO₂ disueltos en el medio son controladas por sondas de O₂ y CO₂, respectivamente (Mönckeberg 1988).

1.5.2. Nutrientes Requeridos para el Crecimiento de Microorganismos

En primer lugar, el microorganismo requerirá de una fuente de carbono de la cual extraer la energía necesaria para su metabolismo. Las fuentes de carbono más comunes son los hidratos de carbono, tales como almidón y azúcares.

En la búsqueda de nuevas fuentes de carbono se está estudiando desde hace poco la utilización de recursos lignocelulósicos (pajas de cereales, árboles y sus residuos, etc.), principal fuente de biomasa renovable (Mönckeberg 1988).

Muchas de estas fuentes de carbono requieren un pretratamiento previo a su utilización; es el caso, por ejemplo: el almidón, que debe ser cocido e hidrolizado hasta glucosa antes de ser transformado en etanol por los microorganismos que realizan esta transformación. Es también el caso de la celulosa y de los substratos lignocelulósicos en general, los cuales necesitan drásticos tratamientos físicos y/o químicos antes de ser utilizables con este fin.

Otros nutrientes que son necesarios en cantidades importantes para el crecimiento microbiano son el nitrógeno, el fósforo y el azufre. Estos elementos son incorporados en las moléculas estructurales y funcionales de la célula. El nitrógeno, en particular, debe ser provisto en

proporciones variables bajo la forma de nitrógeno proteico obtenidos a partir de subproductos de la industria del maíz, extracto de levadura u otros y no proteico (sales de amonio, urea, etc.). Los otros dos elementos son entregados como sales de fosfato y sulfato, respectivamente. Por último, una serie de micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc.), deben ser suministrados al medio (Mönckeberg 1988).

1.5.3. Etapas para la Obtención de un Producto Microbiano

a) Producción del biocatalizador (célula o enzima) o starter:

El costo de los catalizadores que hay que agregar puede ser elevado, en particular, cuando se trata de enzimas purificadas. En efecto, en este último caso, el costo de muchas de ellas es tal, que el proceso solo es económico si éstas pueden ser utilizadas varias veces. Por lo tanto, durante los últimos días se han realizado grandes esfuerzos por recuperar la mayor cantidad de catalizador de cada ciclo (Mönckeberg 1988).

Una forma de realizar este objetivo es reciclar las células microbianas a las enzimas. Esto resulta muy difícil de operar con las enzimas y provoca a menudo lesiones en las células y contaminación con organismos foráneos del reactor.

Otra manera de reducir las pérdidas del catalizador, es manteniéndolo dentro del fermentador inmovilizado. Esto se logra gracias a la transformación de la enzima soluble o de la célula microbiana en una nueva forma de catalizador, una forma fija sobre un soporte sólido.

El primer método de inmovilización que fue desarrollado y el más simple, es la adsorción: las enzimas o células se adhieren por atracción física a la superficie de un material inerte como celulosa, carbón, arcilla, entre otros.

Una unión más estrecha y estable puede resultar de la formación de un enlace químico, covalente, entre el catalizador y el soporte. Este último puede ser de celulosa, perlas de vidrio, plásticos o polímeros sintéticos. En estos dos tipos de inmovilización, el soporte se encuentra bajo la forma de partículas de pequeño tamaño lo que permite una gran superficie de contacto entre el sustrato y el catalizador (Mönckeberg 1988).

Un tercer tipo de inmovilización consiste en atrapar el catalizador en una matriz formada por un polímero como almidón, sílica u otros.

Otro tipo de atrapamiento es la microencapsulación. Esta consiste en encerrar el biocatalizador en una cápsula de un diámetro muy pequeño, del orden de los 100 micrones. La cápsula funciona como una membrana semi-

permeable: deja pasar las pequeñas moléculas de sustrato y producto libremente, pero retiene las más grandes (enzimas o células) (Mönckeberg 1988).

b) Preparación del medio de cultivo:

Pretratamiento de la materia prima, adición de nutrientes, ajuste de pH (Mönckeberg 1988).

c) Esterilización del medio de cultivo:

Para evitar la contaminación del medio por microorganismos indeseables, es necesario esterilizarlo y mantener condiciones asépticas durante la fermentación (aireación estéril, adición de nutrientes estériles, etc.). Esto se debe a que la mayoría de los productos biológicos obtenidos hasta hoy son producidos en cultivo puro, es decir, por un solo microorganismo. La contaminación de este cultivo por otros microorganismos puede resultar en la destrucción del catalizador, en su inhibición o en la destrucción del producto. Por último, pueden introducirse sustancias tóxicas difíciles de separar del producto que nos interesa (como en el caso de un antibiótico) (Mönckeberg 1988).

d) Síntesis del producto:

En función del producto y del catalizador empleado se determina la modalidad de

funcionamiento del fermentador: continua o discontinua.

En los procesos **discontinuos** o **tipo batch**, el aporte de nutrientes es único, el tiempo de fermentación es limitado y el producto es recuperado íntegramente al final de la fermentación por vaciado de la cuba del fermentador. Este método es actualmente el más utilizado para los productos que necesitan condiciones de esterilidad muy estrictas (Mönckeberg 1988).

En los procesos **continuos**, en cambio, el aporte de nutrientes es renovado regularmente y el producto es removido al mismo tiempo. Este tipo de procesos presenta varias ventajas con respecto a los procesos discontinuos. Así, por ejemplo, los volúmenes de producción por unidad instalada son muy superiores en un sistema continuo. Por otra parte, el catalizador no es eliminado en este tipo de proceso, lo cual permite economías sustanciales, ya que se considera que el precio del biocatalizador es, por lo menos, igual al de los nutrientes empleados en su crecimiento. Por último y sobre todo, este tipo de cultivo abierto permite una versatilidad inherente de operación, en el cual todos los parámetros (concentración microbiana, velocidad de crecimiento, concentración de sustratos y productos) pueden ser controlados indefinidamente (Mönckeberg 1988).

La máxima velocidad de crecimiento de un microorganismo es el resultado de las características inherentes de éste, más que la consecuencia de la disponibilidad de nutrientes. En las mejores condiciones, el crecimiento es exponencial. Una disminución en la velocidad de crecimiento puede operarse limitando la disponibilidad de cualquier nutriente esencial. En esta nueva situación el crecimiento se encuentra desequilibrado y los nutrientes divergen hacia otras rutas metabólicas que no son aparentemente indispensables para el crecimiento. Aquellos metabolitos que son producidos cuando el microorganismo se encuentra en fase exponencial de crecimiento, se llaman primarios (ácido cítrico, aminoácidos, alcoholes, etc.), por oposición a los metabolitos secundarios (vitaminas, antibióticos, etc.), los cuales son sintetizados en condiciones de crecimiento sub-óptimas. El tipo de metabolito secundario que será sintetizado dependerá del microorganismo involucrado y del nutriente limitante en el medio de cultivo (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, etc.) (Mönckeberg 1988).

Según el tipo de metabolito requerido, la estrategia de fermentación a seguir deberá en primer lugar tomar en cuenta en qué momento del crecimiento éste se expresa. Así, por ejemplo, en el caso de un metabolito secundario, muchas veces convendrá utilizar un sistema doble de fermentación. En el primer recipiente, se hará crecer el microorganismo en condiciones óptimas a

fin de obtener el máximo de biomasa microbiana. Luego, esta biomasa se trasladará al segundo recipiente donde la limitación de un nutriente particular permitirá la síntesis del metabolito. Este sistema permite también el óptimo aprovechamiento de la materia prima utilizada, la cual sería de otra manera en gran parte desperdiciada (Mönckeberg 1988).

e) Separación del medio y del catalizador:

El producto puede encontrarse dentro de la célula (producto intracelular) como en el caso de la vitamina B12 o la enzima glucosa isomerasa, por ejemplo: la situación de los productos obtenidos por transformación genética en *Escherichia coli* o bien puede ser liberado al medio de cultivo (extracelular) como es el caso de la penicilina, amilasa, aminoácidos y otros (Mönckeberg 1988).

f) Purificación del producto:

Si el producto es extracelular, es decir, es excretado al medio, se encontrará relativamente puro, pero diluido en un gran volumen de agua. Si es intracelular (no excretado al medio) estará mezclado con todos los constituyentes celulares y habrá que separarlo de ellos.

En el caso de *Escherichia coli*, por ejemplo, los productos son intracelulares. En primer término hay

que concentrar las bacterias por medio de filtración o centrifugación.

Para obtener el producto, hay que romper las bacterias, quedando éste mezclado con todos los constituyentes celulares. Para separarlo se utilizan diversos métodos, tales como: precipitación con sales o alcohol y/o técnicas cromatográficas, (que separan las moléculas de acuerdo a tamaño, carga eléctrica o por su afinidad por algún reactivo químico) (Mönckeberg 1988).

En cada caso, hay que adaptar las diversas alternativas de purificación y extracción. Dentro de estos procesos, especialmente para los productos de alto valor comercial, los anticuerpos monoclonales están comenzando a ser de gran utilidad. Gracias a su tremenda especificidad y sensibilidad. Sin embargo, paradójicamente, esta última propiedad trae problemas en el caso de productos lábiles, ya que la separación final del complejo antígeno-anticuerpo es difícil de romper y requiere de tratamientos drásticos y muchas veces desnaturantes (Mönckeberg 1988).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación estudia la actividad antimicrobiana de nueve hongos endófitos aislados de cuatro plantas medicinales pertenecientes a la provincia de Loja; estas muestras fueron tomadas del cepario de hongos del Centro de Biología Celular y Molecular.

Además, en la investigación se aplicaron métodos de aislamiento, propagación fúngica, aplicación de técnicas para la conservación de microorganismos, antagonismo microbiano y ensayos de sensibilidad microbiana.

2.1. CULTIVO DE HONGOS

Para el estudio de la actividad biológica de las cepas fúngicas, se inició cultivando las cepas aisladas en un medio de cultivo adecuado como Potato Dextrosa Agar (PDA) en cajas Petri (60 x 15mm) bajo condiciones de asepsia y esterilidad; y se mantendrán a temperatura ambiente hasta el desarrollo de la colonia fúngica.

2.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS

Las cepas se han mantenido a corto y mediano plazo mediante resiembras en caja Petri

con medio PDA (Haynes y col., 1955), incubadas a temperatura ambiente durante 7 a 10 días (hasta que se observa desarrollo de la colonia fúngica) y conservadas a 4°C. Las resiembras se han efectuado cada 30 días (Macarron 1992).

El micelio obtenido fue resembrado en tubos con medio de cultivo en bisel e incubados a las mismas condiciones de temperatura y tiempo, y conservadas igual a 4°C. Las resiembras se efectúan cada 60 días (Marquina 1991).

2.3. CULTIVO DOBLE

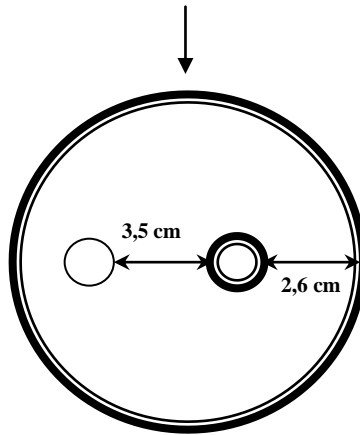
Prueba para evaluar las interacciones entre los microorganismos. Consiste en el desarrollo simultáneo del microorganismo antagonico y patógeno en medios que le permitan su crecimiento en placas Petri, todas a las mismas condiciones.

La observación in vitro de las propiedades antagonistas de los microorganismos se puede realizar mediante dos pruebas (Malaspina 2002):

Prueba Hongo – Hongo

Colocar 25 ml
Agar PDA

HONGO
ENDÓFITO



HONGO
PATÓGENO

Incubar

28°C ± 2°C por una
semana

Fig. N° 1

Cultivo Doble o Técnica de Enfrentamiento Dual
entre Endófitos y hongos Patógenos.

Elaborado: Autor

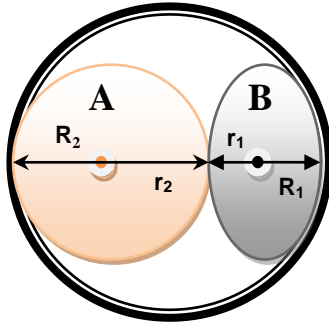


Fig. Nº 2

Cálculo del porcentaje de inhibición por el método de cultivo dual por medición del crecimiento radial de cada hongo.

Elaborado: Autor

Cálculos:

Fórmula 1. (Fórmula de Van Den Heuvel)
Determina el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos en cultivo doble.

$$A \gg I_1 = \frac{R_1 \times r_1}{R_1} \times 100 \quad B \gg I_2 = \frac{R_2 \times r_2}{R_2} \times 100$$

Donde:

A = Inhibición del Hongo Endófito

B = Inhibición de Hongo Patógeno

I = Porcentaje de inhibición

R = Radio del centro del disco de la colonia al borde de la caja Petri

r = Radio del centro del disco de la colonia al borde de la colonia antagonista de frente

Prueba Hongo – Bacteria

Colocar 25 ml
Agar PDA

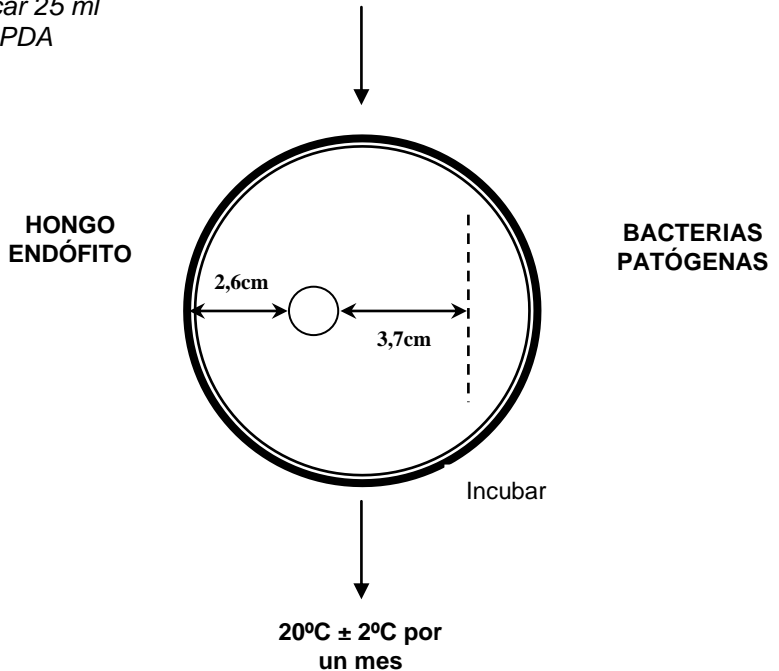


Fig. Nº 3

Cultivo Doble o Técnica de Enfrentamiento Dual entre Endófitos y bacterias patógenas incluido la levadura *Candida albicans*.

Elaborado: Autor

Todas las pruebas se realizaron por duplicado y las cajas se conservaron a 20°C y se observaron de forma regular semanalmente durante un mes.

2.4. OBTENCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS

La separación de metabolitos secundarios es un método establecido para identificar nuevas moléculas biológicamente activas. La preparación para una separación biológica simple de extractos en fermentación microbial requiere primeramente condiciones de crecimiento, esto promueve la síntesis de metabolitos secundarios (Higgs 2001).

2.4.1. Activación y enriquecimiento de cada uno de los microorganismos

La activación de cada uno de los microorganismos se realiza de acuerdo al tipo de microorganismo; en el caso de los hongos endófitos por ser hongos de fácil reproducción se utiliza el medio PDA que es un medio específico para hongos y un enriquecimiento en el medio Caldo Papa (Higgs 2001).

En todos los casos se obtuvieron con una agitación constante de 150 rpm y a temperatura de 30°C durante un periodo de tiempo de 15 días.

2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El sobrenadante que contiene los metabolitos bioactivos obtenidos de los medios para cada microorganismo, son enfrentados con los

microorganismos en prueba siguiendo la técnica Excavación-Placa-Cultivo, que es una modificación de la prueba de Bauer–Kirby recomendado por la NCCL (Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico). Este método permite obtener resultados rápidos y cualitativos (S.E.I.M.C. 2006).

2.5.1. Preparación de la suspensiones inóculo

Inocular en tubos que contienen Caldo Soya Triptica una asada con las diferentes bacterias a probar e incubar de 6 a 8 horas a 37°C, luego se ajusta la población bacteriana a 1×10^7 ufc/ml con la escala de McFarland (concentración utilizada para pruebas de selección) (S.E.I.M.C. 2006).

2.5.2. Siembra de bacterias

En 25 ml (por caja) de agar Mueller Hinton y a la temperatura de 45°C, colocar la suspensión bacteriana (ajustada a 1×10^7 ufc/ml) a fin de lograr una siembra masiva agitando suavemente la caja con el propósito de homogenizar la suspensión; dejar solidificar aproximadamente 10 minutos. Una vez preparada la caja Petri con las bacterias, se puede almacenar en refrigeración a 4°C por un periodo de 72 horas (S.E.I.M.C. 2006).

Tabla 1. Microorganismos a probar en la prueba de difusión.

BACTERIA	TIPO
<i>Escherichia coli (Ec)</i>	Gram negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa (Pa)</i>	Gram negativa
<i>Proteus vulgaris (Pv)</i>	Gram negativa
<i>Klebsiella pneumoniae (Kp)</i>	Gram negativa
<i>Staphylococcus aureus (Sa)</i>	Gram positiva
<i>Candida albicans (Ca)</i>	Levadura

2.5.3. Preparación e incubación de las cajas Petri

Hacer 7 pozos en la caja Petri con sacabocados de 5mm de diámetro; en el pozo central colocar 25µl de control de antibiótico (10µg/ml de Gentamicina) y en los 6 pozos restantes que se encuentran distribuidos alrededor del pozo central se inocula 25µl de cada extracto. Luego incubar a 37°C por 24 horas (S.E.I.M.C. 2006).

2.5.4. Determinación de la actividad antifúngica

Después de las 24 horas de incubación, se lee el diámetro del halo de inhibición del control positivo (Gentamicina) representada por una zona clara y luego se continúa tomando las lecturas de

los extractos, midiendo con una regla los halos de inhibición formados en cada pozo que contienen los extractos. La ausencia de halo significa que el extracto no tiene actividad contra la bacteria en estudio (S.E.I.M.C. 2006).

III. RESULTADOS

TABLA 3.1. Hongos ensayados en las pruebas de bioactividad.

HONGO	PLANTA
	Nombre científico
<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Piper barbatum</i>
<i>Stilbacea</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Phoma sp.</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Nigrospora sp.</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Alternaria sp. (1)</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Alternaria sp. (2)</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Micelia sterilia 1</i>	<i>Baccharis latifolia</i>
<i>Micelia sterilia 2</i>	<i>Borreria laevis</i>
<i>Micelia sterilia 3</i>	<i>Baccharis obtusifolia</i>

La tabla 3.1. muestra los hongos endófitos y su planta huésped de la que han sido aislados.

TABLA 3.2. Intensidad de Antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos y *Aspergillus niger* por el método de cultivo doble.

HONGO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Antagonista	Patógeno
<i>Epicoccum sp.</i>	22,62	31,80
<i>Stilbacea</i>	23,81	24,64
<i>Phoma sp.</i>	29,76	11,59
<i>Nigrospora sp.</i>	39,29	10,87
<i>Alternaria sp.(1)</i>	16,67	31,88
<i>Alternaria sp.(2)</i>	28,57	31,88
<i>Micelia sterilia 1</i>	19,05	28,98
<i>Micelia sterilia 2</i>	17,86	58,70
<i>Micelia sterilia 3</i>	19,05	31,88

La tabla 3.2. muestra los valores expresados en porcentaje de cada enfrentamiento, donde se determina en forma descriptiva la intensidad de antagonismo por cada hongo endófito frente a un fitopatógeno como es *Aspergillus niger*.

Gráfico N° 1. Porcentaje de inhibición de los endófitos frente a *Aspergillus niger* por el método de cultivo doble.

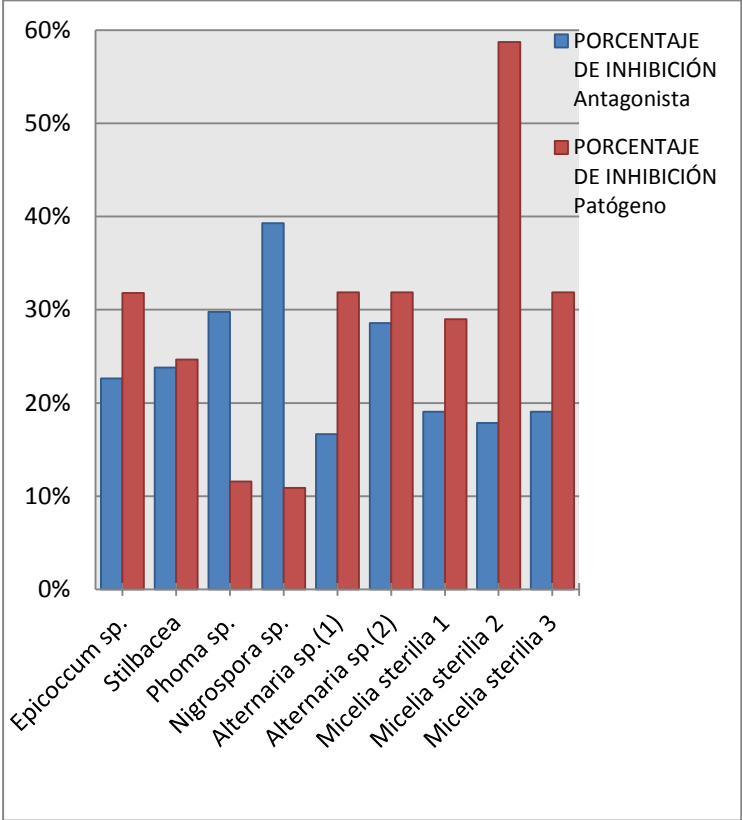


TABLA 3.3. Intensidad de Antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos y *Microsporium canis* por el método de cultivo doble.

HONGO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
	Antagonista	Patógeno
<i>Epicoccum sp.</i>	53,62	11,91
<i>Stilbacea</i>	43,48	15,18
<i>Phoma sp.</i>	(*) +	(*) -
<i>Nigrospora sp.</i>	+	-
<i>Alternaria sp.(1)</i>	54,35	5,36
<i>Alternaria sp.(2)</i>	42,39	16,91
<i>Micelia sterilia 1</i>	53,36	3,57
<i>Micelia sterilia 2</i>	35,87	11,61
<i>Micelia sterilia 3</i>	47,83	21,43

(*) + = Inhibición completa, el endófito cubre totalmente al patógeno.

(*) - = Ausencia de inhibición, el patógeno es cubierto totalmente por el endófito.

La tabla 3.3. muestra la intensidad de antagonismo expresada en porcentaje por cada hongo endófito frente al patógeno *Microsporium canis*.

Gráfico N° 2. Porcentaje de inhibición entre los endófitos frente a *Microsporium canis* por el método de cultivo doble.

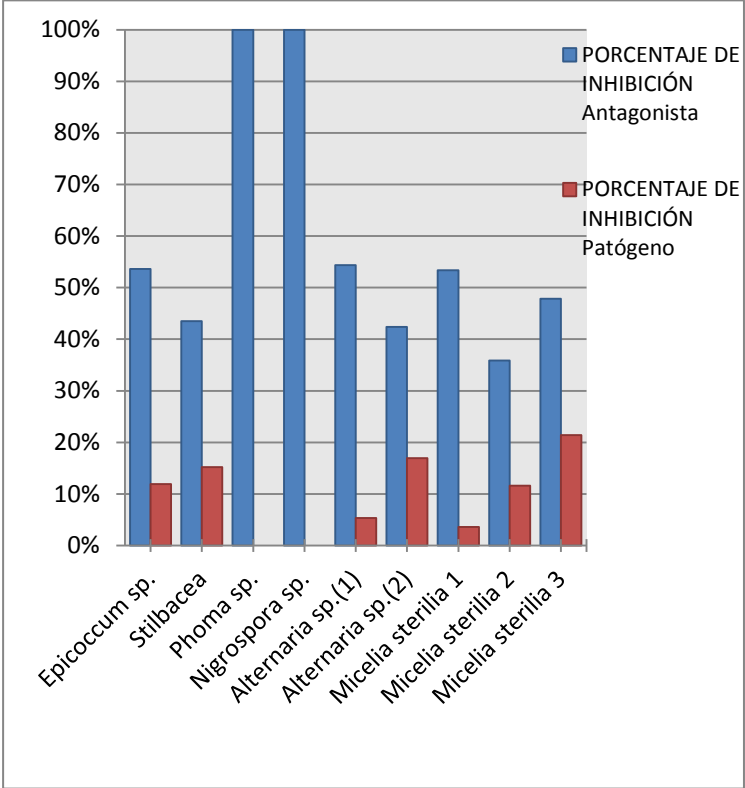


TABLA 3.4. Antagonismo *in vitro* entre hongos endófitos y bacterias patógenas incluido el hongo *Candida albicans* por el método de cultivo doble.

HONGO	PATÓGENOS				
	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ca</i>
<i>Epicoccum sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Stilbacea</i>	+	+	+	+	+
<i>Phoma sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Nigrospora sp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Alternaria sp.(1)</i>	+	+	+	+	+
<i>Alternaria sp.(2)</i>	+	+	+	+	+
<i>Micelia sterilia 1</i>	+	+	+	+	+
<i>Micelia sterilia 2</i>	+	+	+	+	+
<i>Micelia sterilia 3</i>	+	+	+	+	+

+ = Presencia de inhibición

La tabla 3.4. muestra de forma cualitativa la intensidad del antagonismo por cada microorganismo frente a microorganismos patógenos.

TABLA 3.5. Evaluación de los metabolitos activos por el método de difusión en cajas Petri.

HONGO	PATÓGENOS				
	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	<i>Ca</i>
<i>Epicoccum sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Stilbacea</i>	-	-	-	-	-
<i>Phoma sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Alternaria sp.(1)</i>	-	-	-	-	-
<i>Alternaria sp.(2)</i>	-	-	-	-	-
<i>Micelia sterilia 1</i>	-	-	-	-	-
<i>Micelia sterilia 2</i>	-	-	-	-	-
<i>Micelia sterilia 3</i>	-	-	-	-	-

- = Ausencia de halos de inhibición (no activo).

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó una evaluación de la actividad biológica de nueve especies de hongos endófitos aislados de cuatro plantas medicinales que crecen al sur del Ecuador, con el fin de detectar a las especies con potencial bioactivo. Las especies evaluadas se seleccionaron en base a las propiedades farmacológicas de sus plantas huésped.

Los hongos endófitos aislados fueron sembrados en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA). Este medio fue seleccionado ya que en muchas investigaciones se logra un crecimiento óptimo de muchos hongos incluyendo los endófitos (Souwalak *et al.* 2007).

La evaluación del antagonismo microbiano se realizó contra bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), hongos patógenos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Microsporum canis*), con el propósito de poder comparar la intensidad o porcentaje de inhibición de estos microorganismos frente a los hongos endófitos.

Se puede decir que para la forma e intensidad del antagonismo *in vitro* por el método de Enfrentamiento Dual o cultivo doble, es una prueba

inicial para poder determinar el tipo de interferencia por las características que presenta dicho enfrentamiento con cada uno de los microorganismos anteriormente citados.

Se pudo observar, por tanto, que los antagonicos según cada tratamiento Endófito-Patógeno en todos los casos detiene el crecimiento del patógeno con diferentes intensidades. Según la tabla 3.2. y de acuerdo a los estudios realizados por Alipi y Monaco 1990 *in vitro* deducen que el antagonismo en placa es una prueba inicial y muy importante, nos da una aproximación para estudios subsiguientes de sistemas biológicos de control de enfermedades.

Vemos a la vez que los resultados expresados en porcentaje nos dan una idea mucho más general, considerando como el 100% de inhibición el crecimiento de hongo patógeno, lo cual demuestra que para los tratamientos *Nigrospora sp.* + *Asperguillus niger* presenta un porcentaje de inhibición de casi cercana al 40%. Según Alipi y Monaco 1990, es importante destacar que estos resultados *in vitro* son muy importantes para una evaluación y que sería importante extrapolar estos resultados realizándolo en condiciones de invernadero o campo respectivamente.

Los resultados de la interacción antagonica de algunas de las cepas de hongos aislados que mostraron mayor actividad frente a bacterias

patógenas, se presentan en la Tabla 3.4. La mayoría de las cepas fúngicas analizadas, muestran actividad antimicrobiana, en contra de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, y la levadura *Candida albicans*. Estos resultados concuerdan con los realizados por (Ramírez *et al.* 2006), en el cual la mayoría de cepas fúngicas analizadas, muestran actividad antagónica en contra de estos microorganismos patógenos.

En su trabajo Méndez & Mondino (1999) reportan que no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante la medición de halos de inhibición emitida por los metabolitos presentes en sus respectivos extractos. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para detectar el efecto de compuestos químicos en la inhibición de microorganismos patógenos. En la Tabla 3.5. podemos ver que utilizando los extractos, según los métodos ya descritos anteriormente, se hizo la prueba de Excavado-Placa-Cultivo que nos permitió medir los halos por cada tratamiento. Al evaluar el

efecto de los extractos acuosos de las nueve especies de hongos endófitos se observó que en ninguno de los tratamientos Endófito-Patógeno, tuvo efectividad alguna sobre la inhibición de estos microorganismos patógenos.

Los hongos endófitos crecen dentro de sus plantas huésped sin causar aparentes síntomas de enfermedades (Petrini 1991, Wilson 1995) y crecen en este hábitat involucrando continuas interacciones metabólicas entre el hongo y su huésped (Schulz *et al.* 2002). Estas interacciones metabólicas del Endófito y su huésped pueden favorecer la síntesis de metabolitos biológicamente activos, pero este grupo de hongos no ha sido extensamente estudiado. Es así, que los hongos endófitos se han reconocido como buenas fuentes de metabolitos secundarios asociados con su respectivo biotopo y huésped (Schulz *et al.* 2002).

Las interacciones metabólicas de los endófitos con su anfitrión pueden favorecer la síntesis de metabolitos secundarios biológicamente activo. (Dreyfuss & Chapela, 1994; Gloer 1997).

La diferencia de actividad de los resultados obtenidos para estos aislados que no han tenido actividad antimicrobiana, es posible que algunos de estos endófitos puedan producir sustancias que puedan prevenir infecciones microbianas estimulando directamente al huésped (Radu & Yoke (2002).

La síntesis combinatoria produce al azar metabolitos secundarios definidos como componentes de bajo peso molecular que no requieren crecer en cultivo puro, estos son producidos como una adaptación para funciones específicas en la naturaleza (Strobel & Daisy, 2003).

Tan y Zou 2001, creen que la razón por qué algunos endófitos producen ciertos fitoquímicos originalmente característico del huésped podría estar relacionada con una recombinación genética de los endófitos con el huésped que ocurre en tiempo evolutivo.

Radu & Yoke (2002) reportan que, extractos fúngicos endofíticos que indicaban baja actividad antimicrobiana podrían tener compuestos activos pero probablemente en las cantidades más pequeñas o los extractos crudos sometidos a revisión podrían producir compuestos más potentes en cuanto hubieran pasado por un poco de purificación. También extractos que no indicaban actividad antimicrobiana en el bioensayo pueden estar activos contra otros microbios que no fueron evaluados.

Además, también hay la posibilidad que las sustancias presentes en el extracto pueden estimular el crecimiento de los microorganismos, como fue evidente en varios aislamientos que exhibían buen crecimiento bacteriano y por lo tanto

contrarrestando el efecto de sustancias inhibitorias como se reporta el trabajo realizado por Radu & Yoke 2002.

Entonces, la presencia y producción de metabolitos secundarios podría estar relacionado directamente con el hábitat y la interacción directa con su huésped; o que las actividades funcionales de estos hongos están relacionado con otro tipo de propiedades biológicas variadas como se muestra en investigaciones señaladas en este trabajo, por tal motivo no se descarta la posibilidad de que estos microorganismos puedan tener algún tipo de actividad biológica diferente a la indagada en esta investigación.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la presente investigación, de los nueve microorganismos endófitos utilizados frente al fitopatógeno *Aspergillus niger* se observó que el hongo *Nigrospora sp.* evidenció el mayor porcentaje de inhibición; mientras, que frente al dermatofito *Microsporum canis*, en este caso todos presentaban un buen grado de antagonismo cercano y próximo al 50%.

Para la prueba de antagonismo frente a las bacterias patógenas y *Candida albicans*, se evidenció que todas las muestras de hongos endófitos presentaba actividad inhibitoria.

No se pudo determinar la actividad antimicrobiana, por la técnica Excavación-Placa-Cultivo en ninguno de los extractos acuosos, pero considerando los resultados de la actividad antagónica, es muy probable que pudieran estar produciendo metabolitos en otros medios de cultivo no ensayados.

El método de producción de metabolitos biológicamente activos necesita ser estandarizado ya que en esta investigación no se evidenció ningún efecto inhibitorio de algún tipo de sustancia con algún efecto antimicrobiano; lo ideal sería ensayar con una cepa conocida de la cual se conozca la actividad biológica, lo cual nos permitiría mejorar y

comprobar la producción de sus metabolitos, así como la estandarización del método y medio de producción de metabolitos.

Este tipo de endófitos fúngicos en nuestra región son un grupo de organismos con una investigación pobre y que representan una fuente abundante y confiable de compuestos bioactivos y químicamente nuevos con el potencial para la explotación en una gran variedad de áreas medicas, agrícolas e industriales.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Alippi H, Monaco C, 1990. Antagonismo de hongos fitopatógenos y saprobios en suelos hortícolas. *Revista Argentina de Microbiología* 22: 90-93.

Arnold E, Mejía L, Kylló D, Rojas E, Maynard Z, Robbins N, Allen, A, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. A. Journal List: Proc Natl Acad Sci U S A: v.100(26).

Bacon CW, Porter JK, Corred WP, Leslie JF, 1996. Production of Fusaric Acid by *Fusarium Species*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4039-4043.

Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M, 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Iberoam Micol* 15, 69-74.

Brock T, Madigan M, 1993. *Microbiología*. Sexta edición, Editorial Prentice Hall, México.

Cabello MA, Platas G, Collado J, Díez T, Martín I, Vicente F, Meinz M, Onishi JC, Douglas C, Thompson J, Kurtz MB, Schwartz RE, Bills GF, Giacobbe RA, Abruzzo GK, Flaterry AM, Kong L, Peláez F, 2001. Arundinfungin, a novel antifungal compound produced by fungi: biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Int Microbiol* 4, 93-102.

Camporese A., Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, De Simona F, and Tubazo A, 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *J. Ethnopharmacol.*, 2003. 87, 103-107.

Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G, 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Iberoam Micol* 18, 2-5.

Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condrón M, Teplow DB, Stevens D, Yaver D, 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* 148, 2675-2685.

Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Puglia AM, 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology* 99, 187-198.

Ezra D, Castillo UF, Strobel GA, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Condrón MA, Teplow DB, Sears J, Maranta M, Hunter M, Weber B, Yaver D, 2004a. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* 150, 785-793.

Ezra D, Hess WM, Strobel GA, 2004b. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* 147, 2943-1950.

Fernández-Larrea O, 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 62 p. 96-100.

Flechter A, 1984. Physical and chemical Parameters of Microbial Growth. *Advances in Biochemical Engineering* Vol. 30, 7-60. Springer-Verlag.

Gao X, Zhou H, Xu D, Yu C, Chen Y, Qu L, 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters* 249 (2005) 255–266.

Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W, 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31, 163-167.

Kumar DS, Lau CS, Wan JM, Yang D, 2005. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothès*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. *Life Sciences* 78, 147-156.

Li JY, Harper JK, Grant DM, Tombe BO, Bashyal B, Hess WM, Strobel GA, 2001. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexanone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* 56, 463-468.

Lorenzi E, Lorando E, Picco AM, 2006. Microfunghi endofitici ed epifitici di *Picea abies* (L.) Karst. in ambiente naturale ed antropizzato in Lombardia. *Forest* 3, 426-436.

Macarron R, 1992. Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* qm9414. Madrid 1992. Universidad Complutense de Madrid facultad de ciencias biológicas departamento de bioquímica y biología molecular I. Tesis doctoral.

Malaspina V, 2002. Interazione in Vitro tra micromiceti antartici e microrganismi batterici e fungini, ambientali e patogeni, in Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestre Sezione di Micologia. Università degli Studi di Pavia: Pavia. p. 120.

Mann J, 2001. Natural products as immunosuppressive agents. *The Royal Society of Chemistry* 18, 417-430.

Marquina D, 1991. Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de hongos celulolíticos. Universidad Complutense de Madrid.

Facultad de biología. Departamento de microbiología.

Méndez S, Mondino P, 1999. CONTROL BIOLÓGICO POSTCOSECHA EN URUGUAY. Horticultura Internacional. Noviembre de 1999, Año 7, nº 26.

Mönckeberg F, 1988. "La Revolución de la Bioingeniería", Editorial Mediterráneo)

Osterhage C, 2001. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi.

Picco AM, Rodolfi M, 2004. Endophytism in grasses with reference to an experience in northern Italy. In "Endophytism in forest tree". A. Ragazzi, S. Moricca, I. Dellavalle (eds.) Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, Italy: 205-219

Phongpaichit S, Nikom J, Rungjindamai N, Sakayaroj J, Hutadilok-Towatana N, Rukachaisirikul V, Kirtikara K, 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. FEMS Immunol Med Microbiol 51: 517–525.

Radu S, Yoke C, 2002. PRELIMINARY SCREENING OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM MEDICINAL PLANTS IN MALAYSIA FOR ANTIMICROBIAL AND ANTITUMOR ACTIVITY.

Malaysian Journal of Medical Sciences, Vol. 9, No. 2, (23-33).

Ramírez J, Delgado E, Rodolfi M, Solveig T, 2006. ACTIVIDAD ANTAGONICA DE HONGOS ENDOFITOS DE PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR SOBRE BACTERIAS PATOGENAS. Boletín Micológico Vol. 21: 49 - 53.

Rodríguez V, 2002. Efecto Antagónico Y Biocontrolador De Algunos Microorganismos Saprofiticos Contra Rhizoctonia Solani Un Fitopatógeno Causante Del (Damping Off) En Plantas De Tomate.

Salgado C, Cerero MC, 2005. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. Rev Iberoam Micol 22, 99-101.
Schwarz M, Köpcke B, Weber R, Sterner O, Anke H, 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. Phytochemistry 65, 2239–2245.

S.E.I.M.C. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Protocolos Clínicos S.E.I.M.C [website] [cited 2006 25/07/06]; Available from: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap1.pdf>.

Siegel MR, Bush LP, 1997. Toxin production in grass/endophyte associations. In "The Mycota. Vol. V Plant Relationships Part.A". GC Carrol and P Tudzynski (eds), Springer, Heidelberg, Germany: 185-207.

Sohrab H, 2005. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Endophytic Fungi and the Plant *Prismatomeris tetrandra* and Synthesis of (+)-Ochromycinone. Paderborn

Stinson M, Ezra D, Hess WM, Sears J, Strobel G, 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Science 165, 913-922.

Strobel G, 2002. Microbial gifts from rain forests. Can. J. Plant Pathol. 24: 14–20.

Strobel G, Daisy B, 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, p. 491–502 Vol. 67, No. 4.

Suay I, Asensio FJ, Basilio A, Cabello MA, Díez MT, García JB, Gonzales del Val A, Gorrochategui J, Hernández P, Pelaéz F, Vicente MF, 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. Antoine van Leeuwenhoek, 78: p. 129-139.

Tan RX, Zou WX, 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *The Royal Society of Chemistry* 18, 448-459.

Trigos A, Mendoza G, Luna M, Heredia G, y Arias R, 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología* 20.

Vicente MF, Cabello A, Platas G, Basilio A, Díez MT, Dreikorn S, Giacobbe RA, Onishi JC, Meinz M, Kurtz MB, Rosenbach M, Thompson J, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Tsipouras A, Wilson KE, Peláez F, 2001. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Applied Microbiology* 96, 806.

Wang H, Jones C, Ciacci-Zanella J, Holt T, Gilchrist DG, Dickman MB, 1996. Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Biochemistry* 93, 3461-3465.