

## Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de micromicetos tropicales contra fitopatógenos

Antimicrobial evaluation of extracts obtained from tropical micromycetes against phytopathogens

Moreno Pérez P<sup>1,3</sup>, M Gamboa Angulo<sup>1</sup>, G Heredia<sup>2</sup>, B Canto Canché<sup>1</sup>, CM Rodríguez García<sup>1</sup>, IL Medina Baizabal<sup>1</sup>, L Peraza Echeverría<sup>1</sup>

**Resumen.** En la actualidad, es altamente necesario encontrar nuevos y más seguros productos agroquímicos. En este sentido, los micromicetos son una fuente importante de productos naturales los cuales pueden ser usados en el control de enfermedades vegetales. Con el objetivo de contribuir a la búsqueda de productos con aplicaciones antimicrobianas, un total de 49 cepas fúngicas fueron aisladas de dos cenotes de la península de Yucatán. Estas cepas se cultivaron en arroz fermentado, se obtuvieron sus respectivos extractos orgánicos macerados en acetato de etilo (EAE) y metanol (EM) y se evaluaron contra cinco fitopatógenos de importancia agrícola. Estos patógenos incluyeron a los hongos *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* y las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*, utilizando el bioensayo en microdilución. El 69% de los extractos fúngicos evaluados mostraron actividad antifúngica y/o antibacteriana contra al menos uno de los patógenos evaluados a concentraciones de 2000 y 200 µg/mL, respectivamente. Las cepas de *Penicillium* sp. OSE-61, *Fusarium* sp. OH2-30, *Hypocrea lixii* OSN-37 y *Rhizoctonia solani* OSE-73 mostraron actividad contra al menos tres de los fitopatógenos en estudio. Los extractos de EAE más promisorios fueron particionados obteniendo tres fracciones de baja (A), media (B) polaridad y un precipitado (C), los cuales fueron evaluados contra los patógenos estudiados. La fracción A de *Fusarium* KS-15 fue la más efectiva presentando la más baja Concentración Mínima Inhibitoria (MIC ≤25 µg/mL) y efecto bactericida contra *X. campestris*. La fracción B de *Penicillium* sp. OSE-61 contra *A. chrysanthemi* fue relativamente mayor (MIC ≤500 µg/mL); mientras la fracción B de *H. lixii* OSN-37 mostró efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis* (MIC = 1000 µg/mL). Esta investigación contribuye a enriquecer el conocimiento sobre la actividad biológica de hongos anamórficos nativos de los cenotes de Yucatán y su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas en la agricultura.

**Palabras clave:** Bioensayos; Extractos fúngicos; *Fusarium*; *Hypocrea*; Micromicetos; *Penicillium*, Cenotes.

**Abstract.** Nowadays, it is highly necessary to find more and safer agrochemicals. In this sense, micromycetes are an important source of natural products which could be used to control plant diseases. Therefore with the aims to contribute in this searching of natural products with antimicrobial applications, a total of 49 fungal strains were isolated from the Yucatan Peninsula. These fungi were cultured in fermented rice, their respective organic extracts macerated in ethyl acetate (EAE) and methanol (ME) were obtained and tested against five fungal pathogens of agricultural importance. These included *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, and the bacteria *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas campestris* using microdilution assays. The 69% of fungal extracts showed antifungal or antibacterial (2000 and 200 µg/mL, respectively) against at least one of the tested target. Strains *Penicillium* sp. OSE-61, *Fusarium* sp. OH2-30, *Hypocrea lixii* OSN-37 and *Rhizoctonia solani* OSE-73 showed activity against at least three of the five study pathogens. The most active EAE were partitioned, and its low (A), medium (B) polarity and precipitated (C) were obtained and assessed. The fraction A from *Fusarium* KS-15 displayed the lowest Minimum Inhibitory Concentration (MIC ≤25 µg/mL) and bactericide effect on *X. campestris*; fraction B of *Penicillium* sp. OSE-61 was relatively greater than the previous on *A. chrysanthemi* (MIC ≤500 µg/mL). Last fraction also exhibited good inhibitory effect on *C. gloeosporioides*. Finally, fraction B of *H. lixii* OSN-37 displayed promissory antifungal effect on *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis* (MIC = 1000 µg/mL). This research contributes to enrich the limited knowledge on the biological activity of native anamorphic fungi of the sinkholes of Yucatan and its potential use in biotechnological applications in agriculture.

**Keywords:** Bioassays; Fungal extracts; *Fusarium*; *Hypocrea*; Microfungi; *Penicillium*, Sinkholes.

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México.

<sup>2</sup> Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A.C., Km 2.5 antigua carretera a Coatepec No. 351, Xalapa 91070, Veracruz, México.

<sup>3</sup> Laboratorio de microbiología médica y ambiental. Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto Literario # 100. Col. Centro C.P. 50000. Toluca, Estado de México.

Address correspondence to: Marcela Gamboa-Angulo, e-mail: mmarcela@cicy.mx

Received 8.II.2015. Accepted 12.VII.2015.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, una necesidad reconocida es la reducción en el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura con la finalidad de evitar el colapso de los ecosistemas. Este efecto adverso impacta negativamente en el bienestar de la población humana. Una alternativa viable es el uso de productos de origen natural, tales como los compuestos químicos obtenidos a partir de diversos microorganismos, los cuales representan una fuente abundante de compuestos novedosos y con diversas propiedades biológicas (Cantrell et al., 2012; Demain y Sanchez, 2009). Un ejemplo son los extractos fúngicos de *Colletotrichum dematium* con actividad inmunosupresora y antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia* sp. (Strobel et al., 2011). Las investigaciones en este campo se han visto incrementadas durante los últimos años, a fin de descubrir nuevos productos naturales efectivos en el control de enfermedades de las plantas.

En la Península de Yucatán han sido aislados micromicetos cuyos extractos y compuestos puros poseen efecto antifúngico contra diversos microorganismos patógenos. Entre los extractos de los micromicetos aislados podemos mencionar a los obtenidos a partir de *Muscodor yucatanensis*, un hongo endófito de las hojas de *Bursera simaruba*, que libera compuestos orgánicos volátiles con efectos antimicrobianos contra *Alternaria solani*, *Guignardia mangifera*, *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Rhizoctonia* sp. Otro ejemplo lo constituye el extracto obtenido a partir de *Edenia gomezpompae* que sintetiza preusomerina EG1 y preusomerina EG2, ambos compuestos presentan propiedades inhibitorias contra los hongos *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp. (Macías-Rubalcava et al., 2008; 2010).

En estudios exploratorios previos, realizados por nuestro grupo de investigación en áreas tropicales del sureste de México se detectaron e identificaron micromicetos con la propiedad de producir metabolitos capaces de controlar fitopatógenos de importancia agrícola. Entre estos micromicetos, se pueden mencionar a las cepas de *Beltrania rhombica* TH26, *Fusarium* sp. XH1Ga y varios aislados no identificados (TA53, TH34, 2TA2, 2TA6, 2TS6, 2XA7), los cuales mostraron actividad antimicrobiana contra los hongos *Alternaria tagetica*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y varias bacterias zoo y fitopatógenas. Los resultados demostraron la evidente actividad biológica de algunos de los extractos fúngicos, justificando la continuidad de la investigación en estas regiones (Reyes-Estebanez et al., 2011; Gamboa-Angulo et al., 2012). En el presente trabajo el objetivo se dirigió a la búsqueda de microorganismos que producen metabolitos con efecto antimicrobiano contra cinco fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia comercial. Para esto, 98 extractos orgánicos obtenidos de micromicetos aislados de dos cenotes del estado de Yucatán se probaron contra los hongos fitopatógenos *Alternaria chrysanthemii*, *C. gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis*,

y las bacterias *Erwinia carotovora* y *Xanthomonas campestris*; los extractos más activos se fraccionaron y se determinaron sus concentraciones mínimas inhibitorias (MIC, por sus siglas en inglés).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Micromicetos.** Las especies fúngicas fueron aisladas a partir de hojarasca sumergida en los cenotes Kikal (20° 34' 59" N, 89° 10' 49" O) y Oxola (20° 40' 41" N, 89° 14' 30" O) del municipio de Homún, Yucatán. Estas especies se encuentran en el cepario de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

**Cultivo de los hongos saprófitos y extracción orgánica.** Una suspensión de esporas ( $1 \times 10^5$  esporas/mL) de cada cepa se inocularon en arroz fermentado y se incubaron a  $25 \pm 2$  °C con fotoperiodo de 12/12 horas de luz/oscuridad (Soman et al., 2001). A los 40 días de cultivo se congelaron y liofilizaron. Posteriormente, estos se molieron y las extracciones se realizaron por maceración a temperatura ambiente con acetato de etilo en tres ocasiones (24 horas, cada vez) y posteriormente con metanol una vez (24 horas) bajo las mismas condiciones. Los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a 40 °C bajo presión reducida, obteniéndose los correspondientes extractos orgánicos secos de acetato de etilo (EAE) y metanol (EM) de cada una de las cepas.

**Identificación molecular de los hongos.** Las especies de hongos cuyos extractos mostraron actividad antifúngica se sometieron a análisis molecular para su identificación taxonómica siguiendo la técnica descrita previamente por Reyes-Estebanez et al. (2011). Las secuencias se compararon en las bases de datos públicas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Fitopatógenos evaluados.** Los extractos orgánicos se evaluaron contra los hongos *A. chrysanthemii* (CICY004) aislado de *Chrysanthemum morifolium*, *C. gloeosporioides* (CICY005) aislado de *Carica papaya* L., *M. fijiensis* (CI233, IMI 392976) aislado de *Musa acuminata*, la bacteria *E. carotovora* (ATCC138) y *X. campestris* aisladas de *Daucus carota* (ATCC10547). Los hongos fueron aislados y mantenidos en medio de cultivo papa dextrosas agar (PDA) y las bacterias en agar Mueller Hinton (MHA), ambos de la marca Bioxon®.

**Evaluación antimicrobiana por el método de microdilución en placa**

**Hongos fitopatógenos.** El ensayo se realizó en placas de 96 micropozos, siguiendo la técnica modificada de Andrews (2001). Los extractos orgánicos fúngicos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 40 µg/µL. A todos los pozos se le adicionaron 90 µL de medio RPMI 1640

(Roswell Park Memorial Institute) y 10  $\mu\text{L}$  de los extractos fúngicos a evaluar (400  $\mu\text{g}$ ). Finalmente, todos los pozos se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas del hongo fitopatígeno: *A. chrysanthemi* ( $2.5 \times 10^4$ ), *C. gloeosporioides* ( $1 \times 10^5$ ), *M. fijiensis* ( $5 \times 10^4$ ), para obtener un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , con una concentración final de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto fúngico y 5% del DMSO. Como control de crecimiento (control negativo) se utilizó el medio RPMI-1640, la suspensión de esporas del fitopatígeno en evaluación y DMSO al 5%; y como control de inhibición del crecimiento (control positivo) Mirage (Procloraz, 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) para *A. chrysanthemi* y *C. gloeosporioides*, y nitrato de miconazol al 0,15% para *M. fijiensis*. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Las microplacas se incubaron por 96 horas a 26 °C y 16/8 horas de luz/obscuridad. Las lecturas se realizaron de manera visual mediante la escala numérica (0, 1, 2, 3, 4) establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS, 2002). Estos se reportan como porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) de acuerdo al crecimiento (0 = 100, 1 = 75, 2 = 50, 3 = 25, 4 = 0% de IC).

Los extractos de EAE que presentaron mayor actividad antimicrobiana se fraccionaron con hexano-acetonitrilo tres veces, en la primera extracción en una proporción de 2:1, 1:1, 1:1, de la mezcla. Los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a 40 °C bajo presión reducida. De esta forma se obtuvieron tres fracciones de cada EAE, de baja polaridad o hexánica (A), de media polaridad o de acetonitrilo (B) y en la mayor parte de los casos un precipitado (C). Las fracciones A, B, C, junto con los EM se evaluaron en una serie de tres diluciones para determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés), a una concentración final de 1000, 500 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la muestra y a 2,5; 1,25; 0,62% de DMSO. La concentración más baja a la que no se encontró crecimiento fúngico se le consideró la concentración mínima inhibitoria (CMI). Estos se sembraron en medio nuevo y se monitorearon por una semana. La presencia de crecimiento indico un efecto fungistático y la ausencia efecto fungicida (Taylor et al., 1983).

**Bacterias fitopatógenas.** Las bacterias *E. carotovora* y *X. campestris* se inocularon en Caldo Müeller-Hinton (CMH) y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los cultivos se ajustaron en CMH por comparación visual con el tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland a una concentración final aproximada de  $5 \times 10^6$  ufc/mL. Los extractos fúngicos evaluados se disolvieron en DMSO a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A todos los pozos se le adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de medio CMH estéril y 10  $\mu\text{L}$  de los extractos activos (40  $\mu\text{g}$ ). Posteriormente, se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de la bacteria patógena; la concentración final del extracto fúngico fue de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,5% de DMSO. Como control negativo se utilizó DMSO (5  $\mu\text{L}$ ) y como control positivo amikacina (5  $\mu\text{g}$ ). Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron por 18 horas a 37 °C para

ambas bacterias. A las 24 horas de incubación se adicionaron a cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de 2,3,5-cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) al 1%. La ausencia de color (formazán) indicó la no reducción del compuesto por las bacterias, lo cual sugiere la muerte de éstas (aunque no necesariamente de acuerdo a Busso et al., 2015). La lectura se realizó de manera visual como se describió para los hongos fitopatógenos (NCCLS, 2002) y se reportan como inhibición del crecimiento (IC).

Las fracciones hexánicas, de acetonitrilo y los EM activos se evaluaron en diluciones seriadas de 100, 50 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto y de 2,5; 1,25 y 0,62% de DMSO. La concentración más baja a la que no se encontró crecimiento microbiano se le consideró la MIC.

A las 24 horas de incubación, una alícuota de cada pozo que no presentó crecimiento, es decir, sin coloración después de aplicar el TTC, se transfirió a cajas con medio agar soya tricapséina y se incubó a 37 °C. A las 24 horas se verificó la presencia o ausencia de crecimiento siendo catalogado como efecto bactericida o bacteriostático, respectivamente (Taylor et al., 1983).

## RESULTADOS

Entre los 98 extractos fúngicos evaluados, 49 de acetato de etilo y 49 de metanol, el 69% mostró efecto antimicrobiano (% IC  $\geq$  50) contra al menos uno de los patógenos evaluados (Tabla 1). El hongo fitopatígeno más sensible fue *A. chrysanthemi*, cuyo crecimiento fue inhibido por 42 de los extractos evaluados. Entre estos extractos, se pueden mencionar los EAE y EM de *Fusarium* sp. OH2-30, los EM de *Scopulariopsis* sp. KS-18 y las cepas no identificadas KR-14 y OSE-43, los cuales fueron capaces de inhibir en un 75% el crecimiento de *A. chrysanthemi*. La cepa *M. fijiensis* fue inhibida por siete de los extractos estudiados, donde el más efectivo correspondió al EM de *Penicillium* sp. OSE-61 (IC = 75%). Para *C. gloeosporioides*, seis extractos fueron capaces de inhibir su desarrollo (IC = 50%).

Entre las dos bacterias evaluadas, *E. carotovora* mostró mayor resistencia, ya que solo seis extractos inhibieron su crecimiento en un 75%, entre los que se destacaron los extractos obtenidos a partir de las cepas de *Fomitopsis meliae* KSE-64, *Fusarium* sp. KS-15, *Penicillium* sp. KE-83, las no identificadas OH2-22 y KE-85. En contraste, 17 extractos fúngicos fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de *X. campestris* (IC = 100%), de los cuales seis correspondían a cepas de *Fusarium solani* OE-80, *Hypocrea liixi* OSN-37, *Pseudorobillarda sojae* OSN-36, las no identificadas OSE-41, OSE-53 y OSN-78 con efecto bactericida (Tabla 1).

En general, las cepas de *Fusarium* sp. OH2-30, *H. liixi* OSN-37, *Penicillium* sp. OSE-61 y *Penicillium* sp. KE-83 demostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de tres o más fitopatógenos. En particular, los EAE de *F. meliae* KSE-64 y *Penicillium* sp. KE-83 exhibieron los más altos efectos antimicrobianos contra las bacterias estudiadas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Extractos de hongos saprófitos de cenotes de la Península de Yucatán con actividad inhibitoria del crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenos, evaluados a una concentración de 2000 y 200 µg/mL, respectivamente.

**Table 1.** Extracts from saprophytic fungi from sinkholes of the Yucatan Peninsula with growth inhibition activity on fungal and bacterial phytopathogens, tested to 2000 and 200 µg/mL, respectively.

Cepa fúngica	Extracto	Porcentaje de inhibición del crecimiento				
		<i>Alternaria chrysanthemi</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Mycospaberella fijiensis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Bionectria ochroleuca</i> OE-81	AcOEt	0	0	0	0	100*
	MeOH	0	0	100	0	75
<i>Cladosporium</i> sp. KH-09	AcOEt	50	0	0	50	0
	MeOH	50	0	0	50	0
<i>Fomitopsis meliae</i> KSE-64	AcOEt	0	0	75	0	100*
	MeOH	0	0	75	0	0
<i>Fusarium solani</i> OE-80	AcOEt	0	0	0	0	100*
	MeOH	0	0	0	0	100**
<i>Fusarium</i> sp. KS-15	AcOEt	0	0	0	0	100*
	MeOH	0	0	75	0	0
<i>Fusarium</i> sp. OH2-30	AcOEt	75	50	0	0	100*
	MeOH	75	0	0	0	100*
<i>Hypocrea lixi</i> OSN-37	AcOEt	0	50	0	50	100*
	MeOH	0	25	0	25	100**
<i>Penicillium</i> sp. OSE-61	AcOEt	50	50	0	0	0
	MeOH	50	50	0	75	100*
<i>Penicillium</i> sp. KE-83	AcOEt	0	0	75	50	100*
	MeOH	0	0	0	50	100*
<i>Pseudorobillarda sojae</i> OSN-36	MeOH	0	0	0	0	100**
<i>Rhizoctonia solani</i> OSE-73	AcOEt	50	50	0	0	0
	MeOH	50	50	0	0	0
No identificada OSN-38	AcOEt	50	0	0	0	0
	MeOH	50	0	0	0	100**
No identificada OSE-53	AcOEt	50	0	0	0	100**
No identificada OSN-78	AcOEt	0	0	0	0	100*
	MeOH	0	0	0	0	100*

Se presentan los extractos que mostraron inhibir al menos uno de los patógenos en porcentajes de inhibición del crecimiento >50%, y al menos dos patógenos al 50%. \* Bacteriostático \*\* Bactericida

\*Bacteriostatic \*\*Bactericide

Para determinar la polaridad (baja, media o alta) de los metabolitos antimicrobianos presentes en los extractos más activos, se seleccionaron diez de los EAE y se partitionaron entre hexano (A) y acetonitrilo (B). Estos extractos seleccionados incluyeron a los obtenidos de las cepas *Bionectria ochroleuca* OE-81, *F. meliae* KSE-64, *F. solani* OE-80, *Fusarium* sp. KS-15, *Fusarium* sp. OH2-30, *H. lixi* OSN-37, *Penicillium* sp. OSE-61, *Penicillium* sp. KE-83, *Rhizoctonia solani* OSE-73 y la cepa no identificada OSE-53, junto con los EM de las cepas no identificadas OSN-38 y OSN-78. Contrario a lo esperado, solo la

fracción B de *Penicillium* sp. OSE-61 limitó el crecimiento de *A. chrysanthemi* con una MIC de 500 µg/mL. Por otra parte, las fracciones B de *H. lixi* OSE 37 y de *Fusarium* sp. OH2-30 mostraron efectividad en el crecimiento de *C. gloeosporioides* (MIC = 1000 µg/mL para ambas). La fracción B de *H. lixi* OSE-37 fue la única capaz de inhibir a *M. fijiensis* (MIC = 1000 µg/mL). Todos los extractos antes mencionados tuvieron efecto fungiestático sobre las cepas fitopatógenas.

Las más bajas MIC's contra la bacteria *E. carotovora* se observó con los EM de *F. solani* OE-80 e *H. lixi* OSN-37

(100 y 50 µg/mL, respectivamente); y contra *X. campestris* seis fracciones exhibieron efecto bactericida, donde las más promisorias fueron la fracción hexánica de *Fusarium* sp. KS-15 ( $\leq 25$  µg/mL) y la de media la no identificada OSE-53 ( $\leq 50$  µg/mL) (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

En general, los resultados de la evaluación de los 98 extractos orgánicos obtenidos de hongos microscópicos aislados de dos cenotes de Yucatán mostraron que más del 50% presentó actividad antimicrobiana contra al menos uno de los fitopatógenos evaluados. El efecto inhibitorio de los extractos fúngicos contra los hongos fitopatógenos fue del 46,9% y contra las bacterias del 34,6% (Tabla 1), lo cual coincide con la actividad antimicrobiana reportada con hongos aislados de otros cenotes cercanos a la costa (Gamboa-Angulo et al., 2012) y de hojarasca (Reyes-Estebanez et al., 2011).

La actividad más notable contra las bacterias fitopatógenas se detectó con la fracción de acetonitrilo de *Fusarium* sp. KS-15 con efecto bactericida, así como las fracciones de *F. solani* OE-80 con efecto bactericida contra *X. campestris* con una MIC  $\leq 25$  µg/mL. Lo anterior coincide con el reporte de Hateet et al. (2014) quienes evaluaron los EAE de esta especie, aislada como endófito de *Taxus baccata*, contra *E. coli* y *S. aureus*. Los análisis químicos de sus extractos indicaron la presencia de taninos, compuestos fenólicos y flavonoides. Otros estudios con la especie *F. solani* reportan la presencia de actividad antimicrobiana contra otros patógenos clínicos (Tayung et al., 2011). El tercer *Fusarium* con actividad significativa fue *Fusarium* sp. OH2-30, cuya fracción de media polaridad inhibió a *C. gloeosporioides* con una MIC de 1000 µg/mL (Tabla 2). En estudios previos, de estas tres cepas, únicamente *F. solani* OE-80 demostró efecto antagonista contra *Corynespora cassicola*, *C. gloeosporioides*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* sp. (Moreno Pérez et al., 2014). Aunque pertenecen al mismo género, sus perfiles biológicos son diferentes, siendo también obtenidos de diferentes cenotes. Lo anterior sugiere que también sus metabolitos secundarios y/o enzimas y proteínas producidos para su defensa serán diferentes. Recientemente Musavi y Balakrishnan (2014) evaluaron el potencial efecto antimicrobiano de los extractos de *F. oxysporum* NFX 06 aislado de hojas de *Nothapodytes foetida*, descubriendo actividad contra las bacterias *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *C. albicans*.

Interesantemente, el crecimiento de *M. fijiensis* se inhibió únicamente ante las fracciones A, B y C de *H. lixii* OSN-37, con la MIC más baja a 1000 µg/mL con la fracción B, siendo fungistático. La capacidad biocontroladora del género *Trichoderma* contra *M. fijiensis* ha sido documentada por distintos métodos a nivel *in vitro* (Acosta-Suárez et al., 2013), invernadero (Arzate-Vega et al., 2006) e incluso con bio-productos comerciales como Trikofun® (Castro et al., 2015). El presente

trabajo representa la primera contribución de la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* ocasionado por la exposición a un extracto de acetonitrilo obtenido de *H. lixii*. La especie *H. lixii*, estado sexual de *Trichoderma barzianum* (Druzhinina et al., 2011), es comúnmente aislado como hongos saprófitos en tierra y crecen frecuentemente en madera, aunque se encuentran en innumerables sustratos, demostrando su alto potencial oportunista y adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas (Klein & Eveleigh, 1998; Jaklitsch, 2011). El género *Trichoderma* es prolífico en metabolitos secundarios, con más de 100 compuestos reportados (Reino et al., 2008), que incluyen moléculas de bajo peso molecular como pironas, terpenoides, esteroides y policétidos y péptidos no ribosomales como la epipolitiiodioxopiperazinas y sideróforos (Mukherjee et al., 2012). Asimismo, son reconocidos productores de peptaiboles (pequeños péptidos de origen no ribosomal con presencia de aminoácidos no comunes). Se conocen más de 700 secuencias de peptaiboles en *Trichoderma/Hypocrea*; algunos de éstos son ecológica y comercialmente importantes debido a su actividad antimicrobiana y propiedades anti-cancerígenas (Degenkolb et al., 2008). Del género *Hypocrea* se ha reportado actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *F. oxysporum* (Gogoi et al., 2008) y de sus EAE se han detectado compuestos con actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* IMI 242684 (Jantarach y Thanaboripat, 2010). En estudios previos Moreno-Pérez et al. (2014) reportaron el efecto antagonista de la cepa de *H. lixii* OSE-37 con los fitopatógenos *C. cassicola*, *Curvularia* sp., *Fusarium* spp. y *C. gloeosporioides*.

A pesar de la elevada actividad antimicrobiana detectada en la presente investigación, el crecimiento del hongo *A. chrysanthemi* únicamente fue inhibido ante la fracción B de *Penicillium* sp. OSE-61 ( $\leq 500$  µg/mL). Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura solo se encontró un reporte de la actividad antifúngica de los extractos de hexano y acetato de etilo de *Penicillium* sp. contra *A. flavus* (Thanaboripat et al., 2011).

La actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de micromicetos contra microorganismos fitopatógenos ofrece una alternativa viable para el control de estos patógenos. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrece el control biológico desde un punto vista ecológico, la eficiencia de este método de control generalmente no equivale al control químico mediante la utilización de compuestos químicos (Guetsky et al., 2001). Para superar esta problemática, Alamri et al. (2012) sugieren utilizar una combinación de agentes químicos (en bajas dosis) y el control biológico. El uso combinado de ambos productos es atractivo debido a la posibilidad de un efecto sinérgico o aditivo contra los microorganismos, aunque en ocasiones pudiera ser antagónico. Coincidiendo con los presentes resultados la cepa *H. lixii* OSE 37 nativa de Yucatán, tiene la capacidad de presentar actividad frente al organismo *in vivo*, así como los extractos obtenidos de ella.

**Tabla 2.** Concentración mínima inhibitoria de extractos de acetato de etilo y fracciones obtenidos de hongos de cenotes de la Península de Yucatán contra hongos y bacterias fitopatógenos en el ensayo en microdilución.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentration of extracts of ethyl acetate and fractions obtained from fungi of sinkholes of the Yucatán Peninsula against phytopathogenic fungi and bacteria on the microdilution assay.

Cepa fúngica	Extracto	Fracción	Concentración mínima inhibitoria µg/mL				
			<i>Alternaria chrysanthemi</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Mycospaberella fijiensis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Bionectria ochroleuca</i> OE-81	AcOEt	A	—	—	> —	—	100 *
		B	—	—	> —	—	50 *
		C	—	—	> —	—	> 100
	MeOH	—	—	100 *	—	200 *	
<i>Fomitopsis meliae</i> KSE-64	AcOEt	A	—	—	> 100	—	100 *
		B	—	—	> 100	—	> 100
		C	—	—	> 100	—	> 100
<i>Fusarium solani</i> OE-80	AcOEt	A	—	—	—	—	≤ 25 *
		B	—	—	—	—	≤ 25 *
		C	—	—	—	—	> 100
	MeOH	—	—	100 *	—	200 **	
<i>Fusarium</i> sp. KS-15	AcOEt	A	—	—	> 100	—	≤ 25 **
		B	—	—	> 100	—	50 *
		C	—	—	> 100	—	> 100
	MeOH	—	—	> 100	—	—	
<i>Fusarium</i> sp. OH2-30	AcOEt	A	—	2000 *	—	—	> 100
		B	—	1000 *	—	—	100 *
		C	—	> 2000	—	—	> 100
	MeOH	—	—	—	—	200 *	
<i>Hypocrea lixi</i> OSN-37A	AcOEt	A	—	<sup>a</sup> 2000 *	—	> 1000 **	≤ 25 *
		B	—	<sup>a</sup> 1000 *	—	1000 **	50 *
		C	—	<sup>a</sup> 2000 *	—	> 2000	50 *
	MeOH	—	> <sup>a</sup> 2000	50 *	—	> 100	
<i>Penicillium</i> sp. OSE-61	AcOEt	A	> 2000	—	—	—	—
		B	≤ 500 *	—	—	—	—
		C	> 2000	—	—	—	—
	MeOH	—	—	> 200	—	200 *	
<i>Penicillium</i> sp. KE-83	AcOEt	A	—	—	> 100	—	> 100
		B	—	—	> 100	—	> 100
		C	—	—	> 100	—	> 100
<i>Pseudorobillarda sojae</i> OSN-36	MeOH	—	—	—	—	200 **	
<i>Rhizoctonia solani</i> OSE-73	AcOEt	A	> 2000	<sup>a</sup> 2000 *	—	—	—
		B	> 2000	> <sup>a</sup> 2000	—	—	—
		C	> 2000	> <sup>a</sup> 2000	—	—	—
No Identificada OSN-38	MeOH	—	—	—	—	200 **	

No Identificada OSE-53	AcOEt	A	—	—	—	—	50 *
		B	—	—	—	—	50 **
		C	—	—	—	—	> 100
No Identificada OSN-78	MeOH	—	—	—	—	200 **	

EtOAc: ethyl acetate extract; MeOH: methanol extract; A: Hexane fraction; B: Acetonitrile fraction; C: Precipitate; \*Bacteriostatic/ Fungistatic; \*\*Bactericide; a: Reported by Moreno-Pérez et al. (2014).

AcOEt: Extracto de acetato de etilo; MeOH: Extracto metanólico; A: Fracción hexánica; B: Fracción de acetonitrilo; C: Precipitado; \*Bacteriostático/ Fungistático; \*\*Bactericida; a: Reportado por Moreno-Pérez et al. (2014).

Los extractos de las cepas *F. solani* OE-80, *Fusarium* sp. KS-15, *H. lixii* OSN-37 y *Penicillium* sp. OSE-61 fueron capaces de inhibir el desarrollo de los microorganismos fitopatógenos estudiados. Estos extractos fúngicos representan una alternativa de control biológico viable. Sin embargo, se requieren estudios ulteriores tanto a nivel *in vitro*, como en invernadero y campo. Los resultados de este trabajo proporcionan evidencia del potencial biotecnológico de los micromicetos que habitan los cenotes de Yucatán.

## AGRADECIMIENTOS

Sergio Pérez y Narcedalia Gamboa por el soporte técnico bibliográfico, a Miguel Tzec por el apoyo en extracción molecular de los hongos saprófitos. A Jairo Cristóbal Alejo por proporcionar algunos hongos fitopatógenos. Al CONACYT (Proyecto No. 2009/131256) por el financiamiento y la beca doctoral otorgada a P.M.P. (CVU No. 209062).

## REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M., T. Pichardo., B. Roque., M. Cruz-Martín., E. Mena., M. Leiva-Mora., R. Castro y Y. Alvarado-Capó (2103). *In vitro* antagonism of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 13: 231-23.
- Alamri, S., M. Mohamed y Y.S. Mostaf (2012). *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science* 17: 155-167.
- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Antimicrobial Agent Chemotherapy* 48: 5-16.
- Arzate-Vega, J., A.C. Michel-Aceves., V.M. Domínguez-Márquez y O.A. Santos-Eméstica (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 98-104.
- Busso, C.A., Y. Torres y L. Ithurrart (2015). The TTC Technique might not appropriately test the physiological stage of plant tissues. *Russian Journal of Plant Physiology* 62: 551-556.
- Cantrell, C.L., F.E. Dayan y S.O. Duke (2012). Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products* 75: 231-1242.
- Castro, R.B., M. Pesántez., P. Lema., J. Quevedo., P. Arichabala y Y. Alvarado-Capó (2015). Potential use of *Trichoderma*-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. *Biocontrol Science and Technology* 25: 481-486.
- Degenkolb, T., H. von Dohren, K.F. Nielsen, G.J. Samuels y H. Bruckner (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemical Biodiversity* 5: 671-680.
- Demain, A.L. y S. Sanchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics* 62: 5-16.
- Druzhinina, I.S., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev y C.P. Kubicek (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9: 749-759.
- Gamboa-Angulo, M., S.C. De la Rosa-García, G. Heredia-Abarca y I.L. Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. *African Journal of Microbiology Research* 6: 2305-2312.
- Gogoi, D.K., S. Mazumder, R. Saikia y T.C. Bora (2008). Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 79-87.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, D. Elad y A. Dinooor (2001). Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91: 621-627.
- Hateet, R.R, T.M. Muhsin & K. J. Humadi (2014). Antibacterial activities secondary metabolites from endophytic fungus *Fusarium Solani*. *Journal of Basrah Researches (Sciences)* 40: 94-101.
- Jaklitsch, W.M. (2011). European species of *Hypocrea* Part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity* 48: 1-247.
- Jantarach, J. y D. Thanaboripat (2010). The efficacy of ethyl acetate extract of *Trichoderma* culture broth on growth inhibition and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* IMI 242684. *KMITL. Journal of Science and Technology* 10: 19-29.
- Klein, D. y D.E. Eveleigh (1998). Ecology of *Trichoderma*. En: Kubicek, C.P. and G.E. Harman (eds), pp. 57-69. *E. Trichoderma and Gliocladium* Vol.1. Taylor and Francis, London, 1998.
- Macías-Rubalcava, M.L., B.E. Hernández-Bautista, F. Oropeza, G. Duarte, M.C. González, A.E. Glenn, R.T. Hanlin y A.L. Anaya (2010). Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscador yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1122-1131.
- Macías-Rubalcava, M.L., B.E. Hernández-Bautista, M. Jiménez-Estrada, M.C. González, A.E. Glenn, R.T. Hanlin, S. Hernández-Ortega, A. Saucedo-García, J.M. Muria-González y A.L. Anaya (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69: 1185-1196.

- Moreno-Pérez, P., M. Gamboa-Angulo, G. Heredia, B. Canto-Canché, M. Rosado-Vallado, I.L. Medina-Baizabal y R. Tapia-Tussell (2014). Antagonistic properties of Micromycetes isolated from sinkholes of the Yucatán peninsula against fungal phytopathogens. *Revista Mexicana de Micología* 40: 1-11.
- Mukherjee, P.K., B.A. Horwitz y C.M. Kenerley (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158: 35-45.
- Musavi, S.F y R.M. Balakrishnan (2014). A study on the antimicrobial potentials of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering* 3: 3-5.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Reino, J.L., R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán y I.G. Collado (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7: 89-123.
- Reyes-Estebanez, M., E. Herrera-Parra, J. Cristóbal-Alejo, G. Heredia-Abarca, B. Canto-Canché, I. Medina-Baizabal y M. Gamboa-Angulo (2011). Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in México. *African Journal of Microbiology Research* 5: 1083-1089.
- Soman, A.G., J.B. Gloer, R.F. Angawi, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (2001). Vertilecanin: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products* 64: 189-192.
- Strobel, G.A., Y. Ren y D.B. Teplow (2011). Endophytic fungi from *Pteromischum* sp. plant, compounds and methods of use. United States Patent Application Publication. US 20130177596A1. Jul. 11, 2013.
- Taylor, P.C., F.D. Schoenknecht, J.C. Sherris y E.C. Liner (1983). Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and significance of technical factors. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 23: 142-150.
- Tayung, K., B.P. Barik, D.K. Jha y D.C. Deka (2011). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere* 2: 203-213.
- Thanaboripat, D., C. Thawai., N. Jindaporn., O. Mathurot y O. Kongniam (2011). Growth inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684 by crude extract of *Penicillium* sp. *KMITL Science and Technology Journal* 11: 79-84.