

# ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE MICROMICETOS MARINOS LIGNÍCOLAS AISLADOS DEL MANGLAR DE PALMAR – PROVINCIA DE SANTA ELENA

*Xavier Álvarez Montero*  
*Nancy Saltos Rosero*  
*Washington Cárdenas*



**Investigación  
Tecnología e Innovación**

Revista de divulgación de la Dirección de Investigaciones y Proyectos Académicos



## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE MICROMICETOS MARINOS LIGNÍCOLAS AISLADOS DEL MANGLAR DE PALMAR – PROVINCIA DE SANTA ELENA

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIGNICOLOUS MARINE MICROMYCETES ISOLATED FROM PALMAR'S MANGROVE – PROVINCIA DE SANTA ELENA

Xavier Álvarez<sup>1</sup>, Nancy Saltos<sup>1</sup>, Washington Cárdenas<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Los hongos marinos constituyen un grupo de microorganismos capaces de biosintetizar metabolitos con estructuras novedosas. Las poblaciones microbianas, en general, producen compuestos que desfavorecen el crecimiento de otras poblaciones. Los antibióticos, producidos de forma natural por estas poblaciones, podrían suministrar beneficios en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal; en este contexto los hongos tropicales se están incorporando a los programas de preselección como potenciales productores de fármacos con nuevos modos de acción. En la presente investigación se establecieron dos protocolos para la evaluación de la bioactividad de hongos marinos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas: extractos fúngicos y discos fúngicos. No se observó bioactividad en los bioensayos de extractos fúngicos de ascomicetos marinos versus las bacterias Gram negativas *Rhodospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. Los métodos de conservación de los extractos fúngicos a 4 y -20°C resultaron adecuados para la conservación, no se observó pérdida de volumen ni cambio en la coloración de los extractos ni ningún otro signo de deterioro, no hubo contaminación bacteriana ni fúngica. En ninguno de los bioensayos de bioactividad de discos fúngicos de ascomicetos marinos versus las bacterias Gram negativas *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *E. coli*<sub>001</sub>, *Klebsiella* sp., *Klebsiella*<sub>001</sub>, y la bacteria Gram positiva: *Staphylococcus* sp., se observó inhibición del crecimiento bacteriano.

**Palabras claves.** Ascomicetos, metabolitos secundarios, bioactividad.

1 Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de Biotecnología & Genética, Av. Juan Tanca Marengo s/n y Av. Raúl Gómez Lince - Teléfono 593 4 282665, e-mail: xalvarezec@gmail.com; saltosnancy@gmail.com

2 Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar , Laboratorio de Biomedicina, e-mail: wbcarden@espol.edu.ec

## SUMMARY

Marine fungi are a group of microorganisms capable of biosynthesized metabolites with novel structures. Generally microbial population produces compounds that work against the growth of other populations. Antibiotics produced naturally by these populations, could provide benefits in the control of diseases, both in aquaculture and in human and animal pathology, in this context tropical fungi are entering in screening programs as potential producers of drugs with new models of action. In the present investigation two protocols were established to evaluate the bioactivity of marine fungi against Gram positive and Gram negative bacteria: fungal extracts and fungal discs. There was no bioactivity in bioassays of fungal extracts of marine ascomycete versus Gram negative bacteria *Rhodospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. Methods of preservation to fungal extracts at 4 and -20°C were suitable for conservation, there was no loss of volume or change in color of the extracts or any other signs of deterioration, there was no fungal or bacterial contamination. None of fungal discs bioassays of marine ascomycetes versus Gram negative bacteria *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *E. coli*<sub>001</sub>, *Klebsiella* sp., *Klebsiella* sp.<sub>001</sub>, and the Gram positive bacterium *Staphylococcus* sp. were observed inhibition of bacterial growth.

**Key words.-** Ascomycetes, secondary metabolites, bioactivity.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la segunda mitad del siglo XX se ha informado sobre cerca de 50 000 productos naturales provenientes de microorganismos, de los cuales aproximadamente más de 10 000, son compuestos biológicamente activos y más de 8 000 son agentes antibióticos y antitumorales (Mahdy, 2004). Los principales productores de estos metabolitos son bacterias del suelo del orden Actinomycetales (Mahyundin, 2008), de cuyos cultivos se han aislado importantes agentes terapéuticos, como estreptomycina, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas.

Las bacterias del suelo siguen siendo estudiadas, pero hay una notable merma en el hallazgo de nuevos productos, estimándose que más de 90% de los cultivos bioactivos descubiertos producen agentes ya informados o son variaciones menores de uno ya descrito (Mahdy, 2004). Por ello, la pesquisa se ha reorientado hacia otros ambientes, como son: los sedimentos de ríos, lagos y océanos, así como plantas y animales acuáticos, que ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Kosta *et al.* 2008). La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos incluyen: antimicrobianos,



anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres, estando algunos de ellos ya en etapa de evaluación clínica (Kosta *et al.* 2008).

Debido a que los ecosistemas acuáticos difieren notablemente de los ecosistemas terrestres, es de esperar que las capacidades metabólicas y fisiológicas de los microorganismos acuáticos sean diferentes a las de sus contrapartes terrestres, lo que ofrece un enorme potencial de descubrimiento de nuevas drogas.

Desde el punto de vista biotecnológico, los hongos marinos constituyen una novedosa fuente de productos biológicamente activos, incluyendo compuestos de interés farmacológico (Mahdy, 2004). De algunos hongos marinos se han obtenido ácidos grasos como oleico, palmítico y linoleico, así como muchos aminoácidos (Damare, 2006). Se ha demostrado que los hongos marinos pueden degradar algunos compuestos del petróleo como el n-hexadecano, 1-hexadecano, pristano y en menor grado n-tetradecano (Damare, 2006).

Debido a estos antecedentes los hongos de hábitat marinos están recibiendo mucha atención en recientes años por la producción de metabolitos secundarios útiles (Punyasloke *et al.* 2006). Las investigaciones en hongos marinos y sus enzimas usadas biotecnológicamente, han estado restringidas a los hongos aislados de hábitat costeros y a enzimas lignocelulíticas, las cuales son aplicadas en la industria del papel y en biorremediación (Raghukumar, 2008).

Investigaciones recientes muestran que los hongos marinos son una importante fuente de metabolitos secundarios bioactivos con estructuras sin precedentes (Zu-Jian, 2008). Reseñas publicadas muestran la importancia de estos microorganismos como una potencial fuente de productos farmacéuticos. Muchos metabolitos de hongos marinos poseen actividad antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, antitumoral, inmuoestimulante, antiviral e inhibidora de la kinasa (Zu-Jian, 2008).

Las investigaciones realizadas por Lin y colaboradores (Lin *et al.* 2002), Chen y colaboradores (Chen *et al.* 2003), Krohn y Riaz (Krohn & Riaz, 2004) revelaron la presencia de metabolitos secundarios provenientes de los hongos marinos, aislados de mangles, entre ellos: *Verruculina enalia* 2606, *Kandelialia candel* 1893 y *Xylaria* sp., con potentes y diversas actividades: antifúngicas, antitumorales, e inhibitorias de la acetilcolina esterasa, respectivamente. Esto es indicativo de que los manglares y los sedimentos asociados a estos ecosistemas, representan microambientes importantes para el aislamiento de hongos marinos productores de metabolitos con actividad antifúngica u otras propiedades bioactivas.

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar la actividad biológica de los extractos y discos fúngico de micromicetos marinos lignícolas del



manglar de Palmar, los que fueron previamente conservados en el laboratorio de Biotecnología & Genética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, para establecer criterios de selección de cepas que presenten características antimicrobianas idóneas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los hongos marinos fueron suministrados por el Laboratorio de Biotecnología & Genética de la Facultad de Ciencias Naturales, estos fueron aislados de material orgánico del mangle *Rhizophora mangle* del manglar de Palmar – provincia de Santa Elena. Las bacterias patógenas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biomedicina de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

### 2.1 Método 1: bioactividad de extractos fúngicos de ascomicetes marinos.

#### 2.1.1 Reactivación de cepas fúngicas.

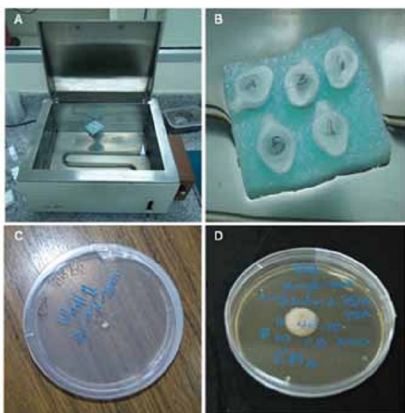


Figura 1. **A)** Reactivación de cepas de *Lulworthia grandispora*, *Verruculina enalia*, *Dactylospora haliotrepha*, *Trichocladium achrasporum* y  $NX_{010}$  en baño maría. **B)** Acercamiento de los viales. **C)** Siembra del vial I. **D)** Crecimiento monospórico a los veinte días.

La reactivación de cepas de *L. grandispora*, *V. enalia*, *D. haliotrepha*, *T. achrasporum* y NX<sub>010</sub> conservadas a -20 °C se llevó a cabo en baño maría a 37 °C durante una hora. El micelio de cada cepa reactivada fue inoculado en medios específicos e incubados a 30 °C hasta el crecimiento de la colonia.

### 2.1.2 Obtención de extractos fúngicos a partir de cultivos envejecidos.

Una vez desarrollada la colonia fue inoculada en medio líquido y colocada en la zaranda rotatoria a 120 rpm durante 60 días a 25 °C.

Se realizó la filtración de los cultivos fúngicos con papel filtro estéril para la obtención del micelio envejecido. El micelio fue pesado en una balanza analítica (6,89 ± 0,9 g) antes del proceso de extracción y después de este (0,8030 ± 0,005 g) (Figura 2).

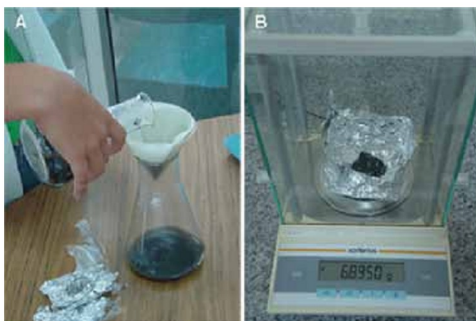


Figura 2. **A)** Filtración del cultivo envejecido. **B)** Obtención del peso del micelio antes de la extracción

Para la obtención de los extractos se evaluaron dos solventes orgánicos en un extractor de Soxhlet: metanol (40 mL), y una mezcla de acetato de etilo más metanol (1:1 v/v) (100 mL). Una vez obtenidos los extractos fúngicos estos fueron trasvasados en Erlenmeyers de 250 mL, sellados con papel parafilm y colocados a 4 °C y -20 °C durante seis meses, posteriormente fueron utilizados para los bioensayos de bioactividad (Figura 3).

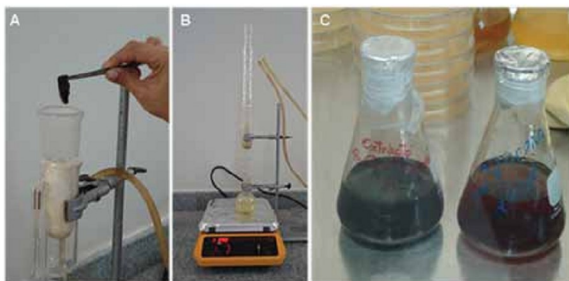


Figura 3. Proceso de extracción en el Soxhlet: **A)** Micelio introducido en el dedal de celulosa. **B)** Extractor de Soxhlet en funcionamiento. **C)** Extractos fúngicos obtenidos.

### 2.1.3. Evaluación de extracto fúngicos.

Las pruebas antibacterianas se llevaron a cabo según el método estándar de antibiograma descrito por Bauer (Bauer *et al.* 1966). Las cinco cepas de hongos marinos fueron evaluados contra dos cepas de bacterias halófilas Gram negativas, de los géneros *Rhodospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp.

En un tubo Eppendorf se colocó 1 mL de medio KING (*Pseudomonas* Agar) específico para *Pseudomonas* sp., y en otro tubo se colocó 1 mL de medio MY (Moraine & Rogovin, 1966) específico para *Rhodospirillum* sp. (Figura 4).

Con un asa de inoculación se sembró cada una de las bacterias en su medio específico y se le aplicó vortex al tubo hasta que el inoculo bacteriano se disgregara y homogenizara con el medio.

Luego, se agregaron 100  $\mu$ L de cada suspensión bacteriana en las placas con los medios específicos, y con un asa de Drigalski se diseminó por toda la placa hasta conseguir una fina película.

Un mililitro de cada extracto fúngico fue colocado en tubos Eppendorf individuales. A cada disco de papel filtro (MN 617) de 10 mm de diámetro se le aplicaron 17  $\mu$ L de extracto, con una pinza fina se colocaron 4 discos con el mismo extracto por cada placa previamente inoculada con las bacterias a evaluarse. Las placas fueron colocadas en la incubadora durante 48 horas a 30 °

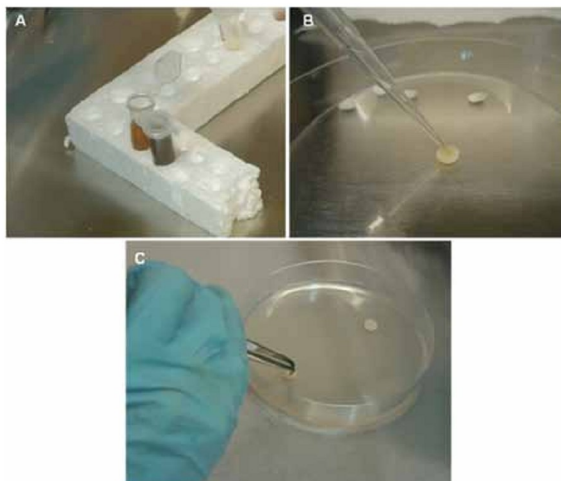


Figura 4. **A)** Extractos fúngicos en tubos Eppendorf para su evaluación. **B)** Diecisiete  $\mu\text{L}$  de extracto fúngico aplicados a discos de papel filtro (10 mm  $\Phi$ ). **C)** Discos de papel filtro con los extractos fúngicos colocados en el cultivo bacteriano.

Como control se utilizaron discos de papel filtro con 17  $\mu\text{L}$  de metanol y una mezcla de acetato de etilo más metanol (1:1; v/v).

## 2.2. Método 2: bioactividad de discos fúngicos.

### 2.2.1. Reactivación de cepas bacterianas.

La reactivación de las cepas de *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella*<sub>001</sub>, *Escherichia coli*, *E. coli*<sub>001</sub> y *Enterobacter sp.* conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se realizó en medio de cultivo LB (Lenox Agar). Con la punta de una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  se picó la cepa bacteriana congelada y se sembró directamente en placas de LB por agotamiento. Las bacterias fueron llevadas a incubación a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Figura 5).



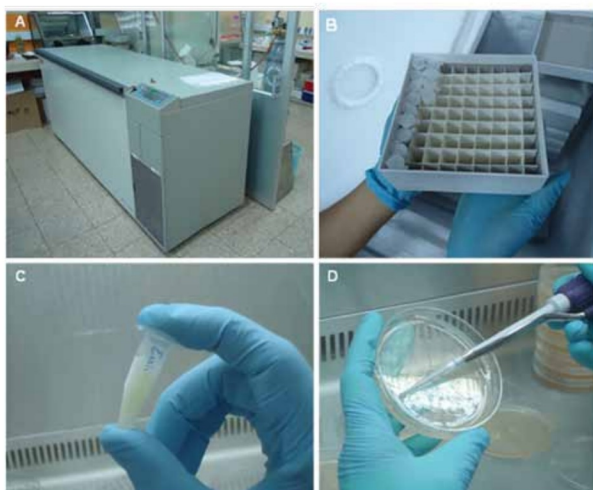


Figura 5. Activación de bacterias patógenas: **A)** Equipo de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para conservación. **B)** Bacterias patógenas conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . **C)** *Escherichia coli* previa a su siembra. **D)** Siembra de *Escherichia coli* en medio LB.

### 2.2.2. Evaluación del crecimiento de hongos y bacterias a distintas salinidades.

Para poder evaluar los discos fúngicos y su bioactividad hubo que establecer un medio de cultivo y una concentración de salinidad en la que ambos microorganismos puedan crecer sin que se vea afectad su metabolismo. La siembra y evaluación del crecimiento de las bacterias y hongos marinos se realizó en medio de cultivo PDA preparado a las siguientes salinidades: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32‰. (Figura 6).

El crecimiento de las colonias de hongos marinos fue evaluado durante 20 días, y el de las bacterias durante 24 horas.

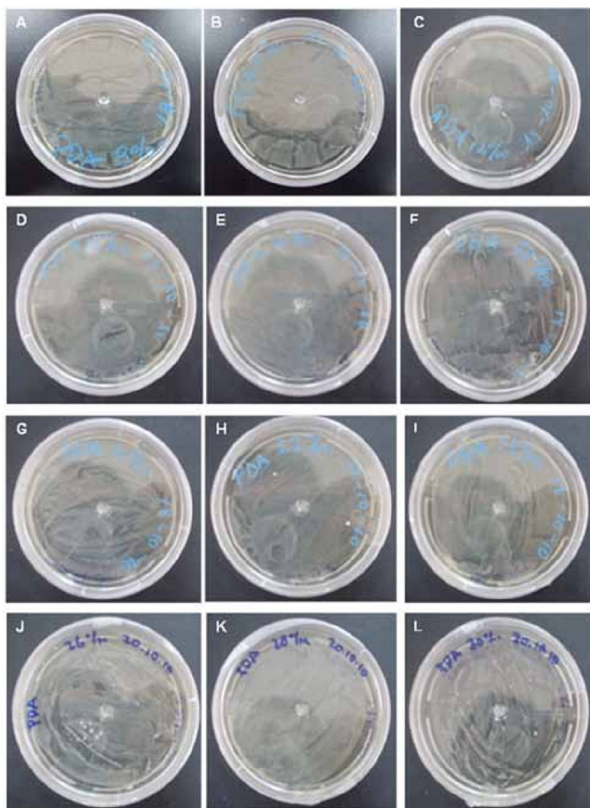


Figura 6. Siembra de bacterias patógenas a distintas salinidades: A) 8‰. B) 10‰. C) 12‰. D) 14‰. E) 16‰. F) 18‰. G) 20‰. H) 22‰. I) 24‰. J) 26‰. K) 28‰. L) 30‰.



### 2.2.3 Evaluación de la bioactividad de discos fúngicos de ascomicetos marinos.

#### 2.2.3.1 Siembra de una concentración de bacterias patógenas (0,07 µg/mL) en medio PDA 14%.

En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se colocó 1 mL de LB y con un asa de inoculación se sembró la bacteria reactivada. Se le aplicó vortex al tubo hasta que el inóculo bacteriano se disgregara y homogenizara con el medio.

Se midió la absorbancia de la suspensión bacteriana en un espectrofotómetro a 530 nm, si el resultado era mayor a 0,07 µg/mL se diluía la suspensión hasta alcanzar los 0,07 µg/mL. Así por ejemplo para *E. coli* el procedimiento fue:

- En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se colocó 1 mL de LB.
- Con un asa de inoculación se sembró una colonia de *E. coli* reactivada, y se realizó vortex hasta que la colonia se homogenice con el medio.
- Se midió la absorbancia de la suspensión bacteriana en un espectrofotómetro: 0,424 µg/mL
- Debido a que la concentración deseada era de 0,07 µg/mL se diluyó la suspensión de la siguiente forma:
- $0,07 \mu\text{g/mL} / 0,424 \mu\text{g/mL} = 0,165 \mu\text{g/mL}$  (suspensión bacteriana)
- En un tubo Eppendorf nuevo se agregaron 0.165 mL de suspensión bacteriana más 0.835 mL de medio de cultivo LB para llegar a un volumen de 1 mL.
- Se agregaron 100 µL de suspensión bacteriana (0,07 µg/mL) en la placa de PDA 14 ‰ y con un asa de Drigalski se dispersó por toda la placa hasta conseguir una película fina.

#### 2.2.3.2 Siembra de discos fúngicos.

Inmediatamente se realizó la siembra de los discos fúngicos en el medio con la película fina de bacterias.

Con el extremo de un sorbete estéril se extrajo un disco de la placa de PDA 14% con bacterias, mientras que con el otro extremo se extrajo un disco de la colonia fúngica a evaluar y se lo colocó en el hoyo de la placa con bacterias (Figura 7).

Las placas fueron colocadas en incubación durante 48 horas a 30 °C, y fueron observadas cada 24 horas para determinar la formación de halos de inhibición.

Como control se utilizaron discos de agar PDA a 14% de ø 10 mm, colocados en los cultivos bacterianos patógenos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Conservación de los extractos fúngicos obtenidos.

Ambos métodos de conservación a 4 °C y -20 °C resultaron adecuados para la conservación, no se observó pérdida de volumen ni cambio en la coloración de los extractos ni ningún otro signo de deterioro, no hubo contaminación bacteriana ni fúngica.

#### 3.2. Evaluación de la bioactividad de los extractos fúngicos de ascomicetos marinos.

En ninguno de los bioensayos de bioactividad de extractos fúngicos de ascomicetos marinos versus las bacterias Gram negativas *Rhodospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. se observó inhibición del crecimiento bacteriano, así mismo el control no presentó bioactividad.

#### 3.3. Evaluación de la bioactividad de los discos fúngicos de ascomicetos marinos.

En ninguno de los bioensayos de bioactividad de discos fúngicos de ascomicetos marinos versus las bacterias Gram negativas *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *E. coli*<sub>001</sub>, *Klebsiella* sp., *Klebsiella*<sub>001</sub>, y la Gram positiva: *Staphylococcus* sp., se observó inhibición del crecimiento bacteriano, así mismo no se observó bioactividad en el control.

### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, determinaron que tanto los extractos y discos fúngicos de los ascomicetos marinos: *L. grandispora*, *V. enalia*, *D. haliotrepha*, *T. achrasporum* y NX<sub>010</sub>, no inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram negativas: *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Klebsiella*<sub>001</sub>, *E.coli*, *E. coli*<sub>001</sub>, *Rhodospirillum*, y *Pseudomonas* sp., y la Gram positiva *Staphylococcus* sp.

Se observó crecimiento del micelio fúngico de *D. haliotrepha* sobre el cultivo de las bacterias patógenas, el resto de ascomicetos marinos no presentaron esta característica.

Con el presente estudio se estandarizó la metodología de bioensayos de bioactividad de ascomicetos marinos, estableciéndose dos tipos de pruebas: discos fúngicos y extractos fúngicos.



Siendo los ascomicetes marinos organismos halófilos obligados, necesitan NaCl para su metabolismo, para las pruebas de discos fúngicos se estableció que la salinidad de 14‰, era la indicada para evaluar esta metodología, ya que tanto bacterias patógenas y ascomicetes marinos se desarrollaban con normalidad.

Se pudo determinar que la concentración de 0,07 µg/mL de la suspensión bacteriana era la que permitía obtener una fina película (biofilm) de bacterias patógenas en el medio PDA 14‰.

La conservación de los extractos fúngicos de ascomicetes marinos no presentó ningún inconveniente, pudiendo estos ser conservados a 4 °C.

Para la manipulación de las bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas se siguieron protocolos de bioseguridad, el trabajo con este tipo de microorganismos se efectuó en el laboratorio de biomedicina de la ESPOL.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- BAUER, A., W. KIRBY, I. SHERRIS & M. TURK 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- CHEN G., Y. LIN, L. WEN, L. VRIJMOEDC and E. GARETH JONESC 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (no. 1893) from an estuarine mangrove on the south China sea coast. *Tetrahedron*, 59: 4907-4909.
- DAMARE, S 2006. Deep – sea fungi as a source of alkaline and cold – tolerant proteases. National Institute of Oceanography – Dona Paula, Goa – India.
- KOSTA, S., JAIN, R. and TIWARI, A 2008. Marine Fungi: Potential source of pharmacological compound. Department of Biotechnology – Gour University – India.
- KROHN K. y M. RIAZ 2004. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. *Tetrahedron Letters* 45: 293-294.
- LIN, Y., X. WU, Z. DENG, J. WANG, S. ZHOU, L. VRIJMOED and E. GARETH JONES 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No.2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry* 59: 469-471.
- MAHDY, A 2004. Secondary metabolites of marine-derived fungi: Natural product Chemistry and Biological Activity. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- MAHYUNDIN, N 2008. Actinomycetes and Fungi associated with marine invertebrates: A potential source of bioactive compounds. University of Canterbury Christchurch – New Zealand.

- MORAINE, R. A. & ROGOVIN, P 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation, *Biotechnol Bioengin.* 8: 511-524.
- PUNYASLOKE, B., BALSAM, T.M. and WRIGHT, P.C 2006. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. Plymouth Marine Laboratory – UK.
- RAGHUKUMAR, C 2008. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. National Institute of Oceanography – Dona Paula, Goa – India.
- ZU-JIAN, W., MING-AN, O. and QUING-WEI, T 2008. New asperxanthone and asperbiphenyl from the marine fungus *Aspergillus* sp. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou Fujian – PR China.