

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INSECTICIDA DE  
EXTRACTOS BACTERIANOS PROCEDENTES DE DIVERSOS  
AMBIENTES EN COLOMBIA**

**ISABEL NATALIA SIERRA GARCIA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2008**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INSECTICIDA DE  
EXTRACTOS BACTERIANOS PROCEDENTES DE DIVERSOS  
AMBIENTES EN COLOMBIA**

**ISABEL NATALIA SIERRA GARCIA**

**Proyecto de grado para optar el título de biólogo**

**Directora  
Magally Romero Tabarez, Ph.D.**

**Codirector  
Sergio Orduz Peralta, M.Sc, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2008**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis, por brindarme la posibilidad de desarrollar este proyecto, por depositar su confianza, colaboración y respaldo necesario para realizar este trabajo. Gracias por contribuir con sus conocimientos a mi formación profesional.

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional. Gracias a todos los miembros de mi familia por hacerme sentir que en el corazón no hay distancias.

A todo el equipo de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas por permitirme pertenecer a esa gran familia, brindarme su apoyo y conocimientos siempre, además por que sus experiencias y nociones me enriquecieron profesional y personalmente. Gracias, de allí me llevo amistades muy valiosas.

A las hijas de don Carlos E. por abrirme las puertas, por que siempre estuvieron ahí para escucharme y apoyarme en los momentos difíciles. Mil gracias por los buenos momentos.

A todos aquellos que en algún momento, participaron, apoyaron y contribuyeron de muchas formas directas o indirectas a la realización y culminación de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. Microorganismos productores de metabolitos secundarios	5
2.2. Historia de los metabolitos secundarios	5
2.3. Funciones de los metabolitos secundarios	7
2.4. Importancia de los organismos utilizados como blanco	8
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>11</b>
3.1. Origen de bacterias utilizadas en la producción de metabolitos secundarios	11
3.2. Producción y extracción de metabolitos secundarios	11
3.3. Organismos utilizados en los ensayos de actividad biológica	12
3.4. Ensayos de actividad biológica	13
3.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana In Vitro	13
3.4.2. Evaluación de la Actividad Antifúngica	13
3.4.2.1. Suspensiones fúngicas	14
3.4.2.2. Ensayo de difusión en agar	14
3.4.3. Evaluación de la actividad insecticida	14
3.4.3.1. Actividad insecticida contra <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	14
3.4.3.2. Actividad insecticida contra <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	15

<b>3.5. Selección de extractos de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica</b>	<b>15</b>
<b>3.6. Determinación de la potencia de los extractos antibacteriales altamente activos</b>	<b>16</b>
<b>3.7. Identificación de cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica</b>	<b>16</b>
<b>3.8. Microscopia electrónica de barrido</b>	<b>17</b>
<b>3.9. Análisis estadístico</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Evaluación de extractos con actividad biológica</b>	<b>19</b>
<b>4.1.1. Actividad antibacteriana</b>	<b>19</b>
<b>4.1.2. Actividad antifúngica</b>	<b>21</b>
<b>4.1.3. Actividad insecticida</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Potencia de extractos antibacteriales</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Identificación de cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios altamente activos</b>	<b>25</b>
<b>4.4. Microscopia electrónica de barrido</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSION</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>36</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>37</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>45</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Organismos usados como blanco en los ensayos de actividad biológica de los extractos bacterianos producidos.	<b>12</b>
<b>Tabla 2.</b> Grado de actividad antibacterial de extractos bacterianos contra bacterias patógenas en humanos y plantas en ensayo de difusión en agar.	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Grado de actividad antifúngica de extractos bacterianos contra hongos fitopatógenos en ensayo de difusión en agar.	<b>21</b>
<b>Tabla 4.</b> Máxima dilución inhibitoria de los extractos BCBS altamente activos	<b>24</b>
<b>Tabla 5</b> Resumen de la identificación molecular y bioquímica de las cepas bacterianas BCBS altamente activas	<b>28</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de la actividad biológica de los extractos activos.	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Actividad antibacterial de extractos bacterianos contra bacterias patógenas en humanos y plantas.	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Actividad antibacterial del extracto BCBS 43B contra <i>S. aureus</i> en ensayo de difusión en agar.	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Actividad antifúngica de extractos bacterianos frente a hongos fitopatógenos.	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Actividad antifúngica de los extractos más activos contra el hongo fitopatógeno, <i>Pestalotia</i> sp en ensayo de difusión en agar.	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Toxicidad del extracto BCBS 281 frente a larvas de <i>A. aegypti</i> de primer instar.	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Toxicidad del extracto BCBS 281 frente a larvas de <i>S. frugiperda</i> de primer instar.	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b> Crecimiento de <i>Ralstonia</i> sp. a través de diluciones de los extractos altamente activos.	<b>25</b>
<b>Figura 9.</b> ADN genómico de las cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica.	<b>26</b>
<b>Figura 10.</b> Amplificados de PCR para los genes del ADNr 16S con cebador Eubac 21F – 1492R y cebador 357F y 1100R.	<b>27</b>
<b>Figura 11.</b> Microfotografías de la morfología de <i>S. aureus</i> y tratamiento control a 5000 y 17000x respectivamente; y en contacto con el extracto BCBS 43B.	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> Microfotografías de la morfología de <i>E. faecalis</i> y tratamiento control a 5000 y 17000x respectivamente; y en contacto con el extracto BCBS 43B.	<b>30</b>

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Alineamiento de la secuencia completa del ADNr 16S de <i>B. subtilis</i> con las secuencias amplificadas para la cepa BCBS 34A	<b>46</b>
<b>ANEXO 2.</b> Alineamiento de la secuencia completa del ADNr 16S de las especies <i>B. subtilis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	<b>47</b>
<b>ANEXO 3.</b> Alineamiento de la secuencia completa del ADNr 16S de <i>B. pumilus</i> con las secuencias amplificadas para la cepa BCBS 281	<b>48</b>
<b>ANEXO 4.</b> Características bioquímicas de las cepas bacterianas productoras de extractos altamente activos	<b>49</b>
<b>ANEXO 5.</b> Análisis del perfil bioquímico de la cepa BCBS 34B por MicroLog™ Minutes	<b>51</b>
<b>ANEXO 6.</b> Análisis del perfil bioquímico de la cepa BCBS 281 por MicroLog™ Minutes	<b>52</b>

## RESUMEN

**TITULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INSECTICIDA DE EXTRACTOS BACTERIANOS PROCEDENTES DE DIVERSOS AMBIENTES EN COLOMBIA \***

**AUTOR: Sierra García, Isabel Natalia\*\***

**PALABRAS CLAVE:** extractos bacterianos, metabolitos secundarios, actividad antibacterial, actividad antifúngica, actividad insecticida, *Bacillus*, control biológico

Colombia es uno de los países considerado con mayor diversidad biológica, sin embargo muy poca diversidad microbiana ha sido evaluada como productora de sustancias biológicamente activas. Los metabolitos secundarios producidos naturalmente afectan organismos patógenos de plantas y animales, representando así, nuevas alternativas para el control de enfermedades y plagas que afectan el sector industrial, alimentario, farmacéutico, agrícola y de la salud pública en Colombia y el mundo. El objetivo de éste trabajo fue evaluar la capacidad de diferentes aislamientos bacterianos del país para producir sustancias biológicamente activas. Un total de 92 extractos bacterianos producidos por bacterias aisladas del suelo de diferentes regiones geográficas fueron evaluados para detectar la presencia de actividad antibacterial, antifúngica e insecticida. La actividad antibacterial y antifúngica se evaluó frente a diversas cepas de bacterias y hongos patógenos de plantas y humanos mediante el ensayo de difusión en agar con discos. La actividad insecticida se evaluó considerando la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Spodoptera frugiperda*. Se determinó que el 50% de los aislamientos bacterianos produjeron metabolitos secundarios con actividad biológica contra uno o más organismos blanco. El análisis estadístico posterior demostró superioridad de actividad biológica de los extractos producidos por bacterias del género *Bacillus*, identificados molecularmente por medio del análisis del ADNr 16S y por caracterización bioquímica con MicroLog™ minutes y Biolog Microbial Identification System software. Las especies del género *Bacillus* identificadas en este estudio con diferentes grados de similitud, han sido caracterizadas como productoras de compuestos antimicrobianos de amplio espectro o de varios compuestos con diferentes actividades. Las actividades biológicas presentadas por los extractos confirman que las especies de *Bacillus* son productoras de diversos metabolitos secundarios biológicamente activos y que para el caso específico de este estudio, el amplio espectro de acción de los mismos ameritan futuras investigaciones tendientes a caracterizar los compuestos activos.

---

\* Proyecto de grado.

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Pregrado en Biología, Directora: Magally Romero Tabarez, Ph. D. y Codirector: Sergio Orduz Peralta, Ph. D.

## ABSTRACT

**TITLE: ANTIMICROBIAL AND INSECTICIDE ACTIVITY FROM COLOMBIAN NATIVE BACTERIA \***

**AUTHOR: Sierra García, Isabel Natalia\*\***

**KEY WORDS:** bacterial extracts, secondary metabolites, antibacterial activity, antifungal activity, insecticide activity, *Bacillus*, biological control

Colombia is one of the countries with the richest biological diversity in the world and only a few microbial diversity have been evaluated for production of bioactive compounds. Secondary metabolites naturally produced can affect plant and human pathogenic organisms and therefore they represent new alternatives to control disease affecting the food industry, pharmaceutical, agricultural and public health fields. The aim of this work was to evaluate the capacity of different bacteria isolates from the country to produce bioactive compounds. 92 bacterial extracts were obtained from different geography soils and were studied for detect antibacterial, antifungal and insecticide activities. Antibacterial and antifungal were tested with different human and plant pathogenic bacteria and plant pathogen fungi using disk diffusion test. Insecticidal activity was studied using the *Aedes aegypti* and *Spodoptera frugiperda* larvicidal assay. 50 % of the bacterial isolates studied showed to produce secondary metabolites with biological activity against one or more targets. Statistical analysis showed high biological activities for extracts produced by bacteria of *Bacillus* genus identified according to the 16S rDNA molecular sequences and biochemical characterization with MicroLog™ minutes and Biolog Microbial Identification System software. The *Bacillus* species identified with different degree of similarity in this work, have been characterized to produce broad-spectrum antimicrobial compounds or several compounds with different activities. The biological activities observed by extracts confirm that *Bacillus* species produce biologically active secondary metabolites and for this specific case of study, the broad spectrum of action make them good candidates for future investigations aimed to characterizing active compounds.

---

\* Thesis Project.

\*\*Science Faculty, Biology School, Biology, Magally Romero Tabarez, Ph. D., Director and Sergio Orduz Peralta, Ph. D., Co-director.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las regiones tropicales y subtropicales concentran la mayor biodiversidad del planeta. Colombia, dada su posición geográfica, es uno de los países considerado con mayor diversidad de organismos vivos. Los esfuerzos en el estudio de la biodiversidad en Colombia se han enfocado al conocimiento y conservación de plantas y animales, y pocos estudios se llevan a cabo en el campo de la biodiversidad microbiana, esto hace del país una importante e interesante fuente de exploración para el conocimiento y utilización potencial de los microorganismos en la industria biotecnológica.

Existe una enorme diversidad de microorganismos, sin embargo, sólo una pequeña proporción de bacterias y hongos ha sido explorada en cuanto a su producción de metabolitos secundarios (Demain, 1999). La búsqueda intensiva de tales metabolitos secundarios novedosos a partir de diversas fuentes naturales como microorganismos se conoce como bioprospección (Melgarejo *et al.*, 2002). La identificación, evaluación y aprovechamiento de tal diversidad inexplorada especialmente en países con alta biodiversidad biológica, constituye un medio para fomentar el desarrollo económico, científico y tecnológico de las naciones. Muestra de ello son los estudios realizados en países como Costa Rica donde en un acuerdo sobre biodiversidad microbiana y bioprospección entre el Instituto Nacional de Biotecnología (INBio) y varias otras compañías, incluyendo Merck, se han generado 27 patentes de productos con diferentes actividades biológicas en diversas fases de desarrollo. Otros proyectos de bioprospección se han desarrollado en países como Madagascar, Surinam, México, Argentina, Chile, Panamá, Vietnam y Laos.

El éxito mundial de los metabolitos secundarios microbianos, como por ejemplo los antibióticos, que han salvado millones de vidas, se ve contrarrestado con la tendencia de la última década, en las grandes compañías farmacéuticas, de reducir, incluso, terminar la investigación en productos naturales y antibióticos (Luzhetskyy *et al.*, 2007). Las principales razones que explican la disminución en la investigación de productos naturales son, la creencia que no existe necesidad de nuevos antibióticos, además de razones económicas tales como la presión de drogas antibacteriales genéricas, así como el cambio hacia la producción de drogas para el tratamiento de enfermedades crónicas las cuales parecen comercialmente más atractivas (Luzhetskyy *et al.*, 2007). Esta situación contrasta con el hecho, que los antibióticos son el tercer segmento más grande del mercado farmacéutico, con más de 25.700 millones de dólares en ventas globales en el 2004 y con las razones que fundamentan la urgente necesidad de nuevos antibióticos, tales como, el establecimiento de las enfermedades infecciosas como la segunda causa de muerte a nivel mundial, el desarrollo y expansión de

patógenos multiresistentes, la evolución de nuevas enfermedades y la toxicidad de algunos compuestos actuales, entre otras (Demain, 1999).

Bajo este escenario, se considera necesario continuar con la búsqueda de sustancias naturales que puedan ser potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Para este fin, la biodiversidad natural debe ser aprovechada, pues se ha demostrado que la búsqueda a través de otras herramientas como la biosíntesis combinatoria, la cual inicialmente fue creada para resolver el problema que enfrentan las grandes compañías farmacéuticas al intentar sintetizar la complejidad inherente de los productos naturales a través de la ingeniería genética, es insatisfactoria, dado los altos costos, esfuerzo y principalmente, el bajo rendimiento comparado con los compuestos producidos naturalmente (Luzhetskyy *et al.*, 2007).

En otro contexto, en el campo de la agricultura, ocurren pérdidas millonarias en los cultivos ocasionadas por infecciones de bacterias y hongos fitopatógenos y el ataque de insectos. De hecho, se estima que los patógenos de plantas causan reducciones del 20% en el rendimiento de los cultivos (Hadacek y Greger, 2000). Esto contrasta con la necesidad de incrementar la producción de alimentos conducido por el aumento y expansión de la población mundial (Liu *et al.*, 2001). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), el estimativo de la población mundial en el 2001, fue de  $6,134 \times 10^9$  habitantes y la proyección para el 2025 es cercana a  $8,5 \times 10^9$  habitantes (Montesinos, 2003). Tal incremento, ocurrirá principalmente en los países en desarrollo y requerirá inevitablemente, una producción adicional en la agricultura. Sin embargo, ésta producción adicional no debe estar basada en el incremento de la superficie cultivable, que acabe con selvas u otros ecosistemas nativos, el incremento en la producción debe enfocarse en el mejoramiento de la productividad de los cultivos existentes.

El control apropiado de las pérdidas debidas a agentes bióticos tales como plagas y enfermedades contribuye al rendimiento de los cultivos. En la actualidad, el control de éstos agentes se realiza con la aplicación indiscriminada y continua de pesticidas químicos sintéticos, pues se considera la forma más económica y fácil de prevenir y controlar los fitopatógenos. Sin embargo, dado que el uso excesivo de estos químicos degradan y contaminan el ambiente (Kim y Chung, 2004), un incremento en el uso de pesticidas químicos para mantener el aumento en la actividad agrícola que soporte el crecimiento poblacional, podría deteriorar seriamente la salud del planeta debido a los efectos adversos (Montesinos, 2003). Los pesticidas sintéticos toman mucho tiempo en ser degradados completamente y algunos de ellos pueden ser letales para los microorganismos benéficos de la rizósfera e insectos del suelo (Kim y Chung, 2004). Así mismo, la entrada de estos químicos en la cadena alimenticia, causa toxicidad en humanos y animales

domésticos (Liu *et al.*, 2001).

Sumado a estos hechos, el surgimiento de patógenos resistentes a los pesticidas químicos (Liu *et al.*, 2001; Kim y Chung, 2004), ha demostrado la necesidad prioritaria de trabajar en la búsqueda de métodos no químicos, como alternativas de control a estas enfermedades, los cuales sean más biodegradables, naturalmente amigables, fácilmente obtenibles (Pushpalatha y Muthukrishnan, 1999; Liu *et al.*, 2001), efectivos en el control de plagas y que representen menor toxicidad a los organismos que no son objetivo (Tasao *et al.*, 2002; Senthil Nathan, 2006). Algunos investigadores han sugerido como métodos ideales, el control biológico con microorganismos (Siloh-Suh *et al.*, 1994; Marten *et al.*, 2000; Kim y Chung, 2004; Promsiri *et al.*, 2006) el cual ha sido estudiado por los últimos 30 años, ó en casos pertinentes, el uso de antifúngicos microbianos (Munimbazi y Bullerman 1997).

Los metabolitos secundarios son sustancias naturales que podrían hacer frente a los agentes causales de las principales enfermedades y plagas anteriormente descritas que afectan el sector industrial, alimentario, farmacéutico, agrícola, agropecuario y de la salud pública en Colombia y el mundo. Estas sustancias pueden ser obtenidas de los recursos biológicos con los que cuenta Colombia, los cuales requieren de conocimiento y apropiación por parte del país. Por lo tanto, surge de la necesidad de estudiar el potencial de actividad biológico, principalmente, antimicrobial e insecticida de bacterias aisladas de diversas regiones geográficas del país, de manera que se identifiquen aquellos microorganismos nativos, relevantes en su capacidad de producir metabolitos biológicamente activos, los cuales representen un uso potencial en el campo de la microbiología industrial y la biotecnología.

Esta investigación pretende estudiar la capacidad de diferentes aislamientos bacterianos de Colombia para producir metabolitos secundarios con actividad biológica, para esto, se realizaron extracciones de metabolitos secundarios de cada aislamiento bacteriano y se detectó la presencia de actividad frente a organismos patógenos blanco, tales como bacterias, hongos e insectos. Aquellos extractos con mejor actividad fueron producidos nuevamente para ser analizados con mayor detalle en cuanto a su espectro de acción, potencia y efecto sobre los organismos blanco utilizados. La identificación de estas bacterias altamente activas contribuirá al conocimiento del potencial industrial y biotecnológico de la diversidad microbiana de Colombia para ser utilizados como agentes de control biológico.

## 2. MARCO TEÓRICO

Los metabolitos secundarios son definidos como sustancias de bajo peso molecular, que no se producen en la vía metabólica primaria y que no juegan un papel fundamental en las funciones primarias o de crecimiento (Vining, 1990). Esta razón llevó a pensar que los metabolitos secundarios no presentaban ninguna ventaja para el organismo productor. Sin embargo, actualmente se considera que los organismos han desarrollado la habilidad de producir tales compuestos, debido a las ventajas selectivas que obtienen frente a otros miembros de la comunidad (Maplestone *et al.*, 1992; Stone y Williams, 1992; Vicente *et al.*, 2003). Se ha reportado que estos metabolitos existen en la naturaleza y se encuentran implicados en la competencia entre varios tipos de microorganismos, plantas y animales, indicando que, realmente estas sustancias presentan actividades antagonistas, como producto de rutas biosintéticas específicas. Adicionalmente, se considera improbable que la inversión en energía celular y la ruta biosintética empleada en la producción de tales metabolitos, en la mayoría de los casos, compleja, se hubiera desarrollado si éstos no ofrecieran una ventaja para los organismos (Maplestone *et al.*, 1992; Stone y Williams, 1992).

La naturaleza cuenta con una gran variedad y número de productos naturales, se estima que cerca de 100.000 metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos han sido caracterizados, de los cuales, aproximadamente 50.000 pertenecen a estos últimos. De éstos, la mayoría corresponde a productos de bacterias filamentosas y en menor proporción de bacterias no filamentosas y hongos (Demain, 1999; Strohl, 2004). De igual forma, es impresionante considerar la tasa anual a la cual los metabolitos secundarios continúan siendo descubiertos, 500 por año, por encima de los 200 a 300 de hace 20 años (Demain, 1999; Strohl, 2004).

La exploración de los metabolitos secundarios ha llevado a considerarlos como una fuente inagotable de productos bioactivos (Vicente *et al.*, 2003). Dentro de los productos naturales microbianos de mayor éxito se incluyen los antimicrobianos. Actualmente, la inmensa mayoría de los antibióticos clínicamente relevantes, incluyendo drogas antibacteriales, antifúngicas y antitumorales han sido productos naturales o derivados de ellos (Strohl, 2004). Se ha declarado que el aumento en el tiempo de vida en el siglo XX se debe al uso de metabolitos secundarios de plantas y microorganismos (Verdine, 1996). La relevancia de los productos naturales se confirma con el hecho que durante 1997, el 26% de las drogas antibacteriales, antifúngicas y antitumorales comercializadas fueron productos naturales no modificados, el 38% derivados semisintéticos de productos naturales, el 4% fueron químicamente sintetizados siguiendo un modelo de productos naturales bioactivos, y el 31% fueron drogas sintetizadas químicamente (Strohl,

2004). Las razones principales para el éxito de los productos naturales son la existencia de una gran diversidad estructural que les confiere funciones variadas y el hecho de que la evolución durante millones de años haya preseleccionado estos compuestos por su interacción y actividad (Luzhetskyy *et al.*, 2007).

El amplio rango de acción biológica de los metabolitos secundarios incluye su actividad como inhibidores de enzimas, agentes inmunosupresores para transplantes de órganos, antitumorales, hipocolesterolémicos, antiparasitarios para humanos y animales, bioherbicidas, reguladores del crecimiento en plantas, biopesticidas y bioinsecticidas (Demain, 1999; Demain, 2006). Lo anterior trasciende la relevancia médica y es llevado a aplicaciones en la industria agrícola y agropecuaria.

### **2.1. Microorganismos productores de metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios representan un diverso e inmenso grupo de compuestos que han evolucionado en el tiempo y se encuentran en un amplio rango de especies terrestres y marinas. La producción de metabolitos secundarios usualmente esta restringida a aquellos organismos carentes de sistema inmune. De los productos naturales descubiertos hasta 1994, aproximadamente 55% fueron producidos por *Streptomyces* sp. El resto de organismos productores, incluye, hongos filamentosos, los cuales producen 22%, bacterias no filamentosas que producen 12% y actinomicetos no pertenecientes al género *Streptomyces*, los cuales producen aproximadamente 11% (Strohl, 2004). En los últimos 10 años los científicos han incrementado sus esfuerzos en la búsqueda de actinomicetos marinos, lo cual ha llevado al descubrimiento de nuevos productos naturales (Luzhetskyy *et al.*, 2007). Otras fuentes tales como mixobacterias y cianobacterias también han comenzado a ser importantes en el descubrimiento de drogas, derivándose compuestos estructuralmente únicos con actividades biológicas interesantes. Reinchenbach y Hofle (1993) describen las mixobacterias como productoras del 3,5 % de los productos naturales conocidos, ubicándolas en el tercer lugar de procariontas productores de sustancias bioactivas liderado por los actinomicetos y *Pseudomonas*.

### **2.2. Historia de los metabolitos secundarios**

En la antigüedad, mucho tiempo antes del descubrimiento de los metabolitos secundarios, los microorganismos y sus productos, fueron utilizados para satisfacer las necesidades y deseos de la humanidad. Muestra de ello, fue el empleo de los microorganismos y más específicamente de sus productos, en la producción y preservación de alimentos, tales como, cerveza, pan, vino y quesos.

Igualmente, las propiedades de los productos microbianos fueron empleadas hace miles de años en la medicina popular, en el tratamiento de enfermedades, así lo demuestra el uso de quesos, carnes y panes mohosos para sanar las heridas (Demain y Fang, 2000).

Sin embargo, hasta 1870 Tyndall, Pasteur y Roberts observaron separadamente el efecto antagónico de un microorganismo sobre otro, sugiriendo el potencial terapéutico de este hallazgo. Durante el medio siglo siguiente, muchas preparaciones microbianas fueron evaluadas como medicinas, pero fallaron al ser demasiado tóxicas o inactivas en animales (Demain, 2006). Sólo hasta 1929, con el descubrimiento accidental de la penicilina por Alexander Fleming, quien observó que un moho contaminante identificado como *Penicillium notatum* había matado su cultivo bacterial de *Staphylococcus aureus* se considera el comienzo de la era antibiótica (Demain y Fang, 2000).

El descubrimiento de la penicilina, considerado como el primer agente quimioterapéutico exitoso, no sólo fue valioso en la victoria contra las enfermedades infecciosas humanas, también llevó a la creación y desarrollo de una nueva industria (Demain, 2006). Previo al advenimiento de la penicilina, la mayoría de las investigaciones en productos naturales se realizaban en plantas terrestres y se enfocaban más al conocimiento por considerarse estructuras interesantes bioquímicamente, y no por ser compuestos naturales bioactivos (Vining, 1992). El éxito de la penicilina, promovió la expansión en el campo del descubrimiento de drogas a partir de microorganismos. La búsqueda de microorganismos productores de compuestos con propiedades antibióticas ha sido el fundamento de los programas de investigación antibiótica durante los últimos treinta años. La gran mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en actinomicetes, 45%, hongos 38%, y bacterias unicelulares, principalmente, *Pseudomonas* y *Bacillus* 17% (Demain, 2006).

Así mismo, existen esfuerzos enfocados en la búsqueda de metabolitos secundarios con otras actividades biológicas, tales como, inhibidores de enzimas, estimuladores del crecimiento vegetal, herbicidas, insecticidas, antiparasitarios e inmunosupresores entre otros. Para el proceso de búsqueda de tales actividades existen dos estrategias, la primera, basada en la detección de nuevos metabolitos secundarios desconocidos usando nuevas tecnologías o usando un amplio rango de organismos blanco, y la segunda, explorando los metabolitos secundarios conocidos que fallaron en su empleo como antibióticos. Esto último se fundamenta en el hecho que a pesar de que en sus inicios el enfoque para el descubrimiento de metabolitos secundarios fue principalmente consagrado a la búsqueda de agentes antibióticos, desde 1970's y 1980's se acepta que estos compuestos también poseen otras actividades poco explotadas en el pasado y que requieren ser exploradas (Demain, 2006).

### **2.3. Funciones de los metabolitos secundarios**

Aunque las funciones específicas de los metabolitos secundarios en las interacciones entre organismos son desconocidas, la noción de que los metabolitos microbianos pueden afectar negativamente no sólo a sus competidores sino también a otros organismos de la comunidad, como parásitos, plantas, insectos e incluso animales superiores, es ampliamente citado (Maplestone *et al.*, 1992; Demain y Fang, 2000).

Demain (1999) introduce una propiedad común en la mayoría de los antibióticos, es la presencia de un efecto estimulador del crecimiento a bajas concentraciones. Esto plantea una posible función en tales metabolitos, como estimuladores del crecimiento de microorganismos antagonistas a los competidores del organismo productor de metabolitos secundarios. Adicionalmente, el estudio de la complejidad de las rutas biosintéticas de los metabolitos ha sugerido la importancia de los mismos en la supervivencia, puesto que se presentan efectos regulatorios en diferentes fases del crecimiento, por ejemplo mayor producción de antibióticos en momentos de mayor vulnerabilidad como la esporulación (Demain y Fang, 2000).

A continuación se enumeran algunos argumentos que apoyan la idea de los metabolitos secundarios como compuestos que mejoran la supervivencia del organismo productor en competencia con otras especies (Demain y Fang, 2000):

- a. Generalmente, sólo los organismos que carecen de sistema inmune son productores prolíficos de metabolitos secundarios.
- b. Los compuestos presentan sofisticadas estructuras, mecanismos de acción y rutas biosintéticas complejas y energéticamente costosas.
- c. Los productos naturales presentan actividades fisiológicas, por ejemplo, entre el 1 y 52% de los aislamientos del suelo tienen actividad inhibitoria frente a otros organismos y el número de compuestos inhibitorios aumenta con el aumento de organismos blanco evaluados (Stone y Williams, 1992).
- d. Los metabolitos secundarios son producidos en la naturaleza (no son artefactos de las condiciones de crecimiento) y presentan actividad antagonista frente a microorganismos, plantas y animales.
- e. Son producidos por genes organizados en clusters, lo cual sólo habría ocurrido si el producto le confiere ventaja selectiva. Otras características de estos clusters son la ausencia de genes no funcionales y presencia de genes de resistencia y regulatorios.
- f. La relación espacio temporal entre la formación de metabolitos y la esporulación, debido a la sensibilidad de las células a los competidores que requieren una protección especial.

#### **2.4. Importancia de los organismos utilizados como blanco**

Los organismos utilizados en los ensayos de actividad biológica fueron seleccionados como blanco de los extractos de metabolitos secundarios por considerarse bacterias y hongos patógenos de humanos, animales y plantas, así como insectos de importancia clínica y económica.

*Staphylococcus aureus* es un patógeno importante que causa cerca del 11% al 33% de las infecciones bacterianas hospitalarias (Tibavizco *et al.*, 2007) y persiste como causa importante de infecciones en tejidos blandos, en condiciones mortales como neumonía o septicemia, al mismo tiempo, es factor importante en las intoxicaciones alimentarias (Novick, 2000). De otro lado, *Escherichia coli* es considerado como comensal, común en el intestino humano, en ocasiones es agente causal de infecciones del tracto urinario, sepsis / meningitis o diarreas. Las infecciones en el tracto urinario son algunas de las infecciones más comunes en los países desarrollados y *E. coli* causa del 75 al 90% de ellas. Además, la diarrea aguda causada por infecciones de *E. coli* es una enfermedad común en países en desarrollo. Actualmente cobra mas de 12.000 vidas por día en niños menores de 5 años en Asia, África y Latinoamérica (Varela *et al.*, 2007). A *Enterococcus faecalis* corresponden aproximadamente el 80% de las infecciones provocadas por especies de *Enterococcus*, las cuales incluyen infecciones del tracto urinario, bacteremia, infecciones intra-abdominales y endocarditis (Hancock y Gilmore, 2000). Dos especies de *Bacillus*, *B. subtilis* y *B. cereus* fueron elegidos para los ensayos, la primera que a pesar de ser considerada no patogénica, puede contaminar los alimentos, causar pudrición en papa y una consistencia pegajosa y fibrosa por la producción de polisacáridos de cadena larga en alimentos como el pan (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). *B. cereus* fue seleccionado por ocasionar dos tipos de intoxicaciones, relacionadas con los 3 tipos de enterotoxinas que produce (Granum, 2005).

Entre las bacterias fitopatógenas consideradas en este estudio se encuentran *Erwinia* sp. y *Ralstonia* sp. La primera se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y es frecuente, observarla infectando cultivos de importancia económica como papa, zanahoria, tomate, pepino, lechuga y otros, así como plantas ornamentales como los lirios. *Ralstonia* sp. es económicamente importante por causar la marchitez bacteriana en más de 200 familias de plantas, incluyendo aquellos cultivos principales como papa, tomate, maní, tabaco, banano y plátano, así como muchas especies de plantas nativas (Tans-Kersten *et al.*, 2001).

Entre los hongos fitopatógenos elegidos en este trabajo, se encuentra *Rhizoctonia* sp. comúnmente observado infectando raíces y partes subterráneas de las plantas. Se ha registrado atacando 230 especies de plantas pertenecientes a 66 familias. En Colombia causa rhizoctoniasis, pudrición de raíces y de la parte basal

del tallo, marchitez, damping off, entre otros (Pardo-Cardona, 1995). Afecta diferentes cultivos económicamente importantes, incluyendo la papa colombiana nativa (*Solanum phureja*), donde disminuye altamente la calidad y producción del tubérculo (Bautista *et al.*, 2007). El hongo *Colletotrichum* sp. es agente causal de la antracosis, una enfermedad que afecta hojas y tallos jóvenes en plantaciones de café, melón, frutas cítricas, pero también en árboles, como los sauces y álamos (Pardo-Cardona, 1995). *Fusarium* sp. es contaminante común y fitopatógeno bien conocido, además, ciertas especies pueden causar varias infecciones en humanos (Mehl y Epstein, 2007). Las especies de *Fusarium* atacan diversas y numerosas especies de plantas ocasionando principalmente, marchitez, amarillamiento y pudrición de frutos y tubérculos (Pardo-Cardona, 1995). En el trabajo también se tuvieron en cuenta dos especies de *Aspergillus*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. El primero, es considerado agente etiológico de un amplio rango de infecciones incluyendo micotoxicosis debidas a las aflatoxinas que producen, neumotitis hipersensible, otitis, sinusitis y infecciones invasivas (Hedayati *et al.*, 2007). En los últimos años se han encontrado potentes micotoxinas capaces de inducir lesiones cancerígenas en el hombre y animales (Bogantes-Ledezma *et al.*, 2004). En el campo de la fitopatología esta especie produce el moho del fruto (en *Citrus*), moho en granos almacenados (en maíz), pudrición en granos almacenados (en trigo y sorgo) y pudrición de semillas y granos almacenados en maní (Pardo-Cardona, 1995). La otra especie, *A. fumigatus*, en los últimos 10 años ha sido el hongo patógeno predominante en el aire que causa graves y usualmente fatales infecciones invasivas en pacientes inmunosuprimidos en países desarrollados (Latge, 1999). El hongo *Alternaria* es patógeno de cereales, plantas ornamentales, vegetales, hortalizas y frutales. Incluso, algunas especies afectan los productos poscosecha y las semillas. En Colombia se ha reportado causando manchas foliares y pudriciones en raíces y frutos (Pardo-Cardona, 1995). *Pestalotia* sp. es otro hongo fitopatógeno registrado como causal de el secamiento de ramas y follajes, manchas foliares, pudrición del fruto y necrosis de brotes (Pardo-Cardona, 1995). *Verticillium* sp. es una especie patogénica de artrópodos, plantas y otros hongos. En Colombia las infecciones comunes reportan el marchitez, amarillamiento, pudrición y muerte (Pardo-Cardona, 1995). Es citada como el principal limitante al rendimiento del girasol en la mayoría de las regiones (González *et al.*, 2003).

En cuanto a las especies de insectos escogidas, se encuentra *Aedes aegypti* y *Spodoptera frugiperda*. *Aedes aegypti* es el principal vector para arbovirus responsables de la fiebre amarilla, endémica de América del Sur y Central según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés). Los datos epidemiológicos del 2004, declaran la ocurrencia del 47% de los casos en Suramérica, más alto que en África, con una mortalidad del 80% (WHO, 2005). Este mosquito también es vector del dengue hemorrágico, el cual es endémico del sureste de Asia, islas del Pacífico, África y América. De hecho, África y

Suramérica, presentan un recrudecimiento de esta infección debido al alto número de lugares de reproducción y el aumento de la resistencia de los mosquitos por el uso actual de insecticidas comerciales (Ciccía *et al.*, 2000). De otro lado, *Spodoptera frugiperda* es conocido como el gusano cogollero del maíz, el cual causa una de las principales plagas del maíz en regiones tropicales y subtropicales de América. El daño ocasionado por esta plaga puede llegar desde un 20% hasta la pérdida total del cultivo, si la plaga ataca en periodos cercanos a la etapa de floración (Rincón-Castro *et al.*, 2006). Según el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA (2006), en Colombia es habitual en cultivos de arroz, maíz, sorgo y tabaco (ICA, informe rendición de cuentas 2006). En Colombia se han reportado hasta 62 especies hospederas entre las que se encuentran el arroz, maíz, sorgo, trigo, avena, caña de azúcar, ajonjolí, maní, soya, tabaco, pastos, plantas hortícolas, papa, berenjena y crisantemo (Velez, 1997) y otras especies como el pino patúla, ciprés y varias especies de eucalipto (Madrigal, 2003).

### 3. MATERIALES Y METODOS

En la búsqueda de la capacidad de diferentes aislamientos bacterianos de Colombia para producir metabolitos secundarios con actividad biológica, se realizaron extracciones de metabolitos secundarios de bacterias aisladas de diferentes ambientes y éstos fueron evaluados en cuanto a la presencia de determinada actividad frente a organismos patógenos blanco. Los mejores extractos fueron producidos nuevamente para ser analizados con mayor detalle en cuanto a su espectro de acción, potencia y efecto sobre los organismos blanco utilizados. La identificación de las bacterias productoras de sustancias altamente activas permitirá conocer el potencial industrial y biotecnológico de la diversidad microbiana de Colombia útiles como agentes de control biológico.

#### **3.1. Origen de bacterias utilizadas en la producción de metabolitos secundarios**

Las bacterias empleadas en la búsqueda de metabolitos secundarios biológicamente activos, pertenecen a la colección de microorganismos "BCBS" de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para investigaciones Biológicas (CIB). Fueron obtenidos a partir de muestras ambientales de suelo en diferentes áreas geográficas de Colombia. Los aislamientos fueron conservados en su totalidad, a -20°C en Luria-Bertani (LB) suplementado con 40% de glicerol.

#### **3.2. Producción y extracción de metabolitos secundarios**

La obtención de los extractos se realizó siguiendo la metodología descrita en Baur *et al.* (2006) y Frykman *et al.* (2006) con algunas modificaciones. La colonia bacteriana pura aislada se inoculó en caldo LB durante toda la noche. Al día siguiente, 500 µL de éste cultivo se dispusieron sobre un erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de caldo LB. Al mismo tiempo, se agregaron 2 mL (4%) de resina adsorbente Amberlite<sup>R</sup> XAD16 (Sigma), en solución acuosa y se llevó a incubar a 30°C durante 7 días a 200 rpm. Al cabo de este tiempo, la resina se recuperó por decantación, los metabolitos adheridos a la resina fueron diluidos con 20 mL de metanol al 99.9% y concentrados en cámara extractora hasta obtener 1 mL de extracto. Los extractos fueron mantenidos y conservados en frascos de vidrio a -20°C.

### 3.3. Organismos utilizados en los ensayos de actividad biológica

Diversos organismos fueron empleados para evaluar la actividad biológica antibacteriana, antifúngica e insecticida de los extractos bacterianos obtenidos de los aislamientos ambientales de suelo. Las especies, el origen y el mantenimiento de los organismos blanco se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Organismos usados como blanco en los ensayos de actividad biológica de los extractos bacterianos producidos.

Organismo	Origen	Mantenimiento
Bacterias patógenas : <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i>	Colección de patógenos humanos con virulencia atenuada de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas	Agar Luria Bertani (LB) a 30°C y conservación a -20°C.
Bacterias fitopatógenas: <i>Ralstonia</i> sp. <i>Erwinia</i> sp.	Laboratorio de fitopatología Universidad de los Andes	
Hongos fitopatógenos: <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Pestalotia</i> sp.	Aislamientos recientes. Identificados por el laboratorio de Fitopatología de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA, Sede La Selva, Rionegro, Antioquia).	Agar papa dextrosa (PDA) a 30°C.
Hongos fitopatógenos <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Colección de hongos fitopatógenos de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas.	
Insectos: <i>Aedes aegypti</i>	Insectario. Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la	Fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de

<i>Spodoptera frugiperda</i>	Corporación para Investigaciones Biológicas.	oscuridad a 30°C y 70% de humedad relativa.
------------------------------	--	---

### **3.4. Ensayos de actividad biológica**

#### **3.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro**

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó siguiendo el procedimiento del ensayo de difusión en agar, descrito por Bauer y Kirby (1966) y modificado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anteriormente, National Committee for Clinical Laboratory Standards o NCCLS) (Cona, 2002). Un volumen de 0.1 mL de cada suspensión de bacteria blanco ajustada a una concentración equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC / mL se inoculó sobre cajas de Petri de 10 cm de diámetro, las cuales contenían agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson). Sobre el agar inoculado, se dispusieron discos de papel filtro estériles (Mini Trans-Blot, BIO-RAD) de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 15  $\mu$ L de cada uno de los extractos a evaluar.

Con el fin de garantizar la inocuidad de la solución con la cual se extrajeron los metabolitos secundarios bacterianos, se realizaron controles negativos impregnando discos con 15  $\mu$ L de la solución de extracción (metanol al 99.9 %). Como controles positivos se emplearon Estreptomina (10 mg / mL) y Vancomicina (10  $\mu$ g / mL) para microorganismos gram negativos y gram positivos respectivamente. Adicionalmente, se impregnaron discos con 15  $\mu$ L de agua estéril, con el propósito de confirmar las condiciones de esterilidad e inocuidad de los materiales. Las cajas de Petri cultivadas fueron incubadas a 30°C con excepción de *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* los cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se observó la presencia o no de zonas de inhibición alrededor de los discos, y en caso de presentarse, se registró el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El grado de actividad antibacteriana fue clasificado en base al tamaño del halo de inhibición (promedio de las réplicas) así: -, sin inhibición;  $\pm$ , muy bajo (<10 mm); +, leve (10 – 20 mm); ++, alto (20 - 25 mm); +++, muy alto (>25 mm).

#### **3.4.2. Evaluación de la Actividad Antifúngica**

La actividad antifúngica se determinó con el método de difusión en discos, siguiendo una metodología similar a la empleada en los ensayos de actividad antibacteriana y descrita en detalle en Engelmeier y Hadacek (2006).

#### **3.4.2.1. Suspensiones fúngicas**

El inóculo fúngico requerido para los ensayos estaba conformado por una suspensión de esporas de cada cepa patógena. Estas suspensiones de esporas se prepararon para todos los hongos patógenos blanco con excepción de *Rhizoctonia* sp., el cual no produce esporas; en este caso, el inóculo estaba constituido por una suspensión miceliar del hongo, crecido en caldo papa dextrosa durante 4 días. La suspensión de esporas del resto de cepas fitopatógenas se obtuvo a partir del crecimiento extensivo del hongo sobre cajas de Petri en un medio de cultivo particular para cada especie, el cual promoviera la producción de esporas. Las cepas se cultivaron en los medios específicos por un periodo de 7 a 15 días dependiendo del tiempo de crecimiento del microorganismo. Las esporas se obtuvieron por raspado de la superficie del micelio y fueron resuspendidas en solución salina (0.9 %) en un tubo con perlas de vidrio estériles en donde se agitaron vigorosamente por 2 o 3 minutos, con el fin de obtener una completa disociación de agregados de esporas e hifas. Posteriormente la suspensión fue filtrada a través de gasa estéril y ajustada a una concentración entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  esporas / mL por conteo directo de esporas en cámara de Neubauer.

#### **3.4.2.2. Ensayo de difusión en agar**

La suspensión de esporas (0.1 mL) de cada cepa fitopatógena se inoculó sobre cajas de Petri de 10 cm de diámetro previamente servidas con PDA (Merck). Se siguió el mismo procedimiento empleado en la evaluación antibacteriana. En este caso se incluyeron controles negativos impregnando discos con 15  $\mu$ L de metanol al 99.9%, (solución de extracción), controles de esterilidad con 15  $\mu$ L de agua estéril y controles positivos con anfotericina B (100  $\mu$ g / mL). Las cajas de Petri inoculadas fueron incubadas a 30°C y luego de un tiempo máximo de 120 horas se observó la existencia de zonas de inhibición alrededor de los discos. En caso de presentarse, se registro el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). Los ensayos fueron realizados por triplicado. El grado de actividad antifúngica fue clasificado en base al tamaño del halo de inhibición (promedio de las réplicas) así: -, sin inhibición; +, leve (10 – 15mm); ++, alto (15-20 mm); +++, muy alto (>20 mm).

#### **3.4.3. Evaluación de la actividad insecticida**

##### **3.4.3.1. Actividad insecticida contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

La actividad insecticida de los extractos fue evaluada considerando la susceptibilidad de larvas de primer instar de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al

ponerse en contacto con los extractos. Se emplearon microplatos de 24 pozos (MULTIWELL™ 24, Becton Dickinson), sobre los cuales se dispusieron 980 µL de agua estéril y 5 larvas de *A. aegypti* de primer instar, posteriormente se adicionó a cada pozo 20 µL de extracto puro y diluciones a la mitad de cada uno. Como control positivo se utilizaron 20 µL de cultivo completo final de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* y como controles negativos 20 µL de agua estéril y metanol. Se incubaron a 30°C durante 24 horas y al cabo de este tiempo, se registró la mortalidad de las larvas y se calculó el porcentaje de mortalidad con la formula:

$$\% \text{ Mortalidad} = (\text{Número de larvas muertas} / \text{Número larvas total}) * 100$$

#### **3.4.3.2. Actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**

Los extractos con mayor actividad insecticida sobre larvas de *A. aegypti* se seleccionaron para un ulterior ensayo sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) siguiendo la metodología descrita en Arango *et al.* (2002).

Para éste ensayo se emplearon copas desechables de 4 cm de diámetro servidas previamente con una dieta artificial basada en frijol. Sobre la superficie de ellas, se añadieron 400 µL de extracto puro y 400 µL de diluciones a la mitad y en base 10 del extracto en agua estéril. Transcurridas 4 horas (tiempo en el cual el extracto se secó de la dieta), cinco larvas de primer instar de *S. frugiperda* fueron dispuestas en la superficie. Como control negativo se emplearon agua estéril y una mezcla de metanol y agua (1:1). Como control positivo se usará un formulado comercial de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, marca Dipel, a 10000 ng / cm<sup>2</sup>. Las copas con los tratamientos fueron llevadas a incubar a 30°C por 72 horas, al cabo de este tiempo se examinó y se registró la mortalidad de larvas. El ensayo se realizó por triplicado y en dos días diferentes. Se calculó el porcentaje de mortalidad para el extracto y sus diluciones con la formula:

$$\% \text{ Mortalidad} = (\text{Número de larvas muertas} / \text{Número larvas total}) * 100$$

#### **3.5. Selección de extractos de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica**

La selección de los extractos altamente activos se realizó teniendo en cuenta, el amplio espectro de acción, la estabilidad y la obtención de halos de inhibición de mayor tamaño (en el caso de las pruebas de difusión en agar). Los extractos seleccionados se obtuvieron nuevamente en mayor cantidad, y a través del

método de extracción líquido- líquido con n-Heptano en un MIXXOR Separatory Cylinder se removieron productos lipofílicos contaminantes, posteriormente los extractos se pasaron por un filtro de 0.2 µm.

### **3.6. Determinación de la potencia de los extractos antibacteriales altamente activos**

Aquellos extractos con actividad antibacterial destacada en los ensayos de difusión en agar antibacterial se les evaluó su potencia mediante el ensayo de microdilución. Se siguió la metodología descrita por Romero-Tabarez, *et al.* (2006) y las recomendaciones del NCCLS (2000). Sobre microplatos de 96 pozos (MICROTEST™ 96, Becton Dickinson), se dispuso en cada uno 50 µL de medio líquido Mueller Hinton Broth (MHB) (Becton Dickinson) y se agregó 50 µL de extracto realizando diluciones seriadas. Posteriormente, sobre cada pozo se inocularon 50 µL de una suspensión ajustada a  $5 \times 10^5$  UFC / mL de cada una de las bacterias patógenas blanco. Paralelamente se utilizaron diluciones seriadas de metanol al 99.9%, como control negativo, MHB como control del crecimiento microbiano y Vancomicina o Estreptomicina como control positivo.

Los microplatos inoculados se incubaron a 30°C, excepto *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* los cuales se incubarán a 37°C durante toda la noche (aproximadamente de 16-18 horas). El ensayo se llevó a cabo por duplicado. La dilución mas alta a la cual el extracto inhibió el crecimiento microbiano se determinó macroscópicamente por turbidez y se definió como la máxima dilución inhibitoria y adicionalmente, se registró la lectura de la densidad óptica a 595 nm en cada uno de los pozos en el lector de microplatos (Microplate reader, Model 680XR, BIO-RAD).

### **3.7. Identificación de cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica**

Las cepas con actividad antibacterial, antifúngica e insecticida destacada, fueron seleccionadas para ser identificadas de dos formas, por caracterización bioquímica y molecularmente por análisis del ADNr 16S.

Para la identificación molecular, se realizó la extracción del ADN a partir de cultivos de 16 horas en LB siguiendo el procedimiento Standard de Sambrook *et al.* (1989). La amplificación de los genes que codifican para el RNA 16S se realizó a partir del ADN genómico por PCR empleando cebadores universales para esta región. El juego de cebadores Eubac 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACATTGTTACGACTT -3'); y un segundo juego de cebadores, 357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 1100R (GGGTTGCGCTCGTTG).

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MACROGEN. El volumen final para cada reacción de PCR fue de 50  $\mu$ L con los reactivos apropiados: Buffer (1X),  $MgCl_2$  (1 mM), dNTPs (0,2 mM de cada uno), Taq polimerasa (Go taq<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase, Promega) (1.2 U). La reacción se llevó a cabo en iCycler Thermal cycler de BIO-RAD, bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, 30 s; 30 ciclos de 95°C por 1 min; 55.8°C por 40 s; 72°C por 1 min 30 s y un ciclo final de 72°C por 7 min. La comparación de las secuencias del ADNr 16S se realizó con las secuencias depositadas en diferentes bases de datos, tales como GenBank NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).

En la identificación bioquímica, las bacterias fueron caracterizadas bioquímicamente con MicroLog<sup>™</sup> Minutes, GP2 Microplate<sup>™</sup> BIOLOG y el programa Biolog Microbial Identification System software (MicroLog<sup>™</sup>).

### **3.8. *Microscopia electrónica de barrido***

Con el fin de observar los efectos morfológicos de los extractos sobre las bacterias patógenas utilizadas como blanco, se preparó una suspensión de bacterias blanco de  $5 \times 10^5$  UFC / mL a la cual se le añadieron 200  $\mu$ L de extracto en tubos con MH. La misma concentración de bacterias en tubos de MH con 200  $\mu$ L de agua fueron empleados como controles. Transcurridas 4 horas, el cultivo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Las células fueron fijadas durante 1 hora con 2% (v/v) glutaraldehído en buffer fosfato 0.1 M. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con agua estéril y fueron deshidratadas gradualmente con etanol al 25%, 50%, 75% y 100% cada uno durante 10 minutos y con centrifugaciones entre cada paso de deshidratación. Posterior al secado, las células se dispusieron sobre una lamina portaobjeto, donde fueron recubiertas en oro y observadas en microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5910LV.

### **3.9. *Análisis estadístico***

Los resultados de los ensayos de difusión en agar de los extractos altamente activos fueron analizados con el fin de conocer la eficiencia de los mismos sobre cada microorganismo blanco mediante la comparación de los halos de inhibición presentes en cada bacteria blanco en un Análisis de Varianza de dos vías con el programa GraphPad Prisma versión 4.0. La prueba de Bonferroni se aplicó a los resultados que presentaron diferencias significativas (valor  $p < 0.05$ ).

## **4. RESULTADOS**

Un total de 92 extractos procedentes de 92 aislamientos bacterianos fueron evaluados en cuanto a su actividad biológica contra diferentes blancos, tales como, bacterias, hongos e insectos. Se determinó que 46 (50%) aislamientos bacterianos produjeron metabolitos secundarios con actividad biológica contra uno o más blancos.

La Figura 1 muestra la distribución de la actividad biológica de los extractos activos. De los 46 extractos activos, 7 (15%) mostraron actividad antibacterial; 14 (31%) actividad antifúngica; 7 (15%) actividad insecticida; 14 (31%) actividad antibacterial y antifúngica; 2 (4%) actividad antibacterial e insecticida y otros 2 (4%) actividad antifúngica e insecticida.

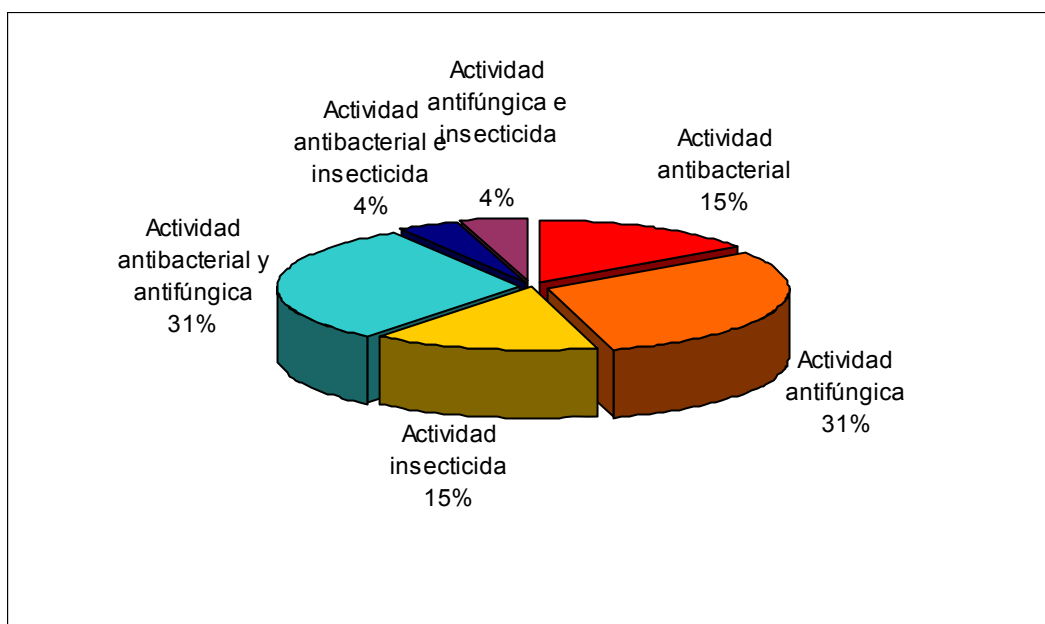


Figura 1. Clasificación de la actividad biológica de los extractos activos.

Se seleccionó un grupo de extractos con las mejores actividades para ser evaluados posteriormente. Este grupo consistió de 12 extractos, 5 con actividad antibacterial contra todas las cepas bacterianas blanco, 6 extractos con actividad antifúngica frente a la mayoría de hongos fitopatógenos y 1 extracto con actividad insecticida.

#### 4.1. Evaluación de extractos con actividad biológica

#### 4.1.1. Actividad antibacteriana

Los extractos BCBS 34A, 34B, 43B, 79 y 300 seleccionados previamente, fueron evaluados en su actividad antibacteriana *in vitro* mediante el ensayo de difusión en agar contra bacterias patógenas humanas y de plantas. Estos exhibieron diferentes niveles de actividad (Figura 2, Tabla 2)

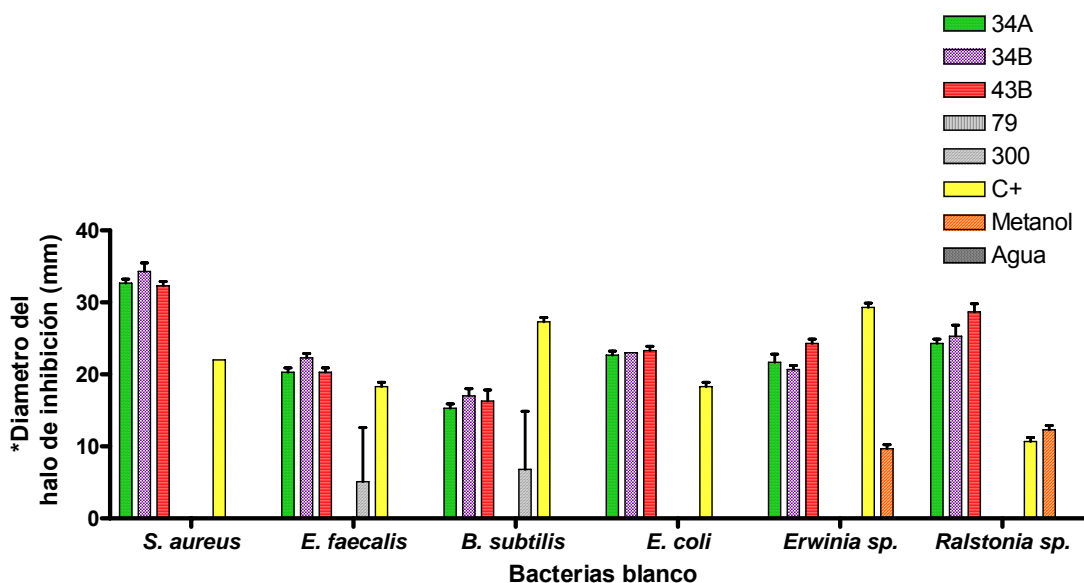


Figura 2. Actividad antibacteriana de extractos bacterianos contra bacterias patógenas en humanos y plantas.

\*Diámetro de los halos de inhibición incluyendo discos (6 mm), calculado con el promedio de las réplicas por extracto. C+, control positivo.

Tabla 2. Grado de actividad antibacteriana de extractos bacterianos contra bacterias patógenas en humanos y plantas en ensayo de difusión en agar.

EXTRACTO	BCBS 34A	BCBS 34B	BCBS 43B	BCBS 300	BCBS 79	C +	MeOH	AGUA
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	-	-	++	-	-
<i>E. faecalis</i>	++	++	++	±	-	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	±	-	+++	-	-
<i>E. coli</i>	++	++	++	-	-	+	-	-
<i>Erwinia sp.</i>	++	++	++	-	-	+++	±	-
<i>Ralstonia sp.</i>	++	++	+++	-	-	+	+	-

+++ , muy alto; ++, alto; +, leve; ±, muy bajo; -, sin inhibición. C+, control positivo; MeOH, metanol.

La actividad antibacterial fue analizada mediante una ANOVA de dos vías con los extractos y las bacterias patógenas blanco como factores. Se presentaron diferencias altamente significativas entre todos los extractos evaluados ( $F = 2417.79$ ,  $df = 7$ ,  $P < 0.0001$ ) que representan aproximadamente el 81% del total de la varianza. El extracto con mayor actividad antibacterial fue el BCBS 43B (ver figura 3), seguido en orden descendente por los extractos 34B, 34A, 300 y 79, éste último no presentó actividad antibacterial contra ninguna bacteria evaluada. La pérdida total de la actividad del extracto BCBS 79 y gran parte del BCBS 300, puede indicar baja estabilidad de los mismos. Los esfuerzos realizados por recuperar tal actividad (nuevas extracciones) fueron insatisfactorios.

Adicionalmente, se presentaron diferencias ligeramente significativas entre las bacterias patógenas evaluadas ( $F = 27.72$ ,  $df = 5$ ,  $P < 0.0001$ ) que explican tan sólo el 2.6% aproximadamente del total de la varianza, se concluyó que la especie más sensible a los extractos fue *S. aureus*. y la menos sensible *B. subtilis*. La interacción entre los dos factores fue considerada significativa ( $F = 24.83$ ,  $df = 35$ ,  $P < 0.0001$ ) y se refleja en las diferentes variaciones de la actividad antibacterial de los extractos de acuerdo a la bacteria empleada como blanco: el extracto 300 por ejemplo, exhibió actividad leve frente a *B. subtilis* y *E. faecalis* y nula para el resto de bacterias, mientras el extracto 43B presentó actividad contra todas las bacterias evaluadas. En total, los 3 extractos, BCBS 34A, 34B y 43B que mostraron mayor actividad fueron seleccionados para futuras evaluaciones.

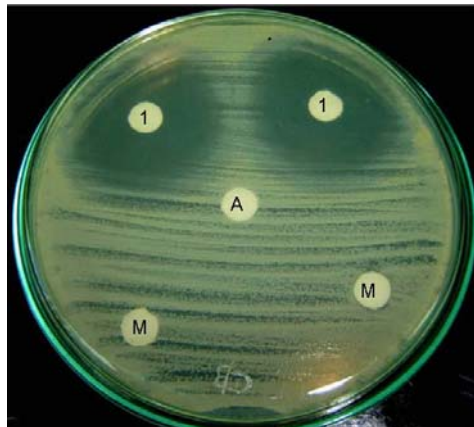


Figura 3. Actividad antibacterial del extracto BCBS 43B contra *S. aureus* en ensayo de difusión en agar. (1) extracto BCBS 43B; (A) agua; (M) metanol.

#### 4.1.2. Actividad antifúngica

Los extractos BCBS 34A, 34B, 43B, 67A, 67B y 80 seleccionados previamente, fueron evaluados en su actividad antifúngica contra diferentes cepas de hongos fitopatógenos. Estos exhibieron diferentes niveles de actividad y espectro de acción (Figura 4, Tabla 3).

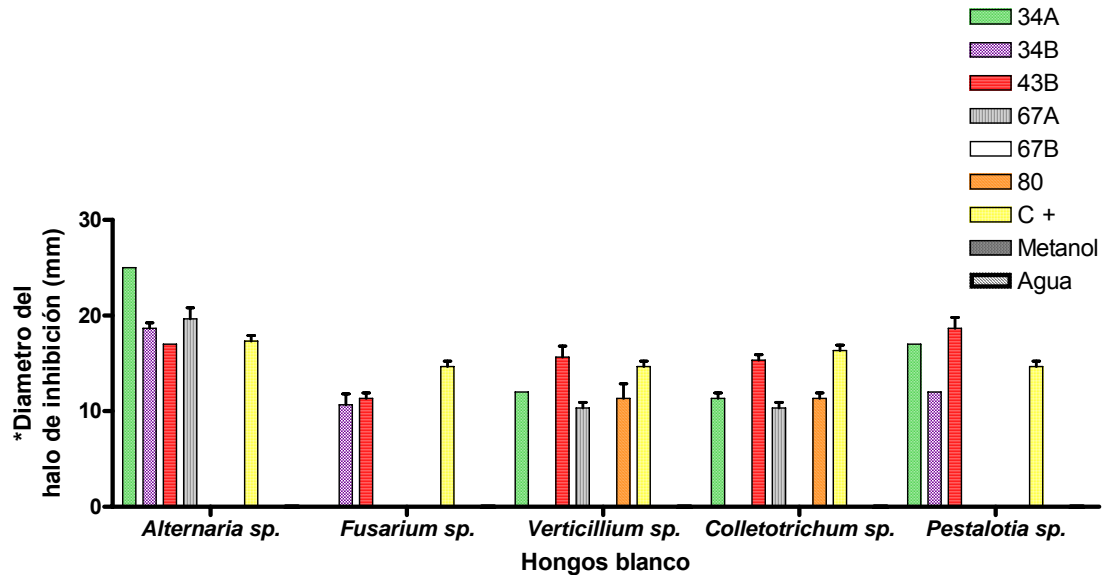


Figura 4. Actividad antifúngica de extractos bacterianos frente a hongos fitopatógenos.

\*Diámetro de los halos de inhibición incluyendo discos (6 mm), calculado con el promedio de las replicas por extracto. (C+) control positivo.

Tabla 3. Grado de actividad antifúngica de extractos bacterianos contra hongos fitopatógenos en ensayo de difusión en agar.

EXTRACTO	BCBS 34A	BCBS 34B	BCBS 43B	BCBS 67A	BCBS 67B	BCBS 80	MeOH	Agua	C+
<i>Alternaria sp.</i>	+++	++	++	++	-	-	-	-	++
<i>Fusarium sp.</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Verticillium sp.</i>	+	-	++	+	-	+	-	-	+
<i>Colletotrichum sp.</i>	+	-	++	+	-	+	-	-	++
<i>Pestalotia sp.</i>	++	+	++	-	-	-	-	-	++

+++; muy alto; ++, alto; +, leve; -, sin inhibición. C +, control positivo; MeOH, metanol.

La actividad antifúngica fue evaluada mediante ANOVA de dos vías con los extractos y los hongos fitopatógenos como factores. Se presentaron diferencias significativas entre todos los extractos evaluados ( $F = 2402.85$ ,  $df = 8$ ,  $P < 0.0001$ ). El extracto con mayor actividad fue el BCBS 43B, seguido en orden descendente

por los extractos 34A, 34B, 67A, 80 y 67B, éste último no presentó actividad antifúngica contra ningún hongo evaluado. Igualmente, se presentaron diferencias significativas entre los hongos fitopatógenos evaluados ( $F = 591.76$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.0001$ ), la especie más sensible a los extractos fue *Alternaria* sp. y la menos sensible *Fusarium* sp. La interacción entre los dos factores fue considerada significativa ( $F = 302.54$ ,  $df = 32$ ,  $P < 0.0001$ ) y se refleja en las diferentes variaciones de la actividad antifúngica de los extractos de acuerdo al hongo evaluado: el extracto 34A por ejemplo, demostró la máxima actividad antifúngica frente a *Alternaria*, mientras ninguna actividad frente a *Fusarium*, mientras, el extracto 43B tuvo actividad sobre todos los hongos evaluados.

Los mayores actividades antifúngicas las presentaron los extractos BCBS 43B, 34A y 34B (Figura 5) los cuales, también presentaron las mejores actividades antibacteriales. En consecuencia, estos extractos fueron considerados como altamente activos y de actividad dual (antibacteriana y antifúngica) y se incluyeron en análisis posteriores.

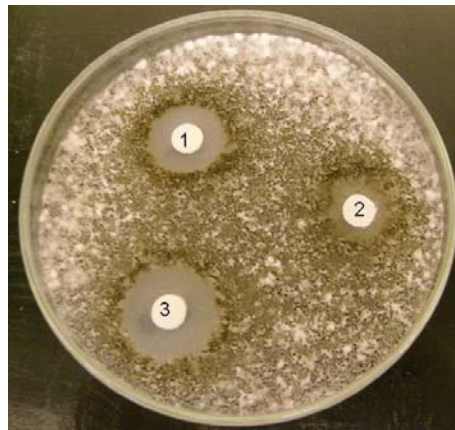


Figura 5. Actividad antifúngica de los extractos más activos (1) BCBS 34A, (2) BCBS 34B y (3) BCBS 43B contra el hongo fitopatógeno, *Pestalotia* sp. en ensayo de difusión en agar.

#### **4.1.3. Actividad insecticida**

El extracto BCBS 281 seleccionado en los ensayos preliminares, fue evaluado en cuanto a su efecto tóxico sobre larvas de primer instar de *A. aegypti* y *S. frugiperda*. Las Figuras 6 y 7 muestran la mortalidad de las larvas en *A. aegypti* y *S. frugiperda*, respectivamente. Las larvas de *A. aegypti* fueron ligeramente sensibles al ponerse en contacto directo con 10 y 20  $\mu\text{L}$  del extracto y no mostraron ningún efecto con la aplicación de 5  $\mu\text{L}$  del mismo. El efecto tóxico fue

considerado alto mostrando más del 80% de la mortalidad sobre larvas de *S. frugiperda* en contacto con el extracto crudo. Sin embargo, la mortalidad se vio considerablemente disminuida al diluir el extracto a la mitad (1:2) y fue prácticamente inactivo al diluirse en base 10 (1:100 y 1:1000).

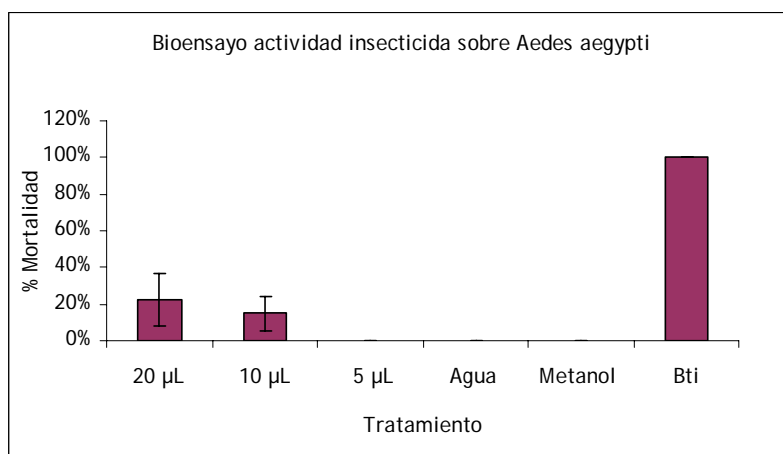


Figura 6. Toxicidad del extracto BCBS 281 frente a larvas de *A. aegypti* de primer instar.

% Mortalidad = Número de larvas muertas / Número larvas total\*100

Bti = *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

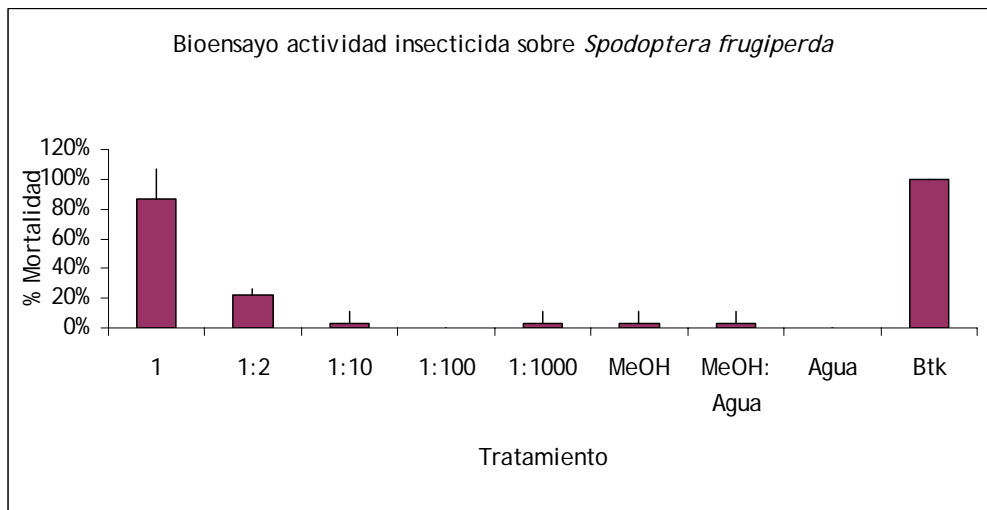


Figura 7. Toxicidad del extracto BCBS 281 frente a larvas de *S. frugiperda* de primer instar.

% Mortalidad = Número de larvas muertas / Número larvas total \*100.

Btk = *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

#### 4.2. Potencia de extractos antibacteriales

La actividad antibacterial de los extractos seleccionados como altamente activos (BCBS 34A, 34B y 43B) fue evaluada con el método de microdilución para conocer la potencia de los extractos. La Tabla 4 muestra los valores de máxima dilución inhibitoria observados en los extractos para cada una de las bacterias blanco. La comparación de estos valores mostró que el extracto BCBS 43B presentaba las máximas diluciones inhibitorias para todas las bacterias blanco excepto, *B. subtilis* en donde el extracto más diluido que mostró actividad fue el BCBS 34B. Esto indica que el extracto BCBS 43B en la mayoría de los especies evaluadas, presenta actividad antibacterial a concentraciones más bajas en las cuales los extractos BCBS 34A y BCBS 34B ya no muestran actividad. La máxima dilución inhibitoria (dilución más alta a la cual no se observó crecimiento de la bacteria patógena blanco) para los extractos BCBS 34A y 34B fue de 1/512 y para el extracto BCBS 43B fue de 1/1024, esta máxima dilución inhibitoria se presentó para todos los extractos sobre la bacteria fitopatógena *Ralstonia* sp. La figura 8 representa el crecimiento de la bacteria *Ralstonia* a través de diluciones de los extractos, estimado por la lectura de la densidad óptica a 595 nm posterior al periodo de incubación. En la figura 8 se corrobora que el mayor efecto inhibitorio en *Ralstonia* esta dado por el extracto BCBS 43B, que incluso es más activo que el control positivo (Estreptomocina 10 mg / mL). El control de metanol no mostró efecto tóxico.

Tabla 4. Máxima dilución inhibitoria de los extractos BCBS altamente activos.

<b>Ensayo de microdilución</b>			
Máxima dilución inhibitoria			
	<b>BCBS 34A</b>	<b>BCBS 34B</b>	<b>BCBS 43B</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	1/16	1/16	1/32
<b><i>E. faecalis</i></b>	1/32	1/32	1/64
<b><i>B. subtilis</i></b>	1/4	1/16	1/4
<b><i>E. coli</i></b>	1/64	1/64	1/64
<b><i>Erwinia</i> sp.</b>	1/64	1/64	1/128
<b><i>Ralstonia</i> sp.</b>	1/512	1/512	1/1024

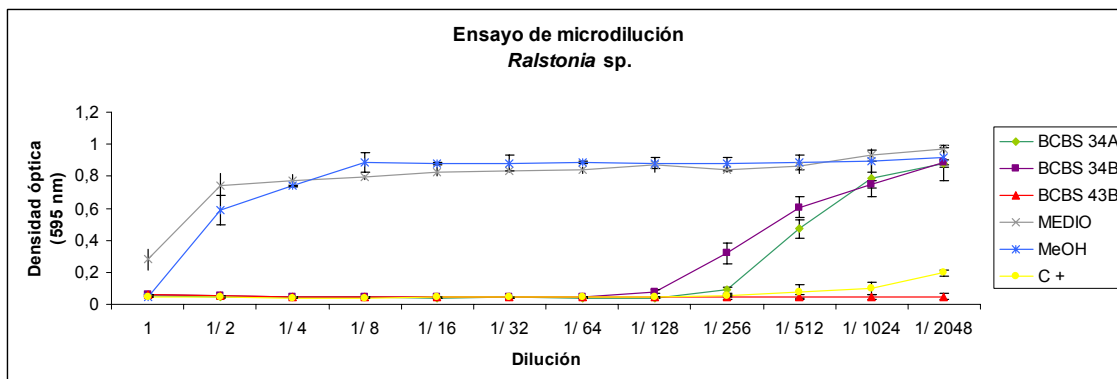


Figura 8. Crecimiento de *Ralstonia* sp. a través de diluciones de los extractos altamente activos. C+, Estreptomina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); MEOH, metanol 99%.

#### 4.3. Identificación de cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios altamente activos

Las cepas con mayor actividad dual, antibacterial / antifúngica, BCBS 34A, BCBS 34B, BCBS 43B y la cepa con actividad insecticida BCBS 281 fueron utilizadas en ensayos moleculares y bioquímicos para su identificación.

Para la identificación molecular, el ADN genómico extraído fue observado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 9).

La amplificación de los fragmentos de ADNr 16S se realizó para las 4 cepas BCBS 34A, 34B, 43B y 281 a partir de las respectivas extracciones de ADN. Los amplificadores del primer juego de cebadores (Eubac 27F - 1492 R) mostraron un tamaño aproximado de 1500 pb. Los amplificadores del segundo juego de cebadores (357F - 1100R) mostraron un tamaño aproximado de 800 pb (Figura 10).

El análisis de las secuencias del ADNr 16S amplificado por PCR mostró alta similitud y un valor E de gran confiabilidad (0.0) para las cepas BCBS 34A, 43B y 281. Las cepas BCBS 34A y 43B parecen pertenecer al género *Bacillus*, primordialmente *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens* con quienes comparten un 99% de similitud. Sin embargo, la región amplificada y secuenciada no presenta variación nucleotídica o polimorfismos que permitan la diferenciación a nivel de especie (ver anexo 1).

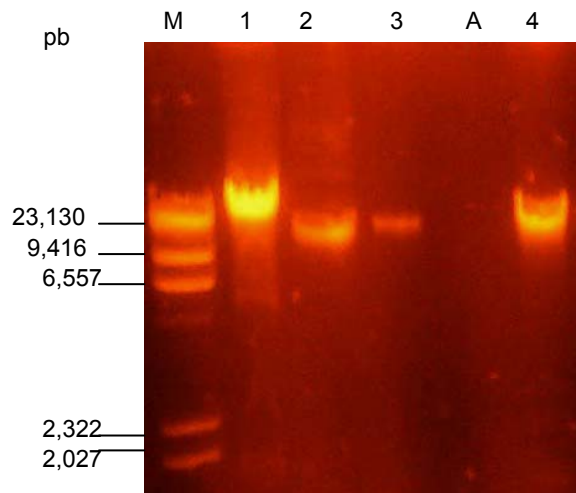


Figura 9. ADN genómico de las cepas bacterianas productoras de metabolitos secundarios con mayor actividad biológica. Líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a las cepas BCBS 34A, 34B, 43B y 281, respectivamente. La línea A corresponde al control negativo (agua) y M, al marcador de peso molecular lambda, digerido con *HindIII* (Promega).

El alineamiento de gran parte de la secuencia del ADNr 16S de las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* mostró un alto nivel de similaridad entre las dos secuencias lo que explica su cercana relación filogenética (ver anexo 2). Igualmente, la secuencia de la cepa BCBS 281 mostró el 99% de similaridad con la especie *B. pumilus* (ver anexo 3), la cual se presenta en la gran mayoría de los alineamientos más significativos. La secuencia determinada para la cepa BCBS 34B no permitió realizar una identificación confiable debido probablemente a una baja calidad en la secuenciación o a contaminación de la muestra. Todos los análisis llevados a cabo para la identificación de las cepas se realizaron con las secuencias determinadas a partir del primer juego de cebadores (Eubac 27F - 1492 R), dado que la secuenciación de los amplificadores del segundo juego de cebadores (357F - 1100R) mostró baja calidad.

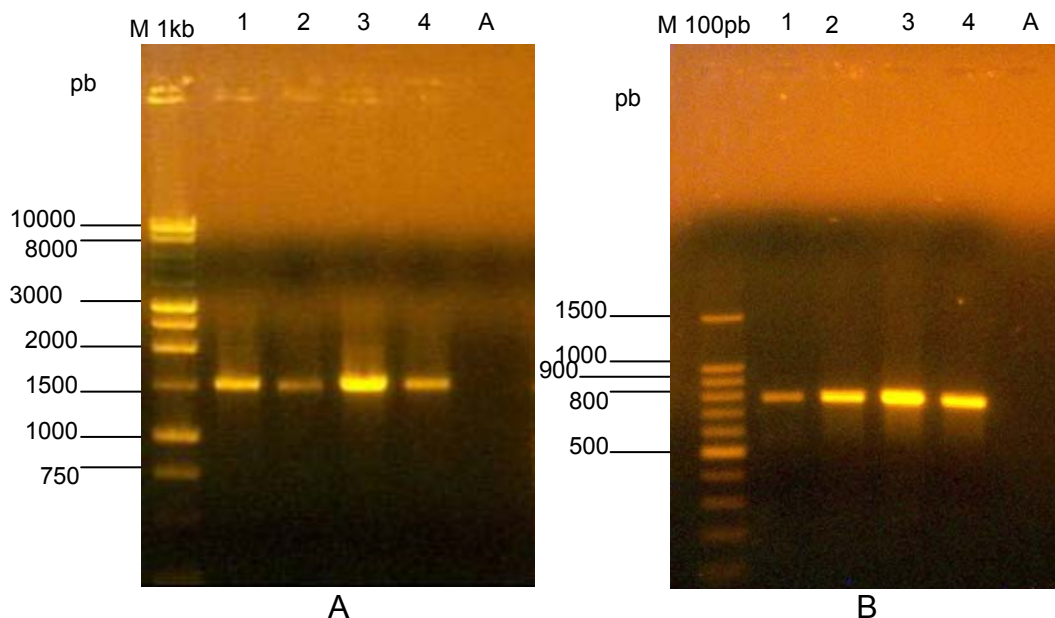


Figura 10. Amplificados de PCR para los genes del ADNr 16S con (A) cebador Eubac 21F – 1492R y (B) cebador 357F y 1100R corridos en gel de agarosa al 1%. Las líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a los amplificados de las cepas BCBS 34A, 34B, 43B y 281. M 1 kb y M 100 pb fueron los marcadores de peso molecular utilizados, marca Promega. Las líneas demarcadas como A corresponden a agua (control negativo).

El perfil bioquímico obtenido usando Biolog Microbial Identification System software (MicroLog™) en cada cepa (ver anexo 4) permitió concluir que la cepa BCBS 34B corresponde a la especie *B. amyloliquefaciens* con un 99% de probabilidad y un nivel de similaridad de 0.555 (ver anexo 5). Igualmente, la cepa BCBS 281 fue identificada como *B. pumilus*, con un 99% de probabilidad y 0.673 de similaridad (ver anexo 6). Estos resultados son congruentes con la identificación molecular. El perfil bioquímico obtenido para las cepas BCBS 34A y BCBS 43B no arrojó resultados concluyentes, la primera mostró un nivel de similaridad de tan sólo de 0.135 con *B. amyloliquefaciens* y la segunda, niveles de similaridad de 0.194 y 0.155 para las especies *B. circulans* y *Paenibacillus azotofixans*, respectivamente. El resumen de la identificación molecular y bioquímica de cada cepa con su respectiva similaridad se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de la identificación molecular y bioquímica de las cepas bacterianas BCBS altamente activas. (% Sim) porcentaje de similaridad; (% Pr) porcentaje de probabilidad; (N. Sim) nivel de similaridad; (-) no determinado.

Cepa bacteriana	Identificación molecular		Identificación bioquímica		
	% Sim	Especie	% Pr	N. Sim	Especie
BCBS 34A	99	<i>B. subtilis</i>	-	0.155	<i>B. amyloliquefaciens</i>
	99	<i>B. amyloliquefaciens</i>			
BCBS 34B	-	-	99	0.555	<i>B. amyloliquefaciens</i>
BCBS 43B	99	<i>B. subtilis</i>	-	0.194	<i>B. circulans</i>
	99	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	0.155	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
BCBS 281	99	<i>B. pumilus</i>	99	0.673	<i>B. pumilus</i>

#### 4.4. Microscopia electrónica de barrido

Con el fin de conocer el efecto del extracto BCBS 43B sobre las cepas blanco, se registraron los posibles cambios morfológicos de las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* tratadas con el extracto mencionado a través de microscopia electrónica de barrido. En las Figuras 10 y 11 se aprecian las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* respectivamente, después de 4 horas de contacto con el extracto BCBS 43B. En comparación con el control (sin extracto), el crecimiento de las bacterias en contacto con el extracto BCBS 43B disminuyó considerablemente.

Las células de *S. aureus* en el control se observaron por separado o en pares, a diferencia de las células en tratamiento con el extracto BCBS 43B, las cuales se observaron en agrupamientos irregulares. Las células de *E. faecalis* mostraron diferencias morfológicas al ponerse en contacto con el extracto mencionado, mientras en el control se observaron esféricas u ovoides.

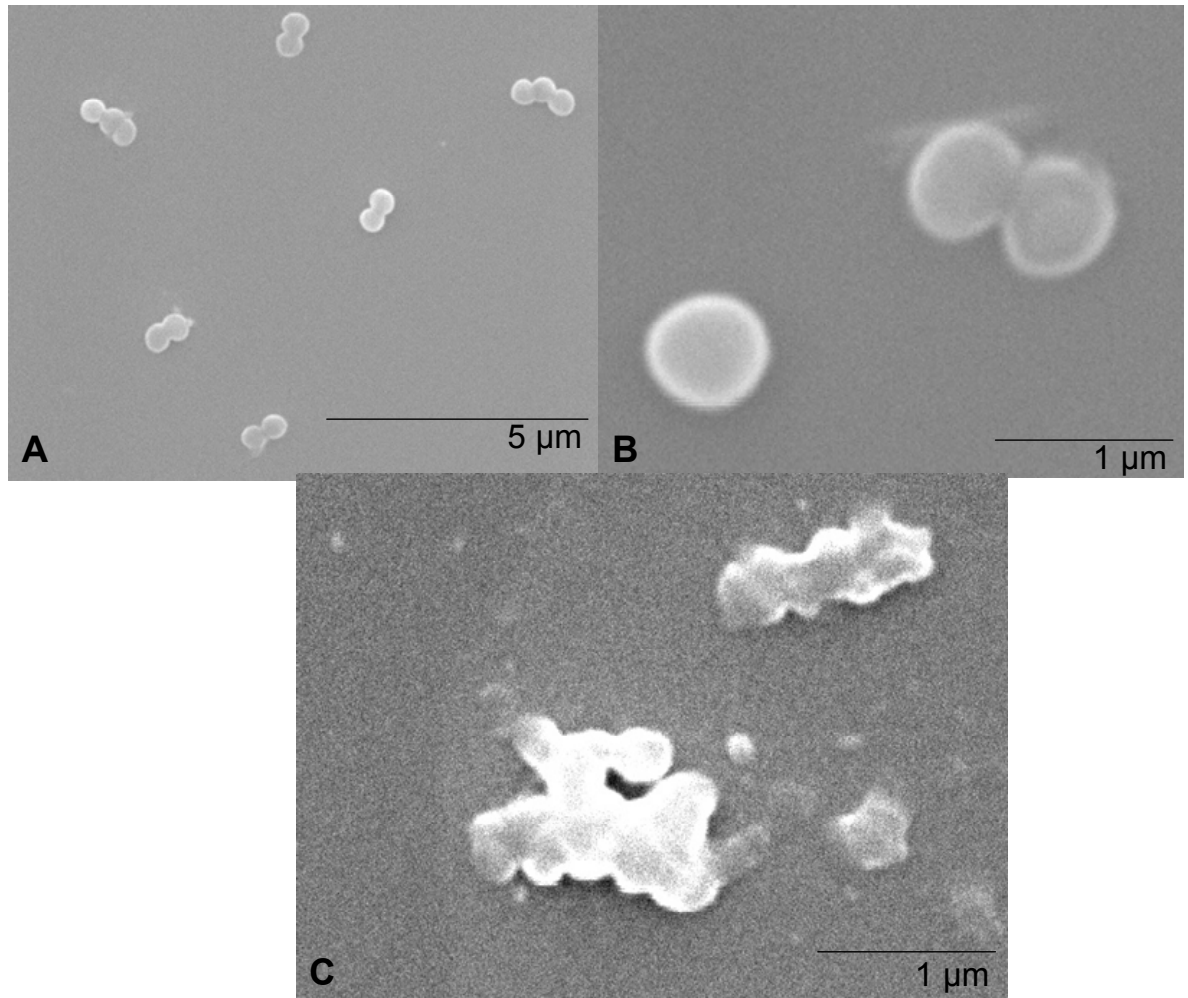


Figura 11. Microfotografías de la morfología de *S. aureus* en (A) y (B) tratamiento control a 5000 y 17000x respectivamente; y (C) en contacto con el extracto BCBS 43B.

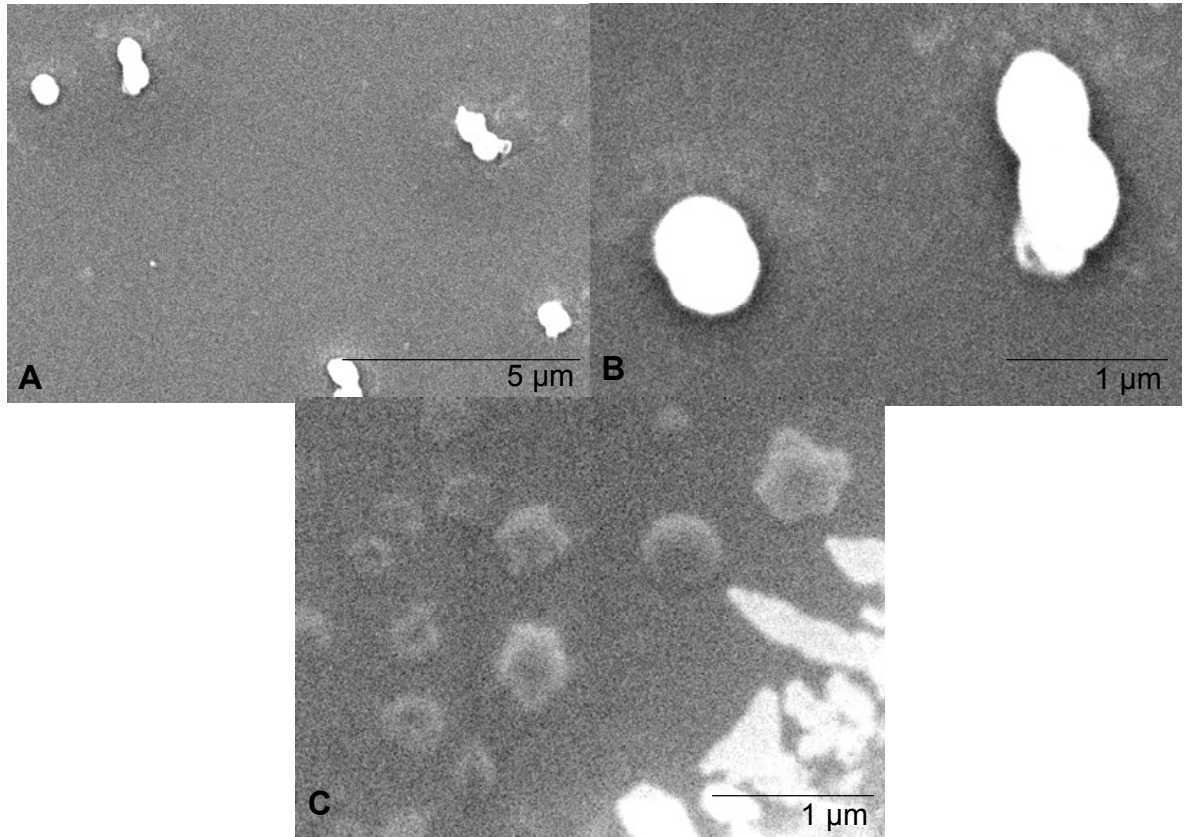


Figura 12. Microfotografías de la morfología de *E. faecalis* en (A) y (B) tratamiento control a 5000 y 17000x respectivamente; y (C) en contacto con el extracto BCBS 43B.

## 5. DISCUSIÓN

Los diversos extractos obtenidos de bacterias de suelo provenientes de diferentes regiones geográficas de Colombia fueron ensayados con el fin de conocer la presencia de sustancias antimicrobianas e insecticidas. Los extractos con actividad antimicrobiana sobresaliente frente a bacterias patógenas de humanos o patógenas de plantas y activos frente a la mayoría de los hongos fitopatógenos evaluados, fueron seleccionados de un total de 92 extractos bacterianos. La evaluación de la actividad antibacterial y antifúngica de los extractos seleccionados reveló que existe una acción diferencial de cada extracto sobre cada uno de los blancos evaluados.

En total, 3 extractos, BCBS 34A, 34B, 43B con actividad antibacterial y antifúngica, significativamente más alta fueron designados como altamente activos y seleccionados para análisis posteriores. En contraste, Los extractos BCBS 79, 300, 67A, 67B y 80 seleccionados preliminarmente, los dos primeros por presentar actividad antibacterial y los tres últimos por actividad antifúngica fueron excluidos debido a que mostraron actividad muy baja o nula en los ensayos posteriores. La actividad de estos extractos no fue recuperada a través de nuevas extracciones. La pérdida de la capacidad para producir metabolitos secundarios ha sido reportada para cerca del 40% de los microorganismos recientemente aislados (Demain y Fang, 2000). Esto ha sido atribuido a necesidades nutricionales insatisfechas o por lo contrario, condiciones de cultivo apropiadas (Romero-Tabarez *et al.*, 2006). Adicionalmente, se observó que los extractos BCBS 67A y 80 no presentaron las actividades antifúngicas de amplio espectro y por lo tanto, no fueron tenidas en cuenta para futuros análisis.

De otro lado, el extracto de la bacteria BCBS 281 resultó ser el único extracto con actividad insecticida contra larvas del orden Diptera (*Aedes aegypti*) y Lepidóptera (*Spodoptera frugiperda*), por lo tanto, fue analizado posteriormente.

La identificación molecular y bioquímica de las cepas bacterianas productoras de extractos de metabolitos secundarios antimicrobianos altamente activos encontradas en este estudio, mostró que todas pertenecen al género *Bacillus*. Esto corrobora que el género *Bacillus* continua siendo una fuente importante de metabolitos secundarios biológicamente activos (Demain y Fang, 2000).

Hasta hace un poco más de una década la mayoría de las investigaciones en la búsqueda de agentes para el control biológico de plantas se realizaba en bacterias gram negativas tales como, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Erwinia* (Siloh-Suh *et al.*, 1994). Sin embargo, en los últimos años las bacterias gram positivas como las del género *Bacillus* han mostrado su potencial para sintetizar una gran variedad de metabolitos con actividad antibacterial y/o antifúngica lo cual ha comenzado a ser

valorado e intensamente estudiado en la medicina e industria (Moyne *et al.*, 2001; Lisboa *et al.*, 2006). La habilidad de las especies formadoras de esporas de inhibir diferentes especies de hongos y bacterias es consecuencia de la secreción de compuestos con propiedades antimicrobiales, tales como las bacteriocinas u otros antifúngicos. Estos compuestos bioactivos pueden ser diferenciados en tres clases: polipéptidos antimicrobianos (bacteriocina, subtilisina), péptidos antifúngicos (bacilisina) y lipopeptidos antifúngicos (surfactinas, iturinas, y fengicinas) (Munimbazi y Bullerman, 1998; Moyne *et al.*, 2001; Sadfi *et al.*, 2002; Chitarra *et al.*, 2003; Alippi y Reynaldi, 2006; Caldeira *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2007).

Las mejores actividades antimicrobianas se encontraron en especies cercanamente relacionadas como lo son *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, las cuales además de ser fenotípicamente muy similares (Reva, 2004) fueron anteriormente designadas como de la misma especie en el manual de Bergey de 1986. Actualmente tienen el estatus de especies separadas (Holt *et al.*, 2000).

*B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son reconocidos por producir lipopéptidos con propiedades antifúngicas (Zuber *et al.*, 1993) tales como iturinas (Moyne *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2007) los cuales han sido usados para una gran variedad de patógenos de plantas tales como *Monilinia fruticola*, *Ophiostoma ulmi*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* y *Gloeosporium (Colleototrichum) gloeosporoides* (Cho *et al.*, 2003). Igualmente, éstas dos especies de *Bacillus* también han sido reconocidas por la producción péptidos antibacteriales tales como bacteriocinas y sustancias similares (Lisboa *et al.*, 2006), las cuales son comúnmente más activas contra bacterias cercanamente relacionadas con el organismo productor y no es frecuente que presenten actividades contra bacterias gram negativas (Zheng y Slavik, 1999). Sin embargo estas no son las únicas sustancias comunes entre estas dos especies las surfactinas, bacilomicinas, anfomicinas, acivicina, valinomicina y estenotricina, entre otras, también han sido caracterizadas como sustancias naturales antimicrobianas producidas por éstas dos especies (Wulff *et al.*, 2002).

La identificación a nivel específico de las cepas productoras de metabolitos secundarios antimicrobianos altamente activos no fue 100% confiable para todas las cepas. Sin embargo, se induce que las bacterias implicadas se encuentran cercanamente relacionadas y que incluso podrían pertenecer a la misma especie. No obstante, las ligeras diferencias encontradas en la actividad antifúngica de los extractos altamente activos implican necesariamente diferente composición, cantidad y calidad de los mismos. Estos resultados podrían corroborar la idea ya considerada por otros autores, que la producción de metabolitos secundarios se relaciona más a nivel de cepas que de especies (Wulff *et al.*, 2002; Alippi y

Reynaldi, 2006). Sin embargo, se requieren análisis posteriores más específicos que permitan la identificación definitiva de las especies y de los metabolitos que producen.

En el presente estudio, los extractos seleccionados como altamente activos producidos por bacterias del género *Bacillus* presentaron actividad antibacterial contra todas las bacterias patógenas blanco empleadas, tanto gram positivas como gram negativas y actividad antifúngica frente a la mayoría de los hongos fitopatógenos. Este hallazgo es importante ya que en la literatura se reporta más comúnmente la actividad de los antibióticos producidos por las especies de *Bacillus* contra hongos que contra bacterias (FoË ldes *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2002). Incluso, frecuentemente la evaluación de extractos de actinomicetos (considerados como la fuente más prolífica y versátil de antibióticos), *Lactobacillus*, hongos y plantas reporta la detección de mayor actividad antibacterial contra especies gram positivas y menor actividad contra bacterias gram negativas (Siloh-Suh *et al.*, 1994; Ali-Shtayeh *et al.*, 1998; Zheng y Slavik, 1999; Nostro *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2002; Gaspari *et al.*, 2005). Se estima que cerca del 90% de los antibióticos naturales carecen de actividad inhibitoria en organismos patógenos tales como *Escherichia coli* (Demain, 1999). La explicación a éste fenómeno recurrente se atribuye a las diferencias morfológicas de las paredes celulares entre las bacterias gram positivas y gram negativas. Las bacterias gram negativas contienen: en primer lugar, canales de porinas estrechos, lo cual, retarda la entrada a la célula incluso pequeños compuestos hidrofílicos, en segundo lugar, una mitad polisacárida, la cual reduce la difusión transmembranal de antibióticos lipofílicos y adicionalmente las bacterias gram negativas poseen una bomba de flujo múltiple de drogas, la cual elimina muchos antibióticos de las células (Demain, 1999). A pesar de las diferencias entre el efecto de los extractos altamente activos sobre cada bacteria blanco encontrados en este estudio, estos extractos funcionaron contra bacterias tanto gram positivas como gram negativas, incluso, la bacteria más sensible a los extractos fue gram positiva (*S. aureus*) al igual que la menos sensible que también fue gram positiva (*B. subtilis*), por lo tanto no se evidenció menor actividad inhibitoria sobre las especies gram negativas. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de los mejores extractos se promovió por la producción de un compuesto antimicrobiano de amplio espectro o varios compuestos con diferentes actividades y diferentes mecanismos de acción, los cuales por un efecto de sinergismo por combinación de antibióticos, presentan actividad frente a diferentes blancos evaluados.

De otro lado, el extracto de la especie *B. pumilus* presentó actividad insecticida contra larvas de dos especies representativas de dípteros y lepidópteros. *B. pumilus* ha sido comúnmente aislado del suelo y se ha caracterizado por producir sustancias con propiedades antimicrobianas (Munimbazi y Bullerman, 1997; FoË

Ides *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2002). Este es el primer reporte para la especie *B. pumilus* con la habilidad de producir alguna(s) sustancia(s) con efecto tóxico sobre diferentes larvas de insectos. En este estudio se evaluó la presencia de actividad antibacteriana en este extracto, pero el resultado fue negativo. De esta manera se presume que las características del extracto de esta cepa pueden estar relacionadas con el hecho mencionado que la producción de metabolitos secundarios en bacterias está más altamente relacionado a nivel de cepa que a nivel de especie (Wulff *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2002; Alippi *et al.*, 2006).

Las especies de *Bacillus* identificadas en este estudio, y muchos otros bacilos son habitantes comunes del suelo, o existen como epífitos o endofitos en la esfermósfera (Walker *et al.*, 1998) y rizósfera (Handelsman *et al.*, 1990). Esta característica hace posible el uso de las cepas biológicamente activas o de sus metabolitos como una alternativa o método suplementario prometedor para el control de patógenos de plantas (FoË Ides *et al.*, 2000). Por esta misma razón, no sería extraño que la cepa BCBS 43B, la cual no fue identificada con confiabilidad, pertenezca a cualquiera de las especies *Bacillus circulans* y *Paenibacillus azotofixans* con las cuales se mostró ligeramente similar, pues estas bacterias también han sido aisladas de suelos por sus capacidades inhibitorias de hongos patógenos (FoË Ides *et al.*, 2000; Tjamos *et al.*, 2004; El-Banna, 2005; Alippi y Reynaldi, 2005; Das *et al.*, 2007). Garbeva y sus colaboradores (2003) realizaron estudios moleculares de la diversidad de la microbiota por en suelos agrícolas y encontraron que el 95% del ADN presente pertenecía a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*.

Las especies de *Bacillus* además de encontrarse comúnmente en el suelo, presentan otras características especiales que las hacen buenas candidatas como agentes de control biológico. Primero, son conocidas como productoras de antibióticos con actividad contra hongos y algunos patógenos bacterianos (Siloh-Suh *et al.*, 1994; Wulff *et al.*, 2002). Segundo, son formadoras de esporas altamente resistentes las cuales tienen alta viabilidad comparada con las células vegetativas por ser resistentes a la desecación, calor, radiación u.v. y solventes orgánicos, lo cual es importante para procesos posteriores de formulación y comercialización (Walker *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2005). Tercero, la habilidad de colonizar plantas endofíticamente ha sido considerada como una característica importante para el control biológico de patógenos vasculares (Wulff *et al.*, 2002). Y cuarto, además de producir sustancias antimicrobianas, tienen actividad promoviendo el crecimiento de plantas. En particular, las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* han mostrado sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal, tales como giberelinas y ácido indol acético. El empleo de *B. subtilis* y sus especies relacionadas ha mostrado un incremento de varios cultivos en campo (Reva *et al.*, 2004).

## 6. CONCLUSIONES

La habilidad de producir metabolitos secundarios biológicamente activos fue detectada para 46 (50%) del total de 92 bacterias nativas de diversas regiones geográficas de Colombia. Un total de 3 extractos fueron seleccionados por presentar actividad antimicrobiana altamente significativa, de los cuales el extracto BCBS 43B presentó mayor potencial antibacterial. Los 3 extractos con mayor actividad fueron producidos por bacterias del genero *Bacillus*, las cuales han sido previamente estudiadas en cuanto a su producción de compuestos biológicamente activos contra hongos principalmente y bacterias. Tan sólo un extracto presentó la mayor actividad insecticida y fue producido por *Bacillus pumilus*, el cual no se ha reportado con producción de compuestos activos contra insectos. Los cambios morfológicos, tamaños celulares y agrupamientos anormales observados en las células de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* en contacto con el extracto BCBS 43B a través de microscopio electrónico corroboran la actividad antibacterial considerada en los ensayos de difusión en agar y microdilución. En el presente trabajo, se confirma la utilidad de ciertos productos naturales provenientes de bacterias nativas del país como una fuente de compuestos con potencial utilidad en el control de patógenos comunes en la salud y la agricultura.

## 7. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados presentados aquí, la actividad antimicrobiana e insecticida presentada por los extractos bacterianos puede deberse al efecto de una o más sustancias presentes en los extractos. Los siguientes estudios deben estar enfocados en la caracterización de los metabolitos antimicrobianos responsables de las actividades observadas. Es probable que por ser aislamientos nativos, poco estudiados puedan ser fuente de nuevos metabolitos antimicrobianos. La caracterización de la sustancia con efecto mortal sobre larvas de dípteros y coleópteros posiblemente conlleve a un nuevo metabolito que no haya sido reportado para esta especie.

La identificación definitiva de las cepas con actividades antimicrobianas es importante si se quieren potencializar como agentes de biocontrol y de promoción vegetal incluyendo la producción de polipéptidos antibacterianos y antifúngicos. Adicionalmente, deben realizarse pruebas de campo con el fin de conocer la efectividad de la(s) bacteria(s) antagonistas.

El uso potencial como fungicidas requiere mas investigaciones incluyendo una producción a gran escala purificación y caracterización así como evaluación de la toxicidad y degradación en el ambiente. (Munimbazi y Bullerman *et al.*, 1998)

## 8. BIBLIOGRAFIA

Alippi, A. M. and Reynaldi, F. J., 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J Invertebr Pathol.* 91:141-146.

Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour E. M. R., Faidi, Y. R., Salem, K. and Al-Nuri M. A. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J ethnopharmacol.* 60: 265-271.

Arango, J. A., Romero, M. and Orduz, S. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Appl Microbiol.* 92(3): 466-474.

Bauer, A. W., Kirby, W., Sherrus, J., and Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Baur, S., Niehaus, J., Karagouni, A. D., Katsifas, E.A., Chalkou, K., Meintanis, C., Jones, A., Goodfellow, M., Ward, A.C., Beil, W., Schneider, K., Süßmuth, R.D., Fiedler, H. P. 2006. Fluostatins C~E novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain. *J. Antibiot.* 59:293-297.

Bautista, G., Mendoza, H., y Uribe, D. 2007. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biol.Colomb.* 12(1):19-32.

Bogantes-Ledezma, P., Bogantes-Ledezma, D. y Bogantes-Ledezma, S. 2004. Aflatoxinas. *Acta Méd. Costarric,* 46(4):174-178.

Caldeira, A. T., Feio, S.S., Arteiro, J. M. S., Coelho, A. V., Roseiro, J. C. 2007. Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. *J. Appl Microbiol.* (OnlineEarly Articles)

Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., van Aelst, A.C., Rombouts, F. M., Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* Conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* 94: 159-166.

Cho, S., Lee, S-K., Cha, B. J., Kim, Y. H., Shin, K-S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 47-51.

- Ciccía, G., Coussio, J. Mongelli, E., 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. J. Ethno. Pharmacol. 72(1): 185-189.
- Cona, E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Rev. Chil. Infectol. 19(2):77-81.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. 2007. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. J. Appl. Microbiol. (OnlineEarly Articles)
- Demain, A. L. 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33:486-495.
- Demain, A. L. and Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. 1- 41 en: Fiechter, A. History of Modern Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin. Germany.
- Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(4): 455-63.
- El-Banna, N. M. 2005. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of the air flora World. J Microbiol & Biotechnol. 21:1451-1454.
- Engelmeier, D and Hadacek, f. 2006. Antifungal natural products: assays and applications. 423- 467. En: Rai and Carpinella. Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier. Amsterdam.
- Fernández.-Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Rev Manejo integrado de plagas. 62: 96-100.
- FoÈ Ides, T., BaÂnhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J. 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. J. Appl Microbiol. 89: 840-846.
- Frykman, S., Tsuruta, H., Galazzo J and Licari, P. 2006. Characterization of product capture resin during microbial cultivations. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33: 445-453.
- Garveba, P., van Veen, J., van Elsas J. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil onder different management regimes detected via PCR-DGGE. Microb. Ecol. 45: 302-316.

Gaspari, F., Paitan, Y., Mainini, M., Losi, D., Ron, E. Z., Marinelli, F. 2005. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. *J. Appl. Microbiol.* 98: 429-439.

González, J., Mancuso, N., Ludueña, P., y Ivancovich, A. 2003. Evaluación del comportamiento de líneas de girasol frente a *Verticillium dahliae*. ASAGIR. EEA Pergamino INTA. [En línea]: [http://www.asagir.org.ar/2\\_congreso/Murales/Gonzalez.pdf](http://www.asagir.org.ar/2_congreso/Murales/Gonzalez.pdf)

Granum, E. 2005. *Bacillus*. En: Fratamico, P. M., Bhunia, A. K and Smith, J. L. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology Chapter Abstracts [en línea]: <http://www.horizonpress.com/hsp/abs/absfbp.html>

Hadacek, F. y Greger, H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* 11:137-147.

Han, J. S., Cheng, J. H., Yoon, T. M., Song, J., Rajkarnikar, A., Kim, W. G., Yoo, I.D., Yang, Y.Y., Suh, J.W. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J. Appl. Microbiol.* 99: 213-221.

Hancock, L. E. and Gilmore, M. S. 2000. Pathogenicity of *Enterococci*. Section II. The *Streptococcus*. 251 - 259 en: Fischetti, V.A., Novick, R. P., Ferreti, J. J., Portnoy, D.A. Rood, J. I. Gram - positive pathogens. AMS Press. Massachusetts Ave., N.W. Washington, DC. United States of America.

Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L., Grau, C. R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 713-718.

Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warm, P. A and Bowyer, P. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology.* 153: 1677- 1692.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley J. T., Williams, S. T. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Lippincott Williams and Wilkins. Phyladelphia, USA.

Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. 2006. Informe redención de cuentas 2006. [En línea]: <http://www.ica.gov.co/Gestion/Infogerencia/FINAL%20INFORME%20AUDIENCIA.pdf>

- Kim, P. I. and Chung, K. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Micro. Let. 234(1): 177- 183).
- Latge, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin. Microb. Rev. 12 (2):310- 350.
- Lisboa, M., Boniato, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P., Brandelli, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. Int. Microbiol. 9:111-118
- Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. J. Biotechnol. 88: 277-282.
- Luzhetskyy, A., Pelzer, S., Bechthold, A. 2007. The future of natural products as a source of new antibiotics. Curr. Opin. Investig. Drugs. 8(8):608-613.
- Madrigal, A. 2003. Insectos forestales en Colombia biología hábitos, ecología y manejo. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. 848 pp.
- Maplestone, R. A., Stone, M. J., and Williams D. H. 1992. The evolutionary role of secondary metabolites -a review. Gene. 115:151-157.
- Marten, P., Smalla, K. and Berg, G. 2000. Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. J. Appl. Microbiol. 89: 463- 471.
- Mehl, H. L. and Epstein, L. 2007. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37°C and are interfertile. Environ. Microbiol. 9(9): 2189-2199.
- Melgarejo, L. M., J. Sánchez, C. Reyes, F. Newmark y M. Santos-Acevedo. Plan Nacional en bioprospección continental y marina (propuesta técnica) Bogotá: Cargraphics, 2002. 122p en: Serie de Documentos Generales INVEMAR No.11.
- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. Int. Microbiol. 6: 245- 252.

Moyne, A.-L., Shelby, R., Cleveland T. E., Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus avus*. J. Appl. Microbiol. 90: 622-629.  
Munimbazi, C. and Bullerman, L. B. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. J. Appl. Microbiol. 84 (6): 959-968.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. In Approved Standard M7-A5. 5th edition. NCCLS, Wayne, Pa; 2002.

Nostro, A., Germanò, M. P., D'angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 30(5):379-84

Novick, R. P. 2000. Patohogeninity factors and their reagation. Section III. The *Staphylococcus*. 392 – 408 en: Fischetti, V.A., Novick, R. P., Ferreti, J. J., Portnoy, D.A. Rood, J. I. Gram - positive pathogens. AMS Press. Massachusetts Ave., N.W. Washington, DC. United states of America.

Pardo-Cardona, V. M. 1995. Hongos fitopatógenos de Colombia. 1ra Edición. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia.

Promsiri, S., Nacksathit, a., Kruatrachue, M. and Thavara, U. 2006. Evaluations of larvicidal activity of medicinal plant extracts to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and other effects on a non target fish. Insect Science.13: 179-188.

Pushpalatha, E., and Muthukrishnan, J.1999. Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes. J. Appl. Ent.123: 369- 373.

Raaijmakers, J. M., Vlami M. and Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van leewenhoeck. 81: 537-547.

Reinchenbach, H. and Hofle, G. 1993. Production of secondary metabolites. 347-397. En: Dworkin, M. Mixobacteria II. ASM Press. Washington D.C. United States of America.

Reva, O., Dixelius, C., Meijer, J., Priest, F.G. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Ecol. 48: 249-259

Rincon-Castro, M. C., Mendez-Lozano, y Ibarra, J.E. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad biocida contra el gusano

cogollero del maiz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Folia Entomol. Mex. 45(2): 157- 164.

Romero-Tabarez, R., Jansen, R., Sylla, M., Lunsdorf, H., Haußler, Santarosa, D. A., Timmis, K. N., Molinari, G. 2006. 7-O-Malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Antimicrob. Agents Chemother. 50(5): 1701- 1709.

Sadfi, N., Chérif, M., Hajlaoui, M.R., Boudabbous, A., Bélanger, R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. Ann. Microbiol. 52: 323-337

Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P. Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., and Scoging, A. C. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 65(10):4637-4645.

Sambrook, J., Fritsch, E and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Second edition. USA. Cold Spring Harbort Laboratory Press. United States of America.

Senthil Nathan, S. 2006. The use of *Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Biortech. 98: 1856-1860.

Siloh-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, and Handelsman, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 60(6):2023- 2030.

Stone, M. J. and Williams, D. H. 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). Mol. Microbiol. 6(1):29-34.

Strohl, W. R. 2004. Antimicrobials. 336- 356 en: Bull A. T. Microbial Diversity and Bioprospecting. ASM Press. Washington, DC, United States of America.

Tans - Kersten, J., Huang, H. y Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J. Bacteriol. 183(12): 3597–3605.

Tasao, R., Romanchuk, F. E., Peterson, C. J., and Coats, J. R. 2002. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the tree of heaven (*Ailanthus altissima* L.). BMC Ecology. 2: 1- 8.

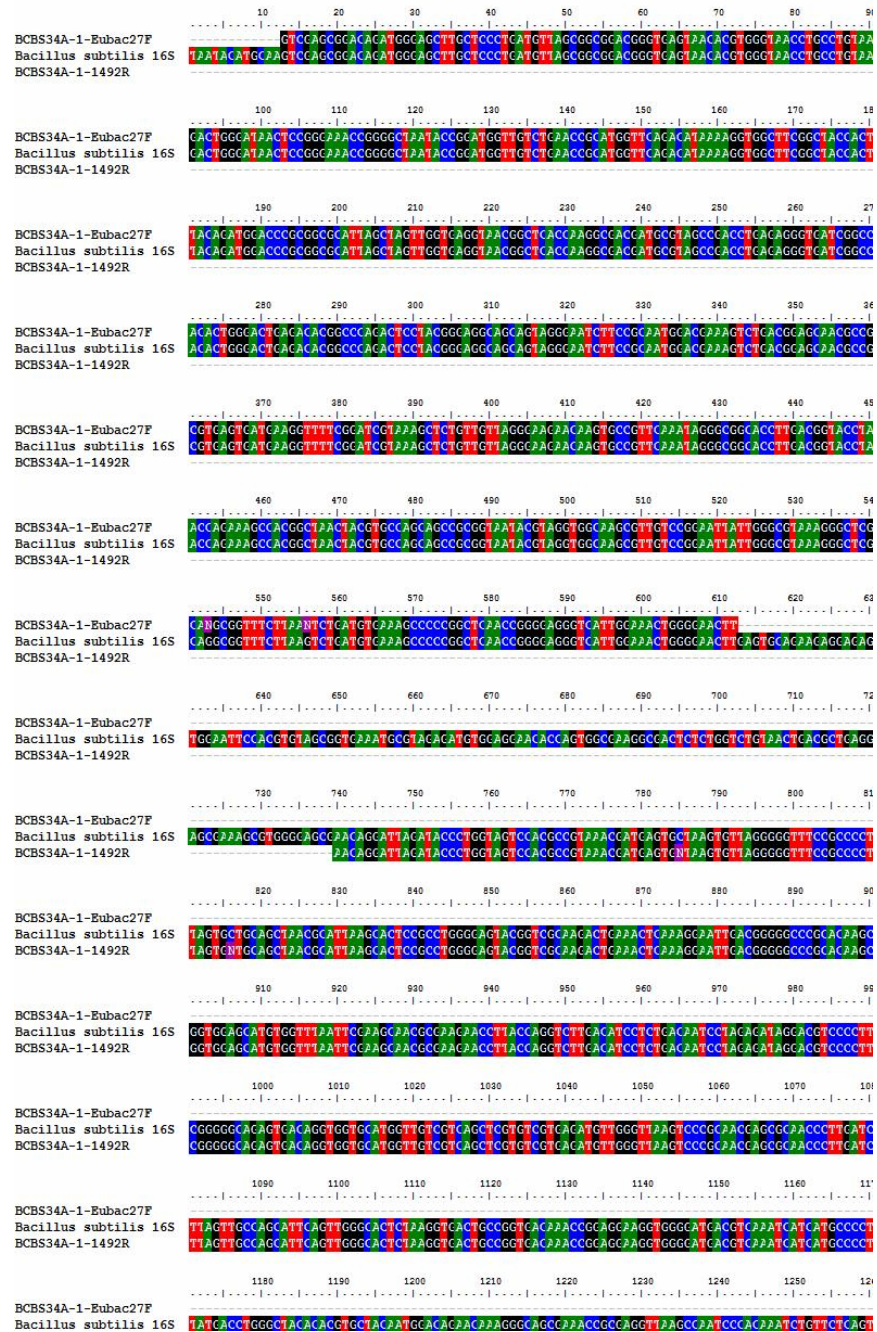
- Tibavizco, D., Rodriguez, J. Y., Silva, E. 2007. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. Biomédica. 27(2): 294-307.
- Tjamos, E. C., Tsitsigiannis, D. I., Tjamos, S. E. Antoniou, P. P., Katinakis, P. 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. Eur J Plant Pathol. 110: 35-44.
- Varela, G., Jasinski, C., Gadea, P., Tanzi, M. N., Mota, M. I., Arenas, C., Pardo, L., González, S., González, G., Sirok, A. y Schelotto, F. 2007. *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. Rev. Med. Urug. 23: 153-163.
- Velez, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: binomía y manejo integrado. Segunda edición. Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia, Colombia. 478 pp.
- Verdine, G. L. 1996. The combinatorial chemistry of nature. Nature. 384:11-13.
- Vincente, M. F., Basilio, A., Pelaez, F. 2003. Microbial natural products as a source of antifungals. Clin. Microbiol. Infect. 9: 15-32.
- Vining L. C. 1990. Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol. 44:395-427.
- Walker, R., Powell, A. A. and Seddon, B. (1998) *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. J. Appl. Microbiol. 84: 791-801.
- World Health Organization, WHO. 2005. The yellow fever situation in Africa and South America in 2004 weekly epidemiological record. 80(29): 249-255.[en línea]: <http://www.who.int/wer>
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Plant Pathol. 51: 574-584
- Zheng, G. and Slavik M. F. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Lett Appl Microbiol. 28: 363-367.

Zuber, P., Nakano, M., Marahiel, M.A. 1993. Isolation partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Peptide antibiotics. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria ed. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. pp. 897-916. Washington, DC: American Society for Microbiology

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

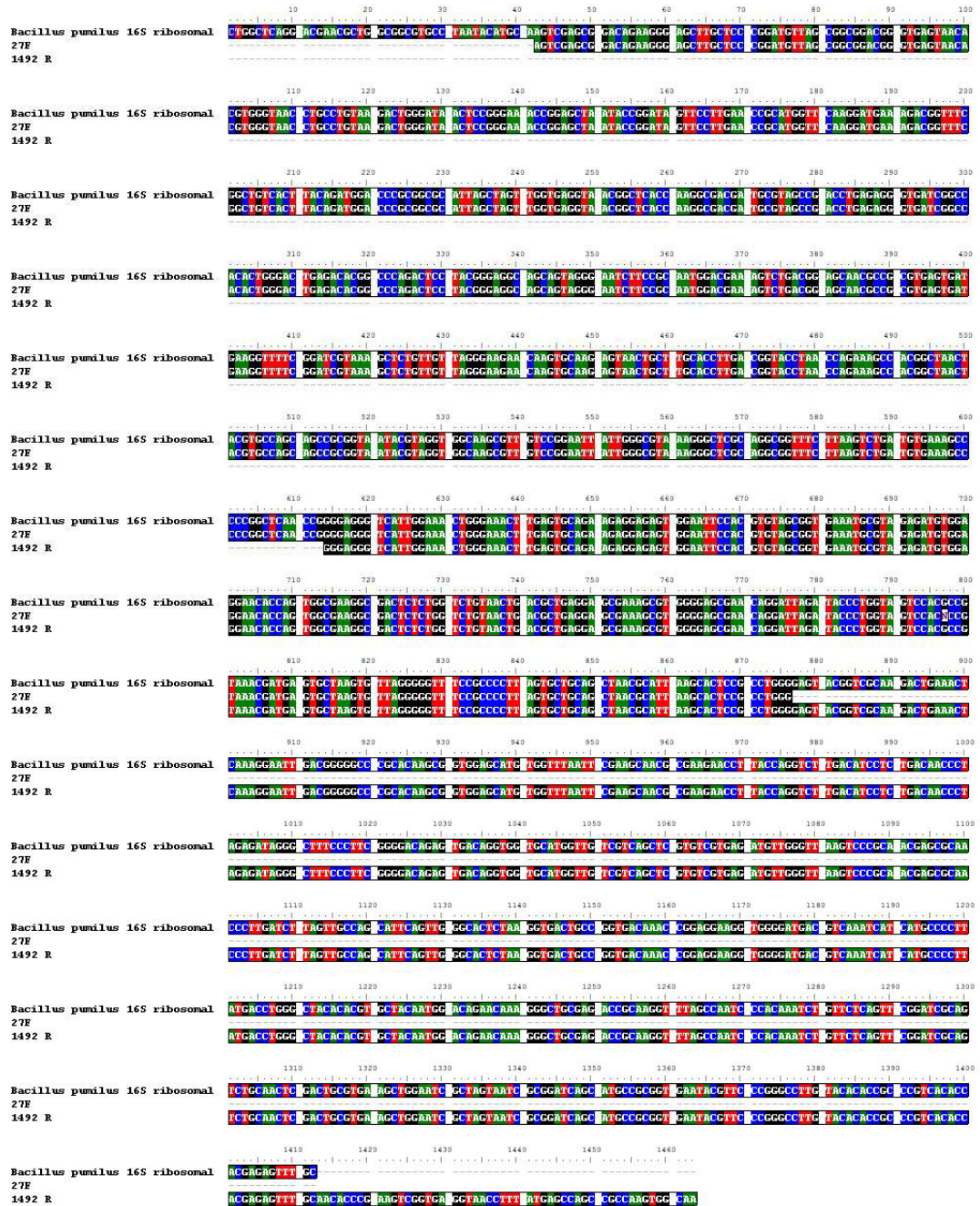
Alineamiento de la secuencia completa del ADNr 16S de *B. subtilis* con las secuencias amplificadas para la cepa BCBS 34A





## ANEXO 3

Alineamiento de la secuencia completa del ADNr 16S de *B. pumilus* con las secuencias amplificadas para la cepa BCBS 281



## ANEXO 4

Características bioquímicas de las cepas bacterianas productoras de extractos altamente activos

	BCBS 34A	BCBS34B	BCBS 43B	BCBS 281
<b>α-Cyclodextrin</b>	-	-	+/-	-
<b>β-Cyclodextrin</b>	+	-	+	-
<b>Dextrin</b>	+	+	+	+
<b>Glycogen</b>	+	+/-	+	-
<b>Inulin</b>	+	-	-	-
<b>Mannan</b>	+	+/-	+	-
<b>Tween 40</b>	+	+/-	+	+/-
<b>Tween 80</b>	+	+/-	+	+/-
<b>N-Acetyl-DGlucosamine</b>	+	+	+	+
<b>N-Acetyl-DMannosamine</b>	+	+	+	+/-
<b>Amygdalin</b>	+	+	+	+/-
<b>L-Arabinose</b>	-	-	+/-	-
<b>D-Arabitol</b>	-	-	+/-	-
<b>Arbutin</b>	+	+/-	+	+
<b>D-Cellulobiose</b>	+	+	+	+
<b>D-Fructose</b>	+	+	+	+
<b>L-Fucose</b>	-	-	-	-
<b>D-Galactose</b>	+	-	+/-	-
<b>D-Galacturonic</b>	+	-	+/-	-
<b>Gentiobiose</b>	+	+	+	+
<b>D-Gluconic</b>	+	+/-	+/-	-
<b>α-D-Glucose</b>	+	+	+	+
<b>m-Inositol</b>	+	-	+	-
<b>α-D-Lactose</b>	-	-	-	-
<b>Lactulose</b>	-	-	-	-
<b>Maltose</b>	+	+	+	-
<b>Maltotriose</b>	+	+	+	+/-
<b>D-Mannitol</b>	+	+	+	+
<b>D-Mannose</b>	+	+	+	+
<b>D-Melezitose</b>	+	+/-	+	-
<b>D-Melibiose</b>	+	+/-	+	-
<b>α-Methyl D-Galactoside</b>	+	-	-	-
<b>β-Methyl D-Galactoside</b>	+	-	-	-
<b>3-Methyl Glucose</b>	+	+	+	+
<b>α-Methyl D-Glucoside</b>	+	+	+	-
<b>β-Methyl D-Glucoside</b>	+	+/-	+/-	+
<b>α-Methyl D-Mannoside</b>	-	-	-	-
<b>Palatinose</b>	+	+	+	-
<b>D-Psicose</b>	+	+	+	+
<b>D-Raffinose</b>	+	+	+	-
<b>L-Rhamnose</b>	+	-	-	-
<b>D-Ribose</b>	-	+/-	-	+
<b>Salicin</b>	+	+	+	+
<b>Sedoheptulosan</b>	+	-	-	-
<b>D-Sorbitol</b>	+	-	+	+/-
<b>Stachyose</b>	+	-	+/-	-
<b>Sucrose</b>	+	-	+	+

D-Tagatose	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	+	+
Turanose	+	+	+	-
Xylitol	-	-	+/-	-
D-Xylose	-	+	-	-
Acetic Acid	-	-	+/-	-
$\alpha$ -Hydroxy Butyric Acid	-	-	-	-
$\beta$ -Hydroxy Butyric Acid	+	+/-	+/-	-
$\gamma$ -Hydroxy Butyric Acid	+	-	-	-
p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid	+	-	-	-
$\alpha$ -Keto Glutaric Acid	+	-	+/-	-
$\alpha$ -Keto Valeric Acid	+	-	+	-
Lactamide	+	-	-	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-
L-Lactic Acid	-	-	-	-
D-Malic Acid	-	-	-	-
L-Malic Acid	-	-	+	-
Methyl Pyruvate	+	+	-	+
Mono-methyl Succinate	+	+	-	-
Propionic Acid	+	+	-	+
Pyruvic Acid	+	+	+	-
Succinamic Acid	+	+	+/-	-
Succinic Acid	+	+	-	-
N-Acetyl L-Glutamic Acid	+	+	+	-
L-Alaninamide	+	+	-	-
D-Alanine	-	+/-	-	-
L-Alanine	+	+/-	-	+/-
L-Alanyl-glycine	+	-	-	-
L-Asparagine	+	+	-	+
L-Glutamic Acid	+	+	+/-	+
Glycyl- Lglutamic Acid	+	-	-	-
L-Pyroglutamic Acid	+	-	+/-	-
L-Serine	+	+/-	-	-
Putrescine	+	-	+	-
2,3-Butanediol	+	-	+	-
Glycerol	+	+	+	+
Adenosine	+	+	+/-	+
2'-Deoxy Adenosine	+	-	-	-
Inosine	+	+	+/-	-
Thymidine	+	+	+/-	+
Uridine	+	+	+/-	+
Adenosine-5'- Monophosphate	+	-	-	-
Thymidine-5'- Monophosphate	+	-	-	-
Uridine-5'- Monophosphate	+	-	+/-	-
Fructose-6- Phosphate	+	-	+/-	-
Glucose-1- Phosphate	+	-	+	-
Glucose-6- Phosphate	+	-	+	-
D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	+	+	+	-

+ = Prueba positiva; +/- = borderline - = Prueba negativa

## ANEXO 5

Análisis del perfil bioquímico de la cepa BCBS 34B por MicroLog™ Minutes

Biolog MicroLog1 4.20

MicroLog 4.2

**Welcome** **Data** **Exit**

---

**Plate Info**

Current Time: Dic 04 2007 14:34

Plate Number: 1

Sample Number:

Plate Type: GP2

Strain Type: GP-ROD SB

Strain Name:

Strain Number:

Incubation Time: 16-24

Other:

**Pos/Neg**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	+	●	●	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

---

Re-Read Read Next Print Save View Database Cluster Menu

---

**Species ID: Bacillus amyloliquefaciens**

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
=> 1	Bacillus amyloliquefaciens	99%	0.555	6.96	GP-ROD SB
2	Bacillus subtilis	0%	0.001	8.90	GP-ROD SB
3	Bacillus megaterium	0%	0.000	9.54	GP-ROD SB
4	Bacillus licheniformis	0%	0.000	9.78	GP-ROD SB
5	Paenibacillus pabuli	0%	0.000	10.74	GP-ROD SB
6	Bacillus circulans	0%	0.000	11.29	GP-ROD SB
7	Bacillus psychrosaccharolyticus	0%	0.000	11.33	GP-ROD SB
8	Bacillus subtilis(ATCC 6633)	0%	0.000	11.58	GP-ROD SB
9	Bacillus pumilus	0%	0.000	13.17	GP-ROD SB
10	Paenibacillus azotofixans	0%	0.000	13.82	GP-ROD SB
Other	-	-	-	-	-

## ANEXO 6

Análisis del perfil bioquímico de la cepa BCBS 281 por MicroLog™ Minutes

Biolog MicroLog1 4.20

MicroLog 4.2

**Welcome** | **Data** | **Exit**

---

**Plate Info**

Current Time: Dic 04 2007 14:47

Plate Number: 281

Sample Number:

Plate Type: GP2

Strain Type: GP-ROD SB

Strain Name:

Strain Number:

Incubation Time: 16-24

Other:

**Pos/Neg**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

---

Re-Read | Read Next | Print | Save | View Database | Cluster Menu

**Species ID: Bacillus pumilus**

ML4	NAME	PROB	SIM	DIST	TYPE
=> 1	Bacillus pumilus	99%	0.673	5.00	GP-ROD SB
2	Bacillus amyloliquefaciens	0%	0.000	8.30	GP-ROD SB
3	Bacillus subtilis	0%	0.000	9.09	GP-ROD SB
4	Bacillus maroccanus	0%	0.000	10.41	GP-ROD SB
5	Bacillus megaterium	0%	0.000	11.64	GP-ROD SB
6	Bacillus psychrosaccharolyticus	0%	0.000	11.65	GP-ROD SB
7	Bacillus licheniformis	0%	0.000	11.99	GP-ROD SB
8	Bacillus subtilis(ATCC 6633)	0%	0.000	15.67	GP-ROD SB
9	Bacillus cereus/thuringiensis	0%	0.000	16.64	GP-ROD SB
10	Paenibacillus pabuli	0%	0.000	17.66	GP-ROD SB
Other	-	-	-	-	-