Bol. Centro Invest. Biol. 40(1)

COMUNICACIÓN BREVE

Actividad antifúngica de extractos crudos de hongos marinos aislados de raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)

Isabel Castillo-Machalskis[1], Haydelba D'Armas[2], Sara Centeno[3] y Maximiano Núñez[4]

[1]Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Cumaná, Venezuela. Correo electrónico: icastillo@inia.gov.ve

[2]Departamento de Química, Escuela de Ciencias.

[3]Escuela de Bioanálisis.Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

[4]Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente. Cumaná 6101, Veneuela

Resumen

Se evaluó la actividad antifúngica de extractos de hongos marinos aislados de las raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). Los hongos se inocularon previamente en medio Agar Extracto Malta (AEM) con 50% de agua de mar durante un período de crecimiento de 60 días. Los extractos fúngicos se obtuvieron macerando los hongos con el medio de cultivo en una solución de acetona/cloroformo/etanol (3:2:1), y se dejaron reposar por 24 horas; la extracción se realizó continuamente por agotamiento. A partir de los extractos obtenidos se elaboraron antibiogramas por triplicado, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados y se aplicó una prueba de eficiencia, basada en un ANOVA I y la prueba Duncan. Los extractos crudos de *Trichoderma viride* 4MCMC1 y *Penicillium citrinum* (1)4MCMC4 mostraron la mayor eficiencia antifúngica sobre las cepas de *Candida albicans* ATCC 1023, con promedios de halos de inhibición de 3,08mm y 2,52mm, respectivamente; mientras que *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3, con un halo de inhibición de 5,46mm, exhibió mayor efectividad sobre *Trichosporum* sp. El efecto antifúngico de los extractos seleccionados, sugiere la presencia de sustancias bioactivas con potencial aplicabilidad farmacológica.

Palabras clave*:* Actividad antifúngica, *Aspergillus ochraceus, Candida albicans,* hongos marinos, *Penicillium citrinum, Rhizophora mangle, Trichoderma viride, Trichosporum* sp.

Antifungal activity of crude extracts of marine fungi isolated from red mangrove roots (*Rhizophora mangle* L.)

Abstract

We evaluated the antifungal activity of extracts of marine fungi isolated from red mangrove roots (*Rhizophora mangle* L.). Fungi were previously inoculated in Agar Malt Extract medium (AME) with 50% seawater, during a 60 day growth period. Extracts were obtained by macerating the fungi with the culture medium in an acetone/chloroform/ethanol solution (3:2:1), followed by a 24 hour resting period. Extraction was continuous until exhaustion. From the obtained extracts, antibiograms were elaborated in triplicate, diameter of the inhibition halos was measured, and an efficiency test (ANOVA I and Duncan test) was applied. Raw extracts of *Trichoderma viride* (1) 4MCMC1 and *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC4 showed the greatest antifungical efficiency on stocks of *Candida albicans* ATCC 1023, with inhibition halos of 3.08 mm and 2.52 mm, respectively, whereas *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3, with an inhibition halo of 5.46 mm, was more effective on *Trichosporum* sp. The antifungal effect of the selected extracts suggests the presence of bioactive substances with potential pharmacological applicability.

Key words*:* Antifungal activity, *Aspergillus ochraceus, Candida albicans,* marine fungi, *Penicillium citrinum, Rhizophora mangle, Trichoderma viride, Trichosporum* sp.

Recibido: 22 Septiembre 2003 . Aceptado: 20 Febrero 2006

Los hongos marinos constituyen un grupo de microorganismos capaces de biosintetizar metabolitos con estructuras novedosas (Atlas y Bortha 2002). Las poblaciones microbianas, en general, producen compuestos que desfavorecen el crecimiento de otras poblaciones, tales como ácido láctico, ácidos grasos, ácido sulfúrico, amoniaco, etanol u otros alcoholes de bajo peso molecular. Los antibióticos, producidos de forma natural por estas poblaciones, podrían suministrar beneficios en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal (Lodeiros *et al.* 1989, Riquelme *et al.* 1997, Castillo *et al.* 2000, 2001); en este contexto los hongos tropicales se están incorporando a los programas de preselección como potenciales productores de fármacos con nuevos modos de acción (De la Rosa y Gamboa 2003).

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

importantes para el aislamiento de hongos marinos productores de metabolitos con actividad antifúngica u otras propiedades bioactivas. El objetivo del presente trabajo de investigación es determinar la actividad antifúngica de extractos de hongos marinos aislados de raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.).

Los hongos marinos fueron suministrados por el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Zoología Tropical (IZT) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), los cuales se aislaron de raíces de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) de la Laguna de Tacarigua, estado Miranda, Venezuela (10°18'00"LN, 65°55'01"LW y 10°12'05"LN, 65° 43'00"LW), en el transcurso del año 2001, periodo en el cual se registraron variaciones de temperatura del agua entre 26-39 ºC, salinidad: 0‰-45‰, pH: 7,20-8,40, transparencia: 19 cm- 40 cm y profundidad: 7 cm-1,25 m, dependiendo del ciclo de mareas. Las cepas se identificaron debidamente de acuerdo a las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y Rubert y Streets (1979) con la siguiente nomenclatura: *Penicillium* sp. (1) 3MLLC5, *Penicillium citrinum* (14) 4MCMC16, *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC4, *Aspergillus niger* (1) 4MCMC8, *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3, *Trichoderma viride* (1) 4MCMC1, *Syncephalastrum racemosum* (2) 4MCMC10.

Cada cepa de hongo se inoculó en 100 mL de Agar Extracto Malta (AEM), con 50% de agua de mar filtrada y envejecida, en matraces de 1 litro en forma inclinada y con un tiempo de incubación de 60 días a 25ºC. La obtención de los extractos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología expuesta por Christophersen *et al.* (1999), con algunas modificaciones: se agregaron 100 mL de acetona/cloroformo/etanol (3:2:1) en los matraces de los hongos marinos con crecimiento de 60 días; se maceraron, incluyendo el medio de cultivo, y se dejaron digestar por dos días. Posteriormente el producto se tamizó y filtró, repitiendo el proceso de extracción cada 24 horas hasta agotamiento. El extracto, en fase orgánica, se utilizó para los análisis posteriores, previa evaporación del solvente a 40ºC, por medio de un rotaevaporador (Büchi), con baño de María incorporado.

La prueba antifúngica se realizó según el método de antibiograma descrito por Baüer *et al.* (1966), empleando discos de papel Whatman Nº 3 (10 mm de diámetro), impregnados con una solución de los extractos a ensayar (25 mL; 40 mg/mL). Se utilizaron como microorganismos reveladores, cepas de los hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* FP 3204*, Penicillium crustobum* FP 1711*, Fusarium decencellulares FP 2534,* procedentes del laboratorio de fitopatología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre; y los hongos levaduriformes, oportunistas en humanos, *Trichosporum* sp. FP 1224 y *Candida albicans* ATCC 1023.

Las cepas seleccionadas se inocularon en tubos inclinados con Agar Extracto Malta (AEM), e incubaron por una semana, a 30°C. A cada uno de los tubos sembrados con los hongos fitopatógenos, se añadió 10 mL de agua destilada estéril; se agitaron vigorosamente y se removieron los conidios. La densidad de estos últimos, en las preparaciones, se determinó utilizando la técnica de recuento directo con hematocitómetro. Los conidios se inocularon con una preparación de densidad 1×10^6 conidios/mL (0,1 mL), sobre cápsulas de Petri previamente servidas con AEM, y esparcidas con una espátula de Drigalsky. Las levaduras se inocularon con 0,1mL de una solución preparada, mediante la suspensión de una cantidad de cultivo, tomada con asa bacteriológica, en solución salina fisiológica (0,85%) hasta una turbidez igual al patrón Nº 2 de la escala de Mc Farland, con una concentración aproximada de 1×10^6 células/mL; posteriormente se sembraron sobre cápsulas de Petri previamente servidas con agar Mueller-Hinton y esparcidas con espátula de Drigalsky (Parkinson *et al*. 1971). Los antibiogramas se elaboraron, por triplicado.

Para garantizar la inocuidad de la solución extractora, se prepararon controles, por triplicado, impregnando discos de papel Whatman Nº 3 con la solución de extracción (25 µL), los cuales se colocaron sobre los hongos reveladores y se incubaron por una semana a 30°C. En caso de observar la formación de halos de inhibición, se restó el valor correspondiente a su tamaño del obtenido para cada extracto crudo. Por otra parte, se elaboraron controles inertes, por triplicado, colocando discos de papel de filtro Whatman Nº 3, con la finalidad de confirmar las condiciones de esterilidad de inocuidad de los mismos. Los halos de inhibición, tanto de los controles como de los extractos crudos, se midieron con un vernier digital (Mitutoyo; 0,01mm de apreciación). Se consideraron bioactivos los halos de inhibición adoptando los criterios expuestos por Monks *et al.* (2002), empleando diámetros de papel de filtro de 6 mm clasificados con 20µL de los extractos de organismos marinos.

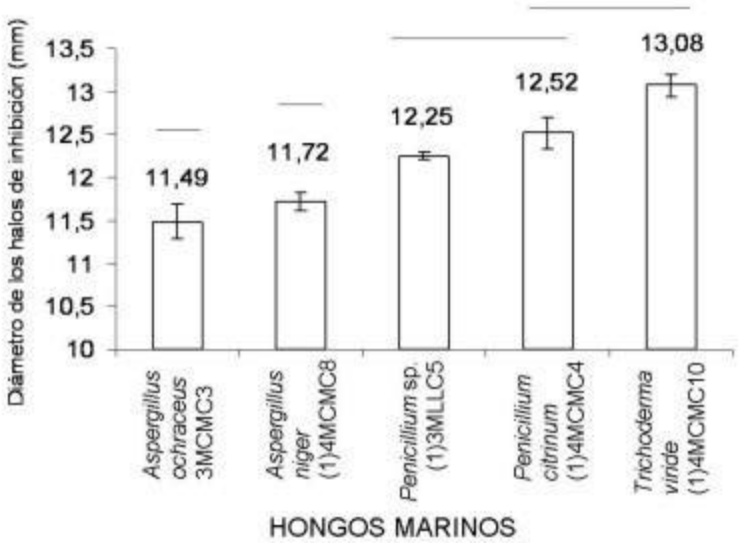
La eficiencia de los extractos se determinó mediante la comparación de los halos de inhibición sobre cada microorganismo revelador, usando Análisis de Varianza de una vía. La prueba de Duncan se aplicó a los resultados que presentaron diferencias significativas (Zar 1984).

Candida albicans ATCC 1023, mostró sensibilidad a seis de los extractos ensayados (85,71%). Los extractos de *Trichoderma viride* 4MCMC1 y *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC4 evidenciaron los mayores grados de efectividad sobre *C. albicans*, con promedios de los halos de inhibición de 13,08 ± 0,13 mm y 12,52 ± 0,19 mm, respectivamente; mientras que la menor efectividad correspondió a *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC16, con

un promedio de halos de inhibición de 1,1 ± 0,003 mm (ANOVA I a = 0,05; *F* = 85,81; Duncan a = 0,01) (Fig. 1).

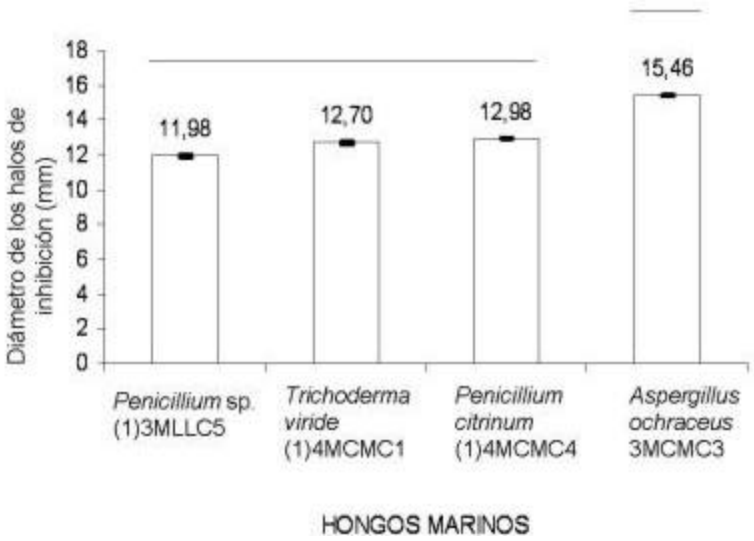
Trichosporum sp. presentó sensibilidad a cuatro de los extractos ensayados (57,14%). El extracto de *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3 resultó el más eficiente, con un promedio de los halos de inhibición de 5,46 ± 0,005 mm. Por otra parte, *Penicillium* sp. (1) 3MLLC5, *Trichoderma viride* (1) 4MCMC1 y *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC4, presentaron el mismo grado de efectividad sobre *Trichosporum* sp. (ANOVA I a = 0,05; *F* = 487,33; Duncan a = 0,01) (Fig. 2).

Los extractos de los hongos aislados de las raíces de mangle (*Rhizophora mangle* L.) inhibieron el crecimiento de los hongos reveladores levaduriformes (*Candida albicans* y *Trichosporum* sp.), oportunistas en humanos, mientras que los hongos fitopatogénicos, algunos pertenecientes al mismo género de los hongos marinos, no presentaron sensibilidad a los extractos ensayados. Los hongos levaduriformes mencionados probablemente, no son genéticamente resistentes a los metabolitos secundarios provenientes de especies ambientales, debido a que no pertenecen a microambientes comunes, y por ende no establecen relaciones interespecíficas con los hongos aislados del mangle (Atlas y Bartha 2002).



Shigemori *et al.* (1999, 2004), aislaron el metabolito Seragakinona A y el macrólido Sporiolido A de hongos marinos, los cuales inhibieron cepas certificadas de *Candida albicans* a concentraciones de 83 µg/mL y 16,7 µg/mL, respectivamente. El Sporiolido A es un antifúngico de amplio espectro, aislado de *Cladosporium* sp., y a diferencia de Seragakinona A es de espectro limitado. Estos resultados sugieren que algunas cepas de hongos marinos contienen metabolitos secundarios con propiedades inhibitorias contra

cepas de *Candida albicans* y que su espectro de acción puede ser variado.



Por otra parte, los extractos de *Trichoderma viride* 4MCMC1 y *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3 mostraron la mayor bioactividad sobre *Candida albicans* ATCC 1023 y *Trichosporum* sp., respectivamente (Figs. 1 y 2). Los extractos de las especies mencionadas, probablemente, contienen metabolitos con propiedades antifúngicas con modos de acción más efectivos sobre los microorganismos reveladores que resultaron sensibles. Aunado a esto, los hongos marinos producen otros grupos moleculares, con efectos tóxicos, que pudieran sumarse al efecto antifúngico de otras moléculas i.e. *Aspergillus ochraceus*, produce la micotoxina Ochratoxina A (OTA), sobre cuya toxicidad son determinantes los grupos bromuros y cloruros. En este sentido, se ha reportado que el cloruro de potasio estimula sustancialmente la producción de la micotoxina OTA (Stander *et al.* 2000) y de su análoga Ochratoxina B (OTB), diez veces menos tóxica que la primera (Xiao *et al.* 1995). La presencia de estas u otras micotoxinas y/o sus análogas en los extractos, podría estar relacionada con el efecto bioactivo observado.

Los extractos crudos de los hongos marinos ensayados son de espectro limitado; inhiben preferentemente el crecimiento de cepas de *Candida albicans* y *Trichosporum* sp., hongos oportunistas en los humanos. *Aspergillus ochraceus* 3MCMC3, *Penicillium citrinum* (1) 4MCMC4 y *Trichoderma viride* (1) 4MCMC1 mostraron la mayor eficiencia bioactiva, constituyendo fuentes potenciales de metabolitos con propiedades antifungicas. Estos resultados preliminares permitirán establecer criterios para seleccionar las cepas que presenten características antifungicas idóneas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar los estudios sobre el fraccionamiento de los extractos seleccionados con la finalidad de aislar sustancias bioactivas con propiedades antifungicas de aplicabilidad farmacológica.

LITERATURA CITADA

1. ATLAS R. y R. BORTHA. 2002 Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison Wesly Person Education, S.A., Madrid España. 677p.

2. BARNETT H. L. y B. B. HUNTER. 1972. Lustrated genera of imperfect fungi. Burgess publishing company. Minneapolis Minnesota, USA. Third Edition. 198 pp.

3. BAUER A., W. KIRBY, I. SHERRIS y M. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standarized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45(4): 493-496.

4. CASTILLO I., C. LODEIROS, M. NÚÑEZ y I. CAMPOS. 2000. Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. Rev. Biol. Trop. 49(3-4): 1213-1222.

5. CASTILLO I., C. LODEIROS, M. NÚÑEZ y I. CAMPOS. 2001. Efecto de sustancias antibacterianas producto de bacterias marinas sobre bacterias patógenas en animales. Revista Científica, FCV-LUZ, 11(3): 189-193.

6. CHEN G., Y. LIN, L. WEN, L. VRIJMOEDC y E. GARETH JONESC. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (no. 1893) from an estuarine mangrove on the south China sea coast. Tetrahedron, 59: 4907-4909.

7. CHRISTOPHERSEN C., O. CRESCENTE, J. FRISVAD, L. GRAM, J. NIELSEN, P. NIELSEN y L. RAHBAEK. 1999. Antibacterial activity of marine-derived fungi. Mycopathología 143:135-138.

8. DE LA ROSA S. y M. GAMBOA. 2003. Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. Ciencia Ergo Sum. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca. 11(002): 186-190.

9. KROHN K. y M. RIAZ. 2004. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. Tetrahedron Letters 45: 293-294.

10. LIN Y., X. WU, Z. DENG, J. WANG, S. ZHOU, L. VRIJMOED y E. GARETH JONESC. 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No.2606 from a salt lake in

The Bahamas. Phytochemistry 59: 469-471.

11. LODEIROS C., A. ESPíN, Y. ORDAZ y C. GONZáLEZ. 1989. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas en humanos. Acta. Cient. Venez. 40 (4): 254-256.

12. MONKS R., C. LERNER, A. HENRIQUES, F. FARIAS, E. SCHAPOVAL, E. SUYENAGA, A. DA ROCHA, G. SCHWARTSMANN y B. MOTHES. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (281): 1-12.

13. PARKINSON D., T. GRAY y S. WILLIAMS. 1971. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. IBP Handbook No. 19. Blackwell, Oxford, Inglaterra 675 pp.

14. RIQUELME C., R. ARAYA, N. VERGARA, A. ROJAS, M. GUAITA y M. CANDIA. 1997. Potential probiotic strain in the culture of the chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture 154: 17-26.

15. RUBERT B. y S. STREETS. 1979. The diagnosis of plan diseases a field and laboratory manual emphasizing the most practical method of rapid identification. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. USA. 117 pp.

16. SHIGEMORI H., K. KOMATSU, Y. MIKAMIA y J. KOBAYASHI. 1999. Seragakinone A, a new pentacyclic metabolite from a marine-derived fungus. Tetrahedron 55: 14925-14930.

17. SHIGEMORI H., Y. KASAI, K. KOMATSU, M. TSUDA, Y. MIKAMI y J. KOBAYASHI. 2004. Sporiolides A and B, new cytotoxic twelve-membered macrolides from a marine-derived fungus *Cladosporium* species. Mar. Drugs 2: 164-169.

18. STANDER M., P. STEYN, A. LUBBEN, A. MILIKOVIC, P. MANTLE y G. MARAIS. 2000. Influence of halogen salts on the production of the Ochratoxins by *Aspergillus ochraceus.* J. Agric. Food Chem. 48(5): 1865-1871.

19. XIAO H., R. MARQUARDT, A. FROHLICH y Y. LING. 1995. Synthesis and structure elucidation oj analogues of ocratoxin A. J. Agric. Food Chem. 43(2): 524-530.

20. ZAR J. 1984. Biostadistical Analysis. Second Edition. Prentice Hall, New Jersey, 717 pp.