



FUNGICIDAS Y BACTERICIDAS DE MICROORGANISMOS DE SUELO

MARIA ELENA CAZAR RAMIREZ
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE PRODUCTOS NATURALES

RESUMEN

El presente estudio aborda el aislamiento biodirigido de compuestos antimicrobianos provenientes del metabolismo secundario de hongos de suelo. La evaluación de la actividad fungicida y bactericida de extractos provenientes del cultivo líquido de 50 hongos obtenidos desde muestras de suelo, permitió seleccionar extractos de cuatro especies bioactivas: (*Aspergillus terreus*, *Penicillium janckzewskii*, *Acremonium potronii* y *Penicillium novae-zeelandiae*), las cuales fueron sometidas a un estudio químico biodirigido. El objetivo de esta tesis fue obtener compuestos naturales inhibidores del crecimiento de microorganismos fitopatógenos y de baja toxicidad a organismos no objetivo; con prospección a ser usados como modelo en el desarrollo de biopesticidas.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran el aislamiento, elucidación estructural y actividad biológica de los compuestos bioactivos de *Aspergillus terreus* Thorn. var. *terreus* y *Penicillium janckzewskii* K.M. Zaleski. El mismo trabajo se realizó con *Acremonium potronii* Vuill y *Penicillium novae-zeelandiae* van Beyma, sin llegar a la elucidación de la estructura de los compuestos aislados, debido a limitantes en la obtención de biomasa de extractos y compuestos.

Aspergillus terreus Thorn. var. *terreus*, proveniente de suelo colectado en Riobamba, Ecuador; fue cultivado en medio sólido y líquido, produciendo tres compuestos bioactivos: ácido terréico, butirolactona y lovastatina. Estos productos naturales y tres derivados semisintéticos de butirolactona I fueron evaluados como inhibidores del crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* y de las bacterias *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*. El ácido terréico y los derivados de acetilación e hidrogenación de butirolactona I son activos ante *E. carotovora* con

IC₅₀ de 5 y 4 – 8 µg/ml, respectivamente. Bajo las mismas condiciones experimentales la IC₅₀ de estreptomicina es 1,9 µg/ml. El derivado de hidrogenación de butirolactona I es moderadamente activo ante *P. syringae* y *B. cinerea* con IC₅₀ de 21 µg/ml y MIC de 15,6 µg/ml, respectivamente. Butirolactona I inhibe la germinación de la dicotiledónea *Lactuca sativa* con IC₅₀ de 5x10⁻⁵ M. La IC₅₀ del herbicida de referencia, acetoclor, fue 1x10⁻⁵ M.

Penicillium janckzewskii K.M. Zaleski, aislado de la rizósfera de *Prumnopitys andina* (Lleuque), cultivado en medio líquido produjo peniprequinolona, un alcaloide quinolínico aislado del endófito *P. janckzewskii*, proveniente del floema de *Prumnopitys andina*. Este hallazgo sugiere que al menos parte de los metabolitos secundarios producidos por el hongo son idénticos, tanto dentro como fuera del hospedero.

Acremonium potronii Vuill proviene de una muestra de suelo colectada en la rizósfera de alerce (*Fitzroya cupressoides*), en bosques nativos de la Isla de Chiloé, Chile. El hongo fue cultivado a escala preparativa, produciendo tres compuestos antimicrobianos. Los compuestos obtenidos inhiben el crecimiento de la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora*, con IC₅₀ en el rango de 2 – 21µg/mL. El trabajo de elucidación estructural de estos compuestos no nos llevó a resultados concluyentes sobre su estructura.

Penicillium novae-zeelandiae fue aislado a partir de una muestra de suelo colectada a orillas del Río Mataquito, VII Región, Chile. El extracto de líquido de cultivo de este hongo, al ser fraccionado, produjo un sólido amarillento, que resultó inactivo en los ensayos de actividad antimicrobiana realizados en este trabajo. Los resultados del análisis espectroscópico para este compuesto no permitieron obtener su estructura. Del extracto de micelio de *P. novae-zeelandiae* se obtuvieron dos fracciones antifúngicas, de cuya purificación se aisló ácido linolénico. Este ácido graso es producto muy común en el metabolismo de varios hongos.

En este trabajo se describen las metodologías empleadas en el aislamiento bioguiado de metabolitos fungales con actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work undertakes the bioguided isolation of antimicrobial compounds from the secondary metabolism of soil fungi. The screening of antifungal and antibacterial activity of 50 crude extracts obtained from liquid cultures of 50 soil fungi, allowed us to select four bioactive strains (*Aspergillus terreus*, *Penicillium janckzewskii*, *Acremonium potronii* and *Penicillium novae-zeelandiae*), which were submitted to a bioguided chemical study. The aim of the present work was to obtain natural products with further potential as agrochemicals, displaying antimicrobial activity towards phytopathogenic fungi and bacteria, and harmless to non target organisms.

The soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn var. *terreus* isolated from an ecuadorian soil sample was cultured in liquid and solid media and yielded three main metabolites identified as terreic acid (**1**), butyrolactone I (**2**) and lovastatin (**3**). The natural products as well as three synthetic butyrolactone I derivatives were assessed as inhibitors of the fungus *Botrytis cinerea* and the bacteria *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae*. Terreic acid and the acetylated and hydrogenated butyrolactone I derivatives were active towards the phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* with IC_{50} of 5 and 4-18 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Under the same experimental conditions, the IC_{50} of streptomycine was 1.9 $\mu\text{g/ml}$. The hydrogenation derivative from butyrolactone I was moderately active against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinera* with IC_{50} of 21 $\mu\text{g/ml}$ and MIC of 15.6 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Butyrolactone I also inhibited germination of the dicot *Lactuca sativa* with an IC_{50} of 5×10^{-5} M. The IC_{50} of the reference herbicide acetochlor was 1×10^{-5} M.

Penicillium janckzewskii K.M. Zaleski, isolated from the rizosphere of *Prumnopitys andina* (Lieuque) was cultured in liquid media yielding peniprequinolone, a quinolinic alkaloid found in the endophyte *P. janckzewskii*, isolated from the phloem of *Prumnopitys andina*. These findings suggest that some

secondary metabolites produced by the fungus are identical, inside and outside of the host. This work describes the methodology of bioguided isolation of fungal secondary metabolites.

Acremonium potronii Vuill was isolated from the rizosphere of *Fitzroya cupressoides* (alerce), in native forests of Chiloé Island, Chile. This fungus was grown in liquid culture, yielding three antimicrobial compounds. These substances inhibit the growth of the phytopatogenic bacteria *Erwinia carotovora*, showing a rank of IC₅₀ of 2 – 21 µg/mL. The structure elucidation work did not produce concluding results about the structure of these compounds.

Penicillium novae-zeelandiae was isolated from a soil sample collected at Mataquito's River edge, VII Region, Chile. From the liquid culture a yellow solid was isolated, which did not display antibacterial activity with the test organisms used in this work. The estructural elucidation of this compound was not possible. The bioguided separation of the mycelium extract yielded two compounds, identified as linolenic acid. This fatty acid is a common product of the fungal metabolism.

The metodological strategies used in the bioguided isolation of antimicrobial secondary metabolites from soil fungi are described in this work.

