

CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS Y HONGOS DE POSTCOSECHA CON EXTRACTOS DEL PIGMENTO DE *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*)

PATHOGENIC BACTERIA AND POSTHARVEST FUNGI CONTROL WITH PIGMENT EXTRACTS FROM *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*)

Ramón Villanueva-Arce¹, C. Arturo Aguilar-Pompa¹, Y. de las Mercedes Gómez y Gómez¹,
Gustavo Valencia-Del Toro¹, A. Belem Piña-Guzmán¹, Silvia Bautista-Baños²

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI). Instituto Politécnico Nacional (IPN). Avenida Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán. 07340 México, D. F. (rarc@ipn.mx). ²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi). IPN. Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla. 62731, San Isidro, Yautepec, Morelos.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar efectos del extracto etanólico crudo del pigmento rojo-púrpura producido por *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) en el control de las bacterias *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, la levadura *Candida albicans*, y los hongos *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3x2 de tratamientos: temperatura (20; 28 °C), pH (6; 8) y medio de cultivo sólido (PDA; EMA; Czapeck) y líquido (caldo papa; caldo extracto de malta y caldo Czapeck). Las variables de respuesta fueron tipo y hábito de crecimiento del micelio, color de la colonia, diámetro de la colonia (mm), tiempo (d) de aparición del pigmento y producción de biomasa (g). Con los datos se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con contrastes ortogonales. El pigmento se extrajo con etanol (96°), se concentró y usó 1.6 mg de este extracto diluido en 100 µL (16 mg mL⁻¹), en pruebas de control de bacterias patógenas y de hongos fitopatógenos. Las mejores condiciones de crecimiento fueron 20 °C, pH 6.0 en PDA. La aparición del pigmento rojo-púrpura fue 4 a 9 d después de la siembra. El crecimiento del hongo fue menor en medio líquido al igual que la producción del pigmento rojo. Después de 24 h sólo se observó inhibición del crecimiento en las bacterias *S. typhi* y *S. aureus*. El análisis de los resultados mostró la actividad antimicrobiana del pigmento producido por *G. zeae* para *S. typhi* y *S. aureus*, pero no para *B. subtilis*, *Shigella* sp., *E. coli*, *C. albicans*, *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate effects of crude ethanol extract of the reddish purple pigment produced by *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in the control of the bacteria *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, the yeast *Candida albicans*, and the fungi *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* and *C. gloeosporioides*. The experimental design was completely randomized with a 3x2 factorial arrangement of treatments: temperature (20; 28 °C), pH (6; 8), and solid (PDA; EMA; Czapeck) and liquid (potato broth; malt extract broth; Czapeck broth) culture media. The response variables were growth type and habit of the mycelia, colony color, colony diameter (mm), time (d) of pigment appearance and biomass production (g). With these data an ANOVA was performed and treatment means were compared with orthogonal contrasts. The pigment was extracted with ethanol (96°) and concentrated; 1.6 mg of this extract diluted in 100 µL (16 mg mL⁻¹) was used in pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi control tests. The best conditions for growth were 20 °C, pH 6.0 in PDA. The reddish-purple pigment appeared 4 to 9 d after sowing. Fungus growth was less in liquid medium as was red pigment production. After 24 h, inhibition of growth was observed only in the bacteria *S. typhi* and *S. aureus*. Analysis of the results revealed antimicrobial activity of the pigment produced by *G. zeae* against *S. typhi* and *S. aureus*, but not against *B. subtilis*, *Shigella* sp., *E. coli*, *C. albicans*, *C. acutatum*, *C. fragariae* or *C. gloeosporioides*.

Key words: fungal pigments, aurofarsarin, *Salmonella*, *Shigella*, *Colletotrichum*.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2012. Aprobado: agosto, 2013.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 47: 691-705. 2013.

Palabras clave: pigmentos fúngicos, aurofusarina, *Salmonella*, *Shigella*, *Colletotrichum*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos proveen una gran gama de metabolitos secundarios y algunos tienen actividad biológica que se puede usar en medicina, agricultura, alimentación, etc. (Carlile *et al.*, 2001). Los hongos basidiomicetes (macroscópicos) y filamentosos (microscópicos) producen compuestos antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y citostáticos, etc. (Brizuela *et al.*, 1998; Trigos *et al.*, 2005). Además, algunos basidiomicetes tienen actividad antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y reguladora de los niveles de azúcar y de colesterol, y se pueden usar en tratamientos clínicos (Stamets, 2002). La actividad antimicrobiana de los hongos es básicamente controlar bacterias y hongos (Carlile *et al.*, 2001) que causan enfermedades en hombres y animales (Gutiérrez *et al.*, 2004). Los géneros que pueden producir antibióticos son *Aspergillus*, *Acremonium* y *Penicillium* (Cantoral-Fernández, 2000). Otros hongos producen metabolitos secundarios (toxinas, pigmentos, etc.) con actividad biológica contra otros microorganismos (Trigos *et al.*, 2005), pero no se conocen los compuestos responsables de dicha actividad antimicrobiana. Los hongos filamentosos *Monascus* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. producen pigmentos que son melaninas, betalainas, quinonas, xantinas, flavonoides, curcuminoides, carotenoides, isocromos e iridoides, los cuales tienen especial interés industrial y alimenticio (González-Ruiz *et al.*, 2009).

Un género de hongo filamentoso importante en la agricultura y el manejo de granos y semillas, por sus toxinas y los daños causados es *Fusarium* spp. (Nelson *et al.*, 1983). Algunas especies de *Fusarium* pueden presentar, en medios de cultivo sintético, colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo-rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura, e incluso azuladas (Nelson *et al.*, 1983). El pigmento puede estar dentro del micelio o disperso en el medio de cultivo en el cual se desarrolla el hongo. En *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.: Fr.) Petch], el pigmento está asociado con la producción de la toxina aurofusarina, una naftoquinona (Medentsev *et al.*, 2005) presente en granos forrajeros contaminados y asociado con el cambio de la yema

INTRODUCTION

Fungi provide a broad spectrum of secondary metabolites and some have biological activity that can be used in medicine, agriculture, food, etc. (Carlile *et al.*, 2001). Basidiomycetes (macroscopic) and filamentous (microscopic) fungi produce several antimicrobial, antiviral and cytostatic compounds, among others (Brizuela *et al.*, 1998; Trigos *et al.*, 2005). Moreover, some basidiomycetes have anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activity, while others regulate blood glucose and cholesterol levels and can be used in clinical treatment (Stamets, 2002). The antimicrobial activity of fungi basically controls bacteria and fungi (Carlile *et al.*, 2001) that cause disease in humans and animals (Gutiérrez *et al.*, 2004). The genera that can produce antibiotics are *Aspergillus*, *Acremonium* and *Penicillium* (Cantoral-Fernández, 2000). Other fungi produce secondary metabolites (toxins, pigments, etc.) with biological activity against other microorganisms (Trigos *et al.*, 2005), but the compounds responsible for this antimicrobial activity are not known. Filamentous fungi *Monascus* spp., *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. produce pigments which are betalain, quinone, xanthine, flavonoid, curcuminoid, carotenoid, isochrome and iridoid types, which are of special interest for industry and food (González-Ruiz *et al.*, 2009).

One genus of filamentous fungus important for its toxins and the damage caused in agriculture and grain and seed management is *Fusarium* spp. (Nelson *et al.*, 1983). Some species of *Fusarium* can, in synthetic culture media, appear as white, cream, orange, brown, reddish brown, scarlet red, pink, purple, and even bluish colonies (Nelson *et al.*, 1983). The pigment may be found in the mycelia or dispersed in the culture medium where the fungus grows. In *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein.: Fr.) Petch], the pigment is associated with the production of the toxin aurofusarin, a naphthoquinone (Medentsev *et al.*, 2005) present in contaminated forage grains and linked to change in egg yolk from yellow-orange to dark brown (Kotyk *et al.*, 1990). Some of the pigments produced by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. may have antimicrobial activity against fungi and bacteria (Ammar *et al.*, 1979) and, therefore, it is not ruled out that the pigments produced by *F*

de huevo de naranja amarillento a pardo oscuro (Kotyk *et al.*, 1990). Algunos de los pigmentos producidos por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. pueden tener actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias (Ammar *et al.*, 1979) por lo que no se descarta que los pigmentos producidos por *F. graminearum* también lo tengan. El objetivo de este estudio fue evaluar el extracto crudo de color púrpura de *G. zeae* (*F. graminearum*) obtenido de material vegetal muerto, en el control de bacterias de interés clínico (*Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), la levadura *Candida albicans* y hongos de postcosecha (*Colletotrichum* spp.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Zonas de muestreo

Material vegetal, vivo (plantas) o muerto (residuos), con síntomas (necrosis, pudriciones, etc.) de ataque por hongos (fitopatógenos o saprófitos) fue recolectado desde enero a septiembre de 2009 en localidades de los estados de Guerrero (Chilacachapa, 18° 16' 21" N, 99° 44' 25" O, 1700 msnm), Michoacán (Zirahuén 19° 25' 41" N, 101° 42' 37" O, 2118 msnm), Morelos (San Isidro 18° 49' 30" N, 99° 05' 48" O, 1061 msnm) y el Estado de México (Coatepec Harinas 18° 55' 26" N, 99° 46' 04" O, 2266 msnm; La Marquesa 19° 17' 10" N, 99° 22' 42" O, 3080 msnm, Ejido de la Finca, 18° 53' 08" N, 99° 37' 32" O, 1831 msnm). El material recolectado se trasladó en bolsas de papel dentro de cajas térmicas (20 °C) al laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotechnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en la Ciudad de México, D. F.

Aislamiento y purificación de hongos

Las muestras recolectadas se usaron para preparaciones temporales en glicerol al 20 % y se observaron en un microscopio óptico para detectar signos (esporas, micelio, cuerpos fructíferos, etc.). En las muestras donde había esporas, los hongos se purificaron por la técnica de cultivos monospóricos (monoconidiales): una porción de micelio con esporas y se diluyó en tubos con agua destilada estéril, el líquido se vació en cajas petri con agar e incubadas 24 h a 25±2 °C en condiciones ambientales de luz. La caja petri se observó en un microscopio estereoscópico y se identificó la germinación de las esporas. Las esporas germinadas se aislaron individualmente, se sembraron en cajas petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) e incubadas 5 d a 25±2 °C con luz ambiental. Las muestras de material vegetal sin presencia de signo

graminearum also have it. The objective of this study was to evaluate the crude purple extract of *G. zeae* (*F. graminearum*) obtained from dead plant material in the control of bacteria of clinical interest (*Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), the yeast *Candida albicans* and postharvest fungi (*Colletotrichum* spp.).

MATERIALS AND METHODS

Sampling areas

Plant material, alive (plants) or dead (residues), with symptoms (necrosis, rotting, etc.) of attack by fungi (phytopathogens or saprophytes), was collected from January to September 2009 in localities of the states of Guerrero (Chilacachapa, 18° 16' 21" N, 99° 44' 25" W, 1700 masl), Michoacán (Zirahuén 19° 25' 41" N, 101° 42' 37" W, 2118 masl), Morelos (San Isidro 18° 49' 30" N, 99° 05' 48" W, 1061 masl) and the Estado de México (Coatepec Harinas 18° 55' 26" N, 99° 46' 04" W, 2266 masl; La Marquesa 19° 17' 10" N, 99° 22' 42" W, 3080 masl, Ejido de la Finca, 18° 53' 08" N, 99° 37' 32" W, 1831 masl). The collected material was transported in paper bags inside ice boxes (at 20 °C) to the Food Safety laboratory of the Interdisciplinary Professional Unit of Biotechnology (UPIBI) of the National Polytechnic Institute (IPN) in Mexico City.

Isolation and purification of fungi

The collected samples were used for temporary preparations in 20 % glycerol and observed under an optical microscope to detect signs (spores, mycelia, fruiting bodies, etc.). In the samples where spores were present, fungi were purified using the monosporic (monoconidial) culture technique: a portion of mycelia with spores was diluted in tubes containing distilled sterile water; the liquid was poured into Petri dishes with agar and incubated for 24 h at 25±2 °C under environmental light. The Petri dishes were observed under a stereoscopic microscope for spore germination. The germinated spores were isolated individually and sown in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) and incubated 5 d at 25±2 °C under environmental light. The samples of plant material without sign of fungi were placed in humid chambers at 25±2 °C and 90-95 % RH with environmental light to favor sporulation. The live material with symptoms of fungi attack (phytopathogens) were cut into sections of live and dead tissue and disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite. These samples were washed three times with distilled sterile water, dried with sterile paper and sown in Petri dishes (100×10 mm) with PDA and malt extract

de los hongos, se colocaron en cámaras húmedas a 25 ± 2 °C y 90-95 % HR con luz ambiental para favorecer la esporulación. En el material vivo, con síntomas de ataque de hongos (fitopatógenos), se cortaron secciones de tejido vivo y muerto, y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 %. Estas muestras se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel estéril, se sembraron en cajas petri (100×10 mm) con PDA y extracto de malta agar (EMA) y las cajas petri sembradas se incubaron 3 d a 25 ± 2 °C con luz ambiental. Las colonias desarrolladas fueron aisladas y cuando produjeron esporas, se purificaron por cultivos monosporicos o punta de hifa. Las colonias desarrolladas y con esporas formadas se conservaron en una solución de glicerol al 20 % a -84 °C. Durante el aislamiento y crecimiento de los hongos se identificaron las colonias que produjeron algún metabolito (pigmento) o causaron inhibición o muerte de colonias fungosas o bacterianas.

Identificación de hongos productores de pigmentos

La identificación a nivel genérico de los hongos se realizó comparando las características morfológicas de la colonia y del tipo de estructuras (esporas) con claves taxonómicas de identificación de Barnett y Hunter (1998). Los hongos que no produjeron esporas se identificaron y caracterizaron a nivel molecular. Muestras de colonias puras (punta de hifa) se enviaron al laboratorio de la Estación Nacional de Epidemiología Cuarentena y Saneamiento Vegetal en Querétaro, estado de Querétaro, para la extracción del ADN ribosomal, amplificación, secuenciación y alineación con las bases de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de EE.UU.

Caracterización cultural del hongo y producción de pigmentos

Una vez identificado el hongo de interés se estudió y caracterizó en medio sólido y líquido (caldo) para encontrar las mejores condiciones de crecimiento y producción del pigmento. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 3×2 de tratamientos: temperatura (20, 28 °C), pH (6, 8) y medio de cultivo [PDA, EMA, Czapeck (Cza)]. En los medios líquidos sólo se excluyó agar [caldo papa dextrosa (CPD), caldo extracto de malta (CEM), caldo Czapeck (CCza)]. Las variables de respuesta fueron hábito de crecimiento del micelio, color de la colonia, diámetro de colonia (mm), tiempo (d) de aparición del pigmento y producción de biomasa (g). La unidad experimental fue una caja petri o un tubo de ensayo inoculado con micelio del hongo y hubo tres repeticiones por cada tratamiento. Con los datos se realizó un ANDEVA, y las medias de los tratamientos se compararon con contrastes ortogonales usando SAS (1988).

agar (EMA). The seeded Petri dishes were incubated 3 d at 25 ± 2 °C with environmental light. The developed colonies were isolated and, once they produced spores, they were purified by monosporic, or hypha point, cultures. The developed colonies with formed spores were conserved in a 20 % glycerol solution at -84 °C. During fungus isolation and growth, the colonies that produced some metabolite (pigment) or caused inhibition or death of fungal or bacterial colonies were identified.

Identification of pigment-producing fungi

Genus level identification of the fungi was done by comparing the morphological characteristics of the colony and the type of structures (spores) with the Barnett and Hunter (1998) taxonomic identification keys. The fungi that did not produce spores were identified and characterized at the molecular level. Samples of pure colonies (hypha point) were sent to the laboratory of the National Station of Epidemiological Quarantine and Plant Health in Querétaro, state of Querétaro, for ribosomal DNA extraction, amplification, sequencing and alignment with the databases of the gene bank of the National Center for Biotechnological Information (NCBI) of the United States.

Cultural characterization of the fungus and pigment production

Once the fungus of interest was identified, it was studied and characterized in solid and liquid (broth) media to find the best conditions for growth and production of the pigment. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of treatments of 3×2 : temperature (20, 28 °C), pH (6, 8) and culture medium [PDA, EMA, Czapeck (Cza)]. In the liquid media agar [potato dextrose broth (PDB), malt extract broth (MEB), Czapeck broth (CCza)] were excluded. The response variables were growth habit of the mycelia, colony color, colony diameter (mm), time (d) to appearance of the pigment, and biomass production (g). The experimental unit was one Petri dish or one inoculated test tube with mycelia of the fungus; treatments were replicated three times. With the data, an ANOVA was performed and treatment means were compared with orthogonal contrasts using SAS (1988).

For the solid medium, a 5 mm disc of PDA with mycelia was deposited in the center of each Petri dish with solid medium (20 mL) and incubated 10 d under the conditions described above. In all cases, assessments were daily, except for the production of biomass that was done only after the 10 d incubation period. For these evaluations, the Petri dishes were placed in a water bath to liquefy the medium and the mycelia was placed in aluminum

Para el medio sólido se depositó un disco (5 mm) de PDA con micelio en el centro de cada caja petri con medio de cultivo sólido (20 mL) y se incubaron 10 d en las condiciones señaladas. En todos los casos las evaluaciones fueron diarias, excepto en producción de biomasa que sólo se hizo a los 10 d. Para esto, se colocaron las cajas petri en baño maría hasta licuar el medio, y con unas pinzas se colocó el micelio en charolas de aluminio de peso conocido. Las muestras se secaron (60 °C por 2 d) en una estufa (Cole Parmer® Mod. 05015-51. USA). Por diferencia de peso con el peso inicial, se calculó la producción de biomasa (g). En los medios de cultivo líquidos se depositó un disco (5 mm) de PDA con micelio en tubos de ensayo de 50 mL con 30 mL de medio de cultivo líquido. Los tubos se incubaron en agitación (100 rpm) 10 d en las condiciones indicadas. El micelio de cada tubo se extrajo por filtración bajo una campana de flujo laminar y se calculó la producción de biomasa como se hizo para los medios sólidos.

Extracción, purificación e identificación del pigmento

Para extraer el pigmento producido por las colonias de 20 d de edad se probaron solventes orgánicos: cloroformo (99.8 %, High Purity®), éter de petróleo (99.99 %, Alyt®), acetona (99.5 %, High Purity®) y etanol 96° (99.5 %, Meyer®). Primero se removió el micelio con un asa bacteriológica, el medio sólido (agar) se fragmentó, se colocó en morteros y se maceró con cada solvente separadamente. Las muestras maceradas se colocaron en matraces de 500 mL y se agregó más solvente hasta alcanzar un volumen de 200 mL (o el equivalente para una relación 2:1) y se agitaron manualmente por 10 min. Las muestras se colocaron 10 min en un sonicador Ultrasonic Cleaner Mod. AS3120B (AutoScience®, Tianjin, China) para favorecer la ruptura de las células y mejorar la extracción del pigmento, y luego se agitaron 10 min con el mismo equipo. La pigmentación de cada uno de los solventes se observó y se eligió aquel con mayor intensidad de color. El pigmento se concentró por destilación simple hasta evaporar la mayor cantidad del solvente: la muestra se filtró y se destiló 30 min. Después se agregó sulfato ferroso anhidro (para absorber restos de humedad) y se filtró para remover los restos del sulfato. El extracto crudo se depositó en viales de vidrio de 20 mL y se cubrieron con papel aluminio para protegerlos de la luz. Parte de este extracto crudo líquido se concentró en un rotovapor con vacío Hahnvapor Mod. HS-2000NS (HahnShin®, Corea del Sur) (70 °C, 30 min), y el concentrado se depositó en un vial de vidrio de 2 mL con tapa perforada. Finalmente se determinó el peso del extracto (mg) obtenido de cada repetición (cajas petri).

Para separar y purificar el pigmento, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) de Sílica Gel 60G (Merck® Millipore, Darmstadt, Alemania), como fase móvil se usó diferentes

trays of known weight using tweezers. The samples were dried (60 °C for 2 d) in an oven (Cole Parmer™ Mod. 05015-51. USA). Biomass production was calculated as the difference in weight between initial and dry weight. In the liquid culture media, a 5 mm disc of PDA with mycelia was placed in each 50 mL test tube containing 30 mL of liquid culture medium. The tubes were shaken (100 rpm) during incubation for 10 d under the conditions described above. Mycelia was extracted from each tube by filtration under a laminar flow bell and biomass was calculated in the same way as in the case of solid media.

Pigment extraction, purification and identification

To extract the pigment produced by 20-d old colonies, organic solvents were tested: chloroform (99.8 %, High Purity™), petroleum ether (99.99 %, Alyt™), acetone (99.5 %, High Purity™) and 96° ethanol (99.5 %, Meyer™). First, mycelia was removed with a bacteriological loop; the solid medium (agar) was fragmented, placed in a mortar and macerated with each solvent separately. The macerated samples were placed in 500 mL flasks; more solvent was added to reach a volume of 200 mL (or the equivalent for a 2:1 ratio) and the mixture was shaken manually for 10 min. The samples were placed in an Ultrasonic Cleaner Mod. AS3120B (AutoScience®, Tianjin, China) sonicator for 10 min to favor cell rupture and improve pigment extraction; they were then shaken for 10 min in the same equipment. Pigmentation of each of the solvents was observed and the one that had the most intense coloring was selected. The pigment was concentrated by simple distillation until the greatest amount possible of the solvent was evaporated; the sample was filtered and distilled for 30 min. Anhydrous iron sulfate was then added (to absorb any remaining moisture) and filtered to remove any remaining sulfate. The crude extract was placed in 20 mL glass vials and covered with aluminum foil to protect it from light. Part of this liquid crude extract was concentrated in a vacuum rotovapor, Hahnvapor Mod. HS-2000NS (HahnShin™, South Korea) (70 °C, 30 min), and the concentrate was deposited in in a 2 mL glass vial with a perforated lid. Finally, weight (mg) of the extracts obtained from each of the replications (Petri dishes) was determined.

To separate and purify the pigment, thin layer chromatography (TLC) was performed in Silica Gel 60G (Merck® Millipore, Darmstadt, Germany), using different combinations of solvents as mobile phase [methanol (99.5 %, High Purity®): hexane (98.5 %, High Purity™) (8:2), hexane:ethyl acetate (99.5 %, Meyer®) (8:2) and dichloromethane (99.8 %, Reasol™): ethyl acetate (8:2)]. The migration and visualization system of the pigment was evaluated. The chromatographic plate was developed with sulfuric acid (10 %) at 40 °C. Thin layer chromatography

combinaciones de solventes [metanol (99.5 %, High Purity®): hexano (98.5 %, High Purity®) (8:2), hexano: acetato de etilo (99.5 %, Meyer®) (8:2) y diclorometano (99.8 %, Reasol®): acetato de etilo (8:2)]. El sistema de migración y visualización del pigmento fue evaluado. El revelado de la placa cromatográfica se hizo con ácido sulfúrico (10 %) a 40 °C. La cromatografía en capa fina se realizó con el solvente de mejor visibilidad y revelado, comparando el patrón de migración del pigmento con el de estándares de colorantes (safranina, rojo de metilo, rojo neutro, fucsina básica y naranja de xileno). La concentración usada como testigo para cada colorante químico fue 0.1 mg mL⁻¹. El factor de retención (Rf) de cada muestra se reporta y la similaridad del pigmento obtenido se determinó en función del Rf. Después se realizó una cromatografía en columna con Sílica Gel-60 eluída con la mezcla de solventes seleccionada en la cromatografía de capa fina, para lo cual se hidrataron 5 g de sílica-gel. En la parte superior de la columna de sílica se depositaron 300 µL del pigmento concentrado y se agregó la mezcla de solventes seleccionados. Una fracción se recolectó cada 5 min (o cada vez que se observó la separación de una banda del pigmento a través de la columna). Las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro Cintra Mod. 10e (Cintra® 10e, Alemania) y se realizó un barrido en el espectro de luz visible (200-800 nm). Como blanco se usó la mezcla de solventes usada en la elución. Los puntos máximos de absorbancia y longitud de onda de cada fracción, así como la relación de éstos entre cada fracción fueron identificados. El color correspondiente de la relación absorbancia-longitud de onda del espectro de luz visible fue identificado.

Pruebas de control contra bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

Con el extracto crudo concentrado de *G. zeae* se realizaron pruebas de control *in vitro* de cepas bacterianas de interés clínico (*B. subtilis*, *S. typhi*, *Shigella* sp., *S. aureus* y *E. coli*) y la levadura *C. albicans*, proporcionadas por el Laboratorio de Farmacología de la UPIBI. El método de vaciado en placa se usó porque permite un crecimiento bacteriano homogéneo en el área interna de la caja petri (NOM-092-SSA1, 1994). El medio de cultivo de siembra base (agar nutritivo) fue preparado; se vaciaron 10 mL del medio por cada caja petri y se inocularon las cepas bacterianas (0.1 mL inóculo 100 mL⁻¹ de medio de cultivo). Después de solidificar el medio de cultivo base, se depositó el medio de siembra (agar nutritivo). Luego se impregnó un sensidisco de papel filtro de 6 mm de diámetro estéril con una solución (16 mg mL⁻¹) de extracto crudo del pigmento en el solvente (etanol 96°). Los sensidiscos se colocaron sobre la superficie del medio de siembra por duplicado por caja y de manera opuesta en la parte media de las cajas petri. Las pruebas se realizaron por duplicado para cada

was done with the solvent that had the best visibility and development, comparing pigment migration pattern with that of standard dyes (safranin, methyl red, neutral red, basic fuchsin and xylene orange). The concentration used as control for each chemical dye was 0.1 mg mL⁻¹. The retention factor (Rf) of each sample is reported and similarity of the pigment obtained was determined in function of the Rf. A silica gel chromatography column eluted with the mixture of solvents selected with thin layer chromatography was then performed, for which 5 g of silica-gel was hydrated. In the upper part of the silica column 300 µL of the concentrated pigment was deposited and the mixture of selected solvents was added. A fraction was collected every 5 min (or every time a band of pigment was observed to separate in the column). The fractions were read in a spectrophotometer Cintra Mod. 10e (Cintra® 10e, Germany), and a scan was done in the spectrum of visible light (200-800 nm). As blank, the mixture of solvents used in elution was used. Maximum absorbance points and wavelength of each of the fractions, as well as the relationship of these to each fraction, were identified. The corresponding color of the absorbance-wavelength relationship of the visible light spectrum was identified.

Control tests against pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi

With the crude concentrated extract of *G. zeae*, *in vitro* tests were conducted to assess control of bacterial strains of clinical interest (*B. subtilis*, *S. typhi*, *Shigella* sp., *S. aureus* and *E. coli*) and the yeast *C. albicans*, provided by the Pharmacology Laboratory of the UPIBI. The plate casting method was used because it allows homogeneous bacterial growth in an internal area of the Petri dish (NOM-092-SSA1, 1994). The base seeding medium (nutritive agar) was prepared; 10 mL were poured into each Petri dish and the bacterial strains were inoculated (0.1 mL inoculum 100 mL⁻¹ culture medium). After solidifying the base culture medium, the seeding medium (nutritive agar) was deposited. A sterile 6 mm diameter filter paper sensi-disc was then impregnated with a solution (16 mg mL⁻¹) of crude extract of the pigment in the solvent (96° ethanol). The sensi-discs were placed over the surface of the seeding medium opposite each other in the middle of the Petri dishes. Tests were conducted in duplicate for each bacterial strain. The inoculated dishes were incubated (37 °C for 5 d) and the diameter of the bacterial colonies was measured. The diameter of the inhibition halo was also measured to evaluate signs of inhibition or a decrease in speed of growth.

With the concentrated crude extract of *G. zeae*, *in vitro* control tests were conducted against three species of *Colletotrichum* (*C. fragariae* A. N. Brooks, *C. gloeosporoides* (Penz.) Penz. & Sacc.,

bacteria. Las cajas inoculadas se incubaron (37 °C por 5 d) y se midió el diámetro de las colonias bacterianas. También se midió el diámetro del halo de inhibición para evaluar signos de inhibición o disminución en la velocidad de crecimiento.

Con el extracto crudo concentrado de *G. zeae* también se realizaron pruebas de control *in vitro* contra tres especies de *Colletotrichum* (*C. fragariae* A. N. Brooks, *C. gloeosporoides* (Penz.) Penz. & Sacc., y *C. acutatum* J. H. Simmonds) aislados e identificados de frutos de chirimoya y zarzamora (Villanueva, 2004); estos son los principales hongos fitopatógenos en postcosecha de frutas y hortalizas. Los hongos congelados (-84 °C) en una solución de glicerol (20 %), se reactivaron en medio PDA y se incubaron (24±2 °C) 5 d con luz ambiental. Para estas pruebas se solubilizó 1.6 mg de extracto con 100 µL (16 mg mL⁻¹) de solvente (alcohol 96°) y se colocaron sobre sensidiscos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro colocado en la parte central de cajas petri con PDA. En sentidos opuestos, se colocó un disco de 5 mm de PDA con micelio del hongo fitopatógeno. La incubación se realizó a 25 °C por 10 d. Las pruebas se realizaron por triplicado y por cada especie. El diámetro de las colonias fue observado y medido. Halos de inhibición, velocidad de crecimiento (diámetro de la colonia), la muerte o inhibición del hongo, fueron evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y purificación de hongos

Alrededor de 50 hongos fueron aislados e identificar, de los cuales 35 se identificaron a nivel de género con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998). Algunos géneros de hongos (anamórficos) identificados fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Gloeosporium*, *Fusarium*, *Phoma* y *Rhizopus*; y una levadura (*Sporobolomyces*), entre otros. También, se identificaron algunos pseudohongos (*Phytophthora*), ascomicetes y basidiomicetes; los últimos de difícil identificación. Dentro de los organismos aislados e identificados, se observó una inhibición del crecimiento *Sporobolomyces* sp. y un basidiomicete no identificado (Figura 1A, B) y en otros, una producción de pigmento rojo-púrpura (*Phoma herbarum* Westend. y *Gibberella* sp.) (Figura 1C).

De los hongos identificados, con potencial para ser usados como agentes de control biológico, se descartó a *Sporobolomyces* sp. porque algunas de sus especies son patógenas al ser humano (Barnett y Hunter, 1998) y el basidiomiceto no creció en medio artificial.

and *C. acutatum* J. H. Simmonds) isolated and identified from cherimoya and blackberry fruits (Villanueva, 2004). These three species are the main phytopathogenic fungi that attack fruits and vegetables in postharvest. The fungi frozen (-84 °C) in a glycerol solution (20 %), were reactivated in PDA medium and incubated (24±2 °C) 5 d under environmental light. For these tests, 1.6 mg of extract were solubilized in 100 µL (16 mg mL⁻¹) of solvent (96° alcohol) and placed on sterile 6 mm diameter filter paper sensi-discs in the central part of the Petri dishes with PDA. On opposite sides, 5 mm discs of PDA with mycelia of the phytopathogenic fungus were placed. Incubation was done at 25 °C for 10 d. The tests were done in triplicate for each species. Diameter of the colonies was observed and measured. Inhibition halos and speed of growth (colony diameter), death or inhibition of the fungus were assessed.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and purification of fungi

Around 50 fungi were isolated and identified. Of these, 35 were identified at the genus level with Barnett and Hunter (1998) taxonomic keys. Some genera of fungi (anamorphic) identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Helminthosporium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Gloeosporium*, *Fusarium*, *Phoma* and *Rhizopus*; and a yeast (*Sporobolomyces*), among others. Moreover, pseudofungi (*Phytophthora*) were identified, ascomycetes and basidiomycetes; the latter are difficult to identify. Among the organisms isolated and identified, growth inhibition was observed in *Sporobolomyces* sp. and a non-identified basidiomycete (Figure 1A, B), and in others there was production of red-purple pigment (*Phoma herbarum* Westend. and *Gibberella* sp.) (Figure 1C).

Of the fungi identified with potential for use as biological control agents, *Sporobolomyces* sp. was ruled out because some of its species are human pathogens (Barnett and Hunter, 1998), and the basidiomycete did not grow in artificial medium. Thus, the saprophyte fungus (*Gibberella* sp.) collected from dead decomposing plant material, was selected. This fungus did not produce spores under environmental conditions (23±2 °C), but it did produce a red-purple or yellow-pink pigment that was more intense in solid medium than *P. herbarum* (Figure 2). To promote production of spores, the colonies were placed under black and UV light, as indicated by

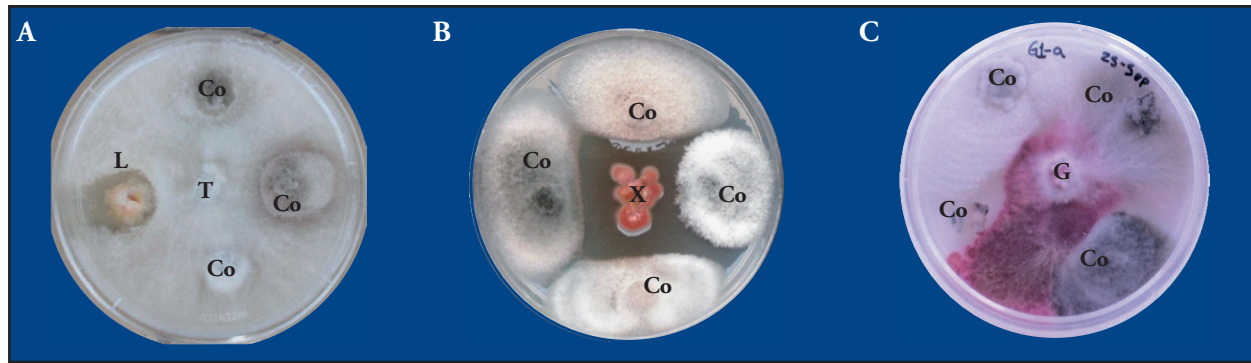


Figura 1. Hongos y levaduras inhibidores del crecimiento y productores de pigmentos u otros metabolitos. En el punto de inoculación central *Trichoderma* (T), hongo basidiomiceto desconocido (X) y *Gibberella zeae* (G), y en los extremos *Colletotrichum* spp. (Co) y *Sporobolomyces* (L).

Figure 1. Growth inhibiting fungi and yeasts that produce pigments or other metabolites. At central point of inoculation *Trichoderma* (T), unknown basidiomycete fungus (X) and *Gibberella zeae* (G), and on the outer edges *Colletotrichum* spp. (Co) and *Sporobolomyces* (L).

Así, se seleccionó un hongo saprófito (*Gibberella* sp.) recolectado de material vegetal muerto en descomposición, el cual no produjo esporas en condiciones ambientales (23 ± 2 °C), pero sí un pigmento rojo-púrpura o amarillo-rosáceo de mayor intensidad en medio sólido que *P. herbarum* (Figura 2). Para favorecer la producción de esporas, las colonias se pusieron bajo luz negra y UV, como lo indican Snyder y Hansen (1947), Zachariah *et al.* (1956) y von Arx (1981). La identificación reveló que era *Fusarium* sp. La producción del pigmento comenzó a los 5 d y se encontró principalmente en el micelio inmerso en el medio de cultivo (Figura 3). La producción de pigmentos rojo púrpura o carmín es típica en las especies de *Fusarium* de la sección Discolor, como *F. reticulatum* Mont. [W&R, G], *F. sambucinum* Fuckel [W&R, G, B, J], *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. [W&R, G, G, B, J], *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun, además de *F. graminearum* (Nelson *et al.*, 1983). En otras especies la coloración puede ser diferente como el *F. roseum* (Lk.) Emend, Snyder & Hansen, con colonias amarillas a rosadas (Watanabe, 2002).

Identificación del hongo productor de pigmentos

La caracterización molecular del hongo por secuenciación (Cuadro 1) de la región intergénica ITS1 del ADN ribosomal y su posterior alineamiento con las bases de datos del Banco de Genes del NCBI,

Snyder and Hansen (1947, Zachariah *et al.* (1956) and von Arx (1981). Identification revealed that it was *Fusarium* sp. Production of pigment began at 5 d and was found mainly in the mycelia immersed in the culture medium (Figure 3). Production of red-purple or carmine pigment is typical of Discolor section *Fusarium* species, such as *F. reticulatum* Mont.

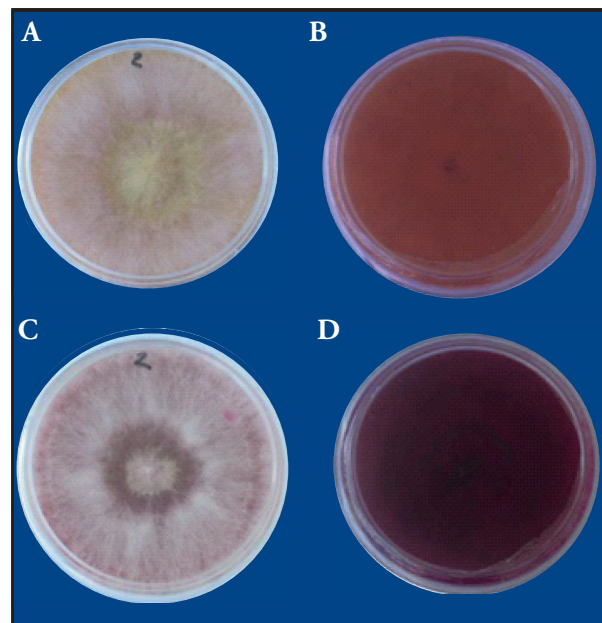


Figura 2. Colonias de *Gibberella zeae* en extracto de malta (A, B) y papa dextrosa agar (C, D), 10 d.

Figure 2. *Gibberella zeae* colonies in malt extract (A, B) and potato dextrose agar (C, D), 10 d.

reveló una similitud genética con *G. zeae* (teleomorfo), cuyo anamorfo es *F. graminearum*. Las características morfológicas de las colonias y esporas fueron similares con las descripciones de *F. graminearum* reportadas por Booth (1971) y Nelson *et al.* (1983). Las colonias en PDA fueron blancas de micelio raso (plano, corto) y denso al principio y de micelio largo (aéreo) algodónoso a mayor edad de la colonia, con márgenes blancos a rojo púrpura. Las macroconidias ($27.4 \times 2.4 \mu\text{m}$) fueron menores a las reportadas por Booth (1971).

Caracterización cultural del hongo y producción de pigmentos

En cultivos sólidos, las colonias variaron en función de la composición del medio (Cuadro 2). En algunos casos el micelio fue raso los primeros días de crecimiento, y aéreo al final; en otros, el micelio

[W&R, G], *F. sambucinum* Fuckel [W&R, G, B, J], *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. [W&R, G, G, B, J], *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun, besides *F. graminearum* (Nelson *et al.*, 1983). In other species coloration may be different, such as in *F. roseum* (Lk.) Emend, Snyder & Hansen, with yellow to pink colonies (Watanabe, 2002).

Identification of pigment-producing fungi

Molecular characterization of the fungus by sequencing (Table 1) of the ITS1 intergene region of ribosomal DNA and later alignment with the databases of the NCBI Gene Bank revealed genetic similarity to *G. zeae* (teleomorph), whose anamorph is *F. graminearum*. The morphological characteristics of the colonies and spores were similar to the descriptions of *F. graminearum* reported by Booth (1971) and Nelson *et al.* (1983). The colonies in

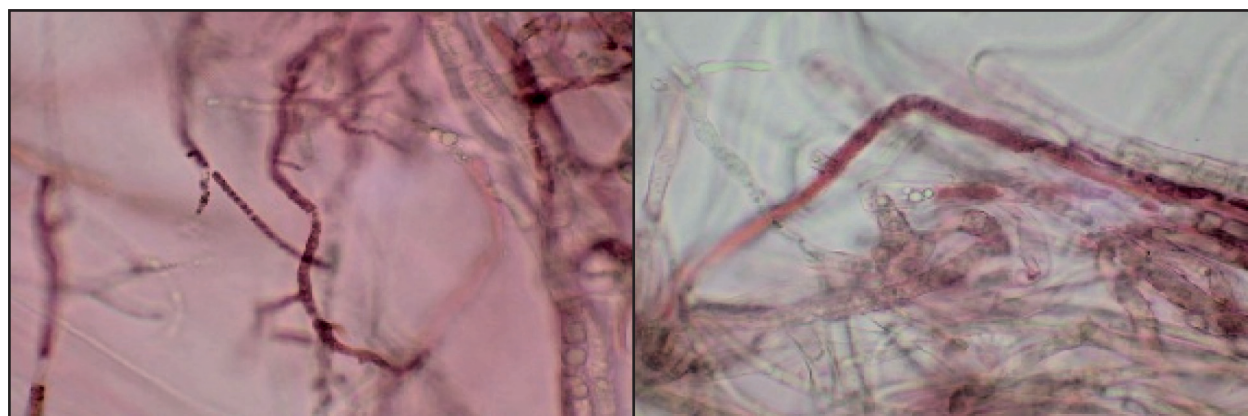


Figura 3. Micelio pigmentado de *Gibberella zeae*, 10 d (40x).
Figure 3. Pigmented *Gibberella zeae* mycelia, 10 d (40x).

Cuadro 1. Secuencia de pares de bases de la región ITS1 del ADNr de *Gibberella zeae*.

Table 1. Sequence of pairs of bases of the ITS1 region of *Gibberella zeae* rDNA.

```
CTTNATNCTTTTNTTCANCTGNTCCGAGGTACATTTCAGAAAGTTGGGGTTTANCGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGATG
TGTAATTAACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATGTATTTGGGGAGTGCAGCAGGACTGCAGCTCCCAACACCAAGCT
GGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATT
CACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT
TGATTTATTTGTTTTTATACTCAGAAAGTTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGTTCTCGCGCGGGCCGTCCTTTTACGGGNCGCG
GGCTGATCCGCCGAGGCAACATANGGTATGTTTCACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACT
CTTNNTNACTTTTCTTCANCTGATCCGAGGTCAACATTTCAGANGTTGGGGTTTANCGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAT
GTGTAATTAACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATGTATTTGGGGAGTGCAGCAGGACTGCAGCTCCCAACACCAAGC
TGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGAT
TCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTTATTTGTTTTTATACTCAGAAAGTTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGTTCTCGCGCGGGCCGTCCTTTTACNGGGCGCG
GGCTGATCCGCCGAGGCAACATANGGTATGTTTCACAGNGTTTNGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTG
```

Cuadro 2. Características morfológicas de *Gibberella zeae* a diferentes condiciones de temperatura, pH y medio de cultivo sólido.**Table 2. *Gibberella zeae* morphological characteristics under different conditions of temperature, pH and solid culture medium.**

Temperatura	pH	Medio de cultivo [†]	Tipo de crecimiento [‡]	Color de colonia [§]	Aparición del pigmento (d)
20 °C	6	PDA	RA	Am, Ro	6
		EMA	R	Ro, Ca	6
		CZA	R	Ca	7
	8	PDA	R	Ro	6
		EMA	R	Ro, Bl	9
		CZA	RA	Rs	8
28 °C	6	PDA	RA	Am	5
		EMA	RA	Ro, Bl	4
		CZA	R	Ca, Rs	4
	8	PDA	R	Ro	6
		EMA	R	Ro, Bl	9
		CZA	R	Rs	8

[†] PDA: papa dextrosa agar; EMA: extracto de malta agar; Cza, czapeck ♦ PDA: potato dextrose agar; EMA: malt extract agar; Cza, czapeck

[‡] R: raso; A: aéreo ♦ R: level; A: aerial.

[§] Am: amarillo; Ro: rojo; Ca: pardo; Bl: blanco; Rs: rosa ♦ Am: yellow; Ro: red; Ca: brown; Bl: white; Rs: pink.

fue de lento crecimiento y muy compacto. En medio PDA el color inicial de las colonias fue amarillo a rojo a los 5-6 d. En EMA, la intensidad de los rojos fue mayor. La intensidad del color aumentó con el tiempo de incubación al pasar de rojo a púrpura a los 10 d. El pigmento apareció a los 4 d en algunos tratamientos y a los 9 d en otros. El color de las colonias (amarillo-rojo-púrpura) de *F. graminearum* varía en función del pH (ácido-alkalino) al cambiar de amarillo a naranja, rojo, púrpura o incluso azul (Sansanya, 2008). El color amarillo de las colonias puede deberse a la producción de toxinas como en *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito (Barrero *et al.*, 1991). Además, niveles limitados de nitrógeno, fósforo y cobre en el medio pueden reducir el crecimiento y la producción de los pigmentos (Griffith *et al.*, 2007; Sansanya, 2008). Aunque la mayoría de los hongos crecen bien entre pH 6.8 y 8.3, el intervalo para *F. graminearum* es 6.7 a 7.2 (Booth, 1971).

En los cultivos líquidos, el desarrollo (producción de micelio) del hongo fue menor que en medios sólidos. En los cultivos líquidos, las colonias en CPD a 20 °C presentaron micelio abundante, compacto y blanquecino. Sólo a pH 6 se observó la presencia del pigmento rojo, en el micelio y sobre las paredes del tubo. En CEM, el micelio tuvo un color pardo rojizo

PDA were white with level (flat, short) mycelia, dense at the beginning, and at a later age of the colony, they were long (aerial) and cottony with white to red-purple edges. The macroconidia ($27.4 \times 2.4 \mu\text{m}$) were smaller than those reported by Booth (1971).

Cultural characterization of the fungus and pigment production

In solid cultures, the colonies varied in function of the medium composition (Table 2). In some cases, the mycelia were level with the medium during the first days of growth and aerial at the end. In others, mycelia was very compact and grew slowly. In PDA medium, the initial color of the colonies was yellow and red at 5-6 d. In EMA, intensity of the reds was greater. Color intensity increased with incubation time, passing from red to purple at 10 d. Pigment appeared at 4 d in some treatments and at 9 d in others. Color of *F. graminearum* colonies (yellow-red-purple) varied in function of pH (acid-alkaline), changing from yellow to orange, to red, to purple, or even blue (Sansanya, 2008). The yellow color of the colonies may be due to the production of toxins, such as in *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito (Barrero *et al.*, 1991). Moreover, limited levels of nitrogen,

y la biomasa fue como aglomerados. En CCza hubo poco crecimiento micelial, compacto y con pequeñas zonas de micelio blanquecino. A 28 °C y pH 6 en CPD, el micelio desarrolló un color rojo intenso y aglomerados blancos. La presencia del pigmento rojo tuvo mayor intensidad en CEM en las dos condiciones de pH. El micelio fue pardo rojizo y formó aglomerados grandes. En CCza se presentó la misma situación que a 20 °C; hubo poco crecimiento micelial, con aglomerados pequeños y poca o nula producción del pigmento.

El crecimiento y producción de biomasa fueron altamente significativos en medios sólidos y líquidos, para todos los factores estudiados (Cuadro 3). En los medios sólidos, el mayor crecimiento radial fue a 20 °C y pH 6 en PDA, mientras que la mayor producción de micelio (biomasa) fue en PDA y pH 6. La producción de biomasa en medios líquidos fue menor que en los sólidos y la mayor producción fue a 28 °C, pH 8 y en EMA (Cuadro 3).

Extracción, purificación e identificación del pigmento

La mayor extracción del pigmento se obtuvo con alcohol etílico (96°). En la cromatografía la mezcla metanol-hexano (8:2) se usó como solvente. El revelado mostró la presencia de al menos cuatro manchas cuyos valores R_f se compararon con pigmentos

phosphorus and copper in the medium can reduce growth and pigment production (Griffith *et al.*, 2007; Sansanya, 2008). Although most fungi grow well in pH 6.8 to 8.3, the range for *F. graminearum* is 6.7 to 7.2 (Booth, 1971).

In liquid cultures, fungus development (mycelium production) was less than in solid media. In liquid cultures, colonies in CPD at 20 °C had abundant, compact and whitish mycelia. Only at pH 6 was the presence of red pigment observed in the mycelia and on the tube walls. In CEM, the mycelia had a reddish brown color and the biomass appeared as clusters. In CCza, there was little mycelial growth, but it was compact with small areas of whitish mycelia. At 28 °C and pH 6 in CPD, the mycelia developed an intense red color with clusters of white. The presence of red pigment was observed to be more intense in CEM in the two conditions of pH. Mycelia were reddish brown and formed large clusters. In CCza the same situation appeared at 20 °C; there was little mycelial growth in small clusters and little or no pigment production.

Growth and biomass production were highly significant in both solid and liquid media for all of the factors studied (Table 3). In solid media, the greatest radial growth occurred at 20 °C and pH 6 in PDA, while the highest production of mycelia (biomass) was in PDA and pH 6. Biomass production in liquid

Cuadro 3. Efecto de la temperatura, pH y medio de cultivo en el crecimiento y la producción de biomasa para *Gibberella zeae*.

Table 3. Effect of temperature, pH and culture medium on *Gibberella zeae* growth and production of biomass.

Factor	Nivel	Crecimiento (mm)	Biomasa (g)	
			Medio sólido	Medio líquido
Temperatura	20 °C	50.33 a	0.087 a	0.059 b
	28 °C	35.00 b	0.096 a	0.091 a
pH	6	48.17 a	0.100 a	0.059 b
	8	37.67 b	0.083 b	0.091 a
Medio de cultivo	PDA [†]	55.25 a	0.118 a	0.031 c
	EMA [‡]	35.25 b	0.096 b	0.132 a
	Cza [§]	38.25 b	0.060 c	0.063 b

[†] Papa dextrosa agar ♦ Potato dextrose agar.

[‡] Extracto de malta agar ♦ Malt extract agar.

[§] Czapeck. Tratamientos con diferente letra son diferentes estadísticamente (contrastes ortogonales; $p \leq 0.05$) en una columna. La comparación es entre niveles de cada factor ♦ Czapeck. Treatments with different letter in a column are statistically different (orthogonal contrasts; $p \leq 0.05$). Comparison is between levels of each factor

conocidos (Cuadro 4) y mostraron que el extracto crudo de *F. graminearum* está en la gama de colores rojos. La cromatografía en columna (metanol-hexano 8:2) permitió recolectar siete extractos en 60 min con lecturas desde 200 hasta 340 nm del amarillo al rosa claro, similar a lo reportado por Burmeister *et al.* (1974). Las lecturas observadas podrían indicar que el pigmento extraído es una mezcla de varios pigmentos como en *F. solani* donde además de la fusarubina, se producen otros pigmentos relacionados a ésta (Ammar *et al.*, 1979). El pigmento de *F. graminearum*, denominado aurofusarina, se aisló y caracterizó por primera vez de *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (Ashley *et al.*, 1937) y después se mostraron sus propiedades antibióticas contra hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias (Medentsev *et al.*, 1993). Su color varía de amarillo a rojo o púrpura con el aumento del pH y se considera como una toxina por los efectos adversos que causa en la calidad de la carne y huevo de aves cuando los animales se alimentan con granos y cereales contaminados (Dvorska *et al.* 2001; Dvorska, 2002). El pigmento se deposita en las paredes celulares de tallos y espigas de cereales (Malz *et al.*, 2005). La aurofusarina reduce significativamente las concentraciones de las vitaminas A y E, la proporción de ácido docosahexaenóico en los fosfolípidos, éster de colesterol y las fracciones de ácidos grasos en yemas de huevo de la codorniz japonesa (Dvorska *et al.* 2001). Con base en lo anterior, es posible que el pigmento producido por *F. graminearum* (*G. zeae*) y obtenido en este estudio sea la aurofusarina y es indispensable purificar e identificar el pigmento.

Pruebas de control contra bacterias patógenas y hongos fitopatógenos

Después de 24 h sólo hubo inhibición del crecimiento en *S. typhi* y *S. aureus*; éste último mostró la mayor inhibición (Cuadro 5). El pigmento producido por *F. graminearum* tuvo una actividad antibacteriana en estas dos especies, pero no para las otras probadas, al menos en la concentración usada (16 mg mL⁻¹). Según Muriuki *et al.* (2008), 100 µL del pigmento purificado no afectaron el crecimiento de *Bacillus cereus* y *E. coli*, similar a lo reportado por Arnstein *et al.* (1946) para *E. coli* con el pigmento de *Fusarium javanicum* Koord. La actividad antimicrobiana de este pigmento podría asemejarse con la de el pigmento de *F. solani* ya que también controla a *S.*

Cuadro 4. Factores de retención (Rf) de pigmentos de *Gibberella zeae* contra colores estándar.

Table 4. Retention factors (Rf) of *Gibberella zeae* pigments compared to standard colors.

Sustancia	Rf
Mancha 1 pigmento	0.34
Mancha 2 pigmento	0.60
Mancha 3 pigmento	0.70
Mancha 4 pigmento	0.86
Safranina	0.09
Rojo de metilo	0.45
Rojo neutro	0.64
Fuchina básica	0.05
Naranja de xileno	0.68

Concentración de estándares 1mg mL⁻¹. Sistema metanol-hexano (8:2). Revelador: H₂SO₄ (10 %) ♦ Concentration of standards 1mg mL⁻¹. Methanol-hexane system (8:2). Developer: H₂SO₄ (10 %).

media was lower than in solid media, and the highest production was recorded at 28 °C, pH 8, and in EMA (Table 3).

Pigment extraction, purification and identification

The largest amount of pigment was extracted with ethylic alcohol (96°). In the chromatography, methanol-hexane (8:2) mixture was used as solvent. Development showed the presence of at least four stains whose Rf values were compared with known pigments (Table 4) showing that the crude extract of *F. graminearum* is in the range of red colors. The column chromatography (methanol-hexane, 8:2) allowed collection of seven extracts in 60 min with readings from 200 to 340 nm, from yellow to pale pink, similar to those reported by Burmeister *et al.* (1974). The readings could indicate that the extracted pigment is a mixture of several pigments, such as in *F. solani*, where, besides fusarubin, other related pigments are produced (Ammar *et al.*, 1979). Pigment from *F. graminearum*, denominated aurofusarin, was isolated and characterized for the first time from *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. (Ashley *et al.*, 1937), and later its antibiotic properties against filamentous fungi, yeasts and some bacteria were shown (Medentsev *et al.*, 1993). Its color varies from yellow to red or purple with increasing pH. It is considered a toxin because of the adverse effects it causes in poultry meat and egg

Cuadro 5. Halos de inhibición del crecimiento de bacterias patógenas por *Gibberella zeae*.**Table 5. *Gibberella zeae* inhibition halos of pathogenic bacterial growth.**

Microorganismo	Extracto [†]	Halo de inhibición (mm)
<i>Salmonella typhi</i>	EC	10
	EE	8
	ED	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	EC	17
	EE	14
	ED	18

[†] EC: extracto crudo; EE: extracto esterilizado; ED: extracto diluido ♦ EC: crude extract; EE: sterilized extract; ED: diluted extract.

aureus, *B. subtilis* y *E. coli* en concentraciones de 75 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Ammar *et al.*, 1979). Hubo inhibición de *B. subtilis* y *S. aureus* al usar 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del antibiótico producido por *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (Burmeister *et al.*, 1974), mientras que Baker *et al.* (1990) reportaron actividad antibiótica de extractos de *F. solani* y *Fusarium oxysporum* Schltdl. Fr. desde 0.25-16.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *S. aureus* pero no contra *E. coli* y *S. typhi*. Así, las concentraciones usadas para controlar estas bacterias son variables y dependen de la especie de *Fusarium*. La producción de pigmentos (naftoquinonas) es común en los hongos filamentosos (Medentsev y Akimenko, 1998), entre ellos *Fusarium*, los cuales también pueden tener una actividad antimicrobiana contra hongos y levaduras (Medentsev *et al.*, 1993, 2005).

En los hongos no se observó inhibición en el crecimiento de *Colletotrichum* spp., lo cual indica que, al menos a la concentración empleada, el extracto no presentó actividad antifúngica. Arnstein *et al.* (1946) y Lacey (1950) reportaron nula o poca actividad antifúngica de los pigmentos producidos por *Fusarium* spp., y actividad relativamente baja contra algunas levaduras y hongos filamentosos: *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium* spp., *Trichoderma viride* Pers. : Fr., *Mucor rouxii*, *Aspergillus* spp. (Ammar *et al.*, 1979; Muriuki *et al.*, 2008), y *Phytophthora parasitica* Breda de Haan (Baker *et al.*, 1990). El pigmento producido por *Monascus purpureus* Went tiene actividad antifúngica contra *T. viride*, *F. oxysporum*, *Fusarium roseum* Link : Fr., *Mucor pusillus* (Lindt) Schipper, *Aspergillus ochraceus* K. Wilh., *Aspergillus usami* y *Penicillium roqueforti* Thom (Ferdes *et al.*, 2009, Ungureanu y Ferdes, 2010).

quality when animals are fed contaminated grain, and cereals (Dvorska *et al.* 2001; Dvorska, 2002). The pigment is deposited on the cell walls of stems and spikes of cereals (Malz *et al.*, 2005). Aurofusarin significantly reduces concentrations of vitamins A and E, the proportion of docosahexaenoic acid in phospholipids, cholesterol ester and the fractions of fatty acids in egg yolks of Japanese quail (Dvorska *et al.* 2001). Based on the above, it is possible that the pigment produced by *F. graminearum* (*G. zeae*) obtained in the present study is aurofusarin, and it is essential to purify and identify the pigment.

Control tests against pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi

After 24 h, inhibition of growth was observed only in *S. typhi* and *S. aureus*; the latter showed the highest inhibition (Table 5). The pigment produced by *F. graminearum* had antibacterial activity only against these two species of the species tested, at least at the concentration used (16 mg mL^{-1}). According to Muriuki *et al.* (2008), 100 μL of the purified pigment did not affect growth of *Bacillus cereus* or *E. coli*, similar to that reported by Arnstein *et al.* (1946), who used *Fusarium javanicum* Koord. pigment against *E. coli*. The antimicrobial activity of this pigment could be similar to that of the pigment from *F. solani*, which also controls *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli* at concentrations of 75 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Ammar *et al.*, 1979). There was an inhibition effect of *B. subtilis* and *S. aureus* using 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the antibiotic produced by *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (Burmeister *et al.*, 1974), while Baker *et al.* (1990) reported antibiotic activity of *F. solani* and *Fusarium oxysporum* Schltdl. Fr. extracts at 0.25 to 16.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *S. aureus*, but not against *E. coli* or *S. typhi*. Thus, the concentrations used to control these bacteria are variable, depending on the species of *Fusarium*. The production of pigments (naphthoquinones) is common in filamentous fungi (Medentsev and Akimenko, 1998), among these *Fusarium*, and they may also have an antimicrobial activity against fungi and yeasts (Medentsev *et al.*, 1993, 2005).

In fungi, no inhibition was observed on growth of *Colletotrichum* spp.; this indicates that, at least at the concentration used, the extract did not have antifungal activity. Arnstein *et al.* (1946) and Lacey (1950) reported little or no antifungal activity of the

CONCLUSIONES

Una concentración de 16 mg μL^{-1} de extracto crudo del pigmento producido por *G. zeae* (*F. graminearum*), inhibió el crecimiento de *S. typhi* y *S. aureus*, pero no de *B. subtilis*, *Shigella* sp., *E. coli*, *C. albicans*, *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Subdirección de Investigación y Postgrado (proyectos 20080167, 20090337, 20100643) y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico otorgado.

LITERATURA CITADA

- Ammar, M. S., N. N. Gerber, and L. E. McDaniel. 1979. New antibiotic pigments related to Fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. I. Fermentation, isolation, and antimicrobial activities. *J. Antibiotics* 32: 679-684.
- Arnstein, H. R. V., A. H. Cook, and M. S. Lacey. 1946. An antibacterial pigment from *Fusarium javanicum*. *Nature* 157: 333-334.
- Ashley, J. N., B. C., Hobbs, and H. Raistrick. 1937. Studies in the biochemistry of microorganisms LIII. The crystalline colouring matters of *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. and related forms. *Biochem. J.* 31: 385-397.
- Baker, R. A., J. H. Tatum, and S. Nemec. 1990. Antimicrobial activity of naphthoquinones from Fusaria. *Mycopathology* 111: 9-15.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Barrero A. F., J. F. Sánchez, J. E. Oltra, N. Tamayo, E. Cerdá-Olmedo, R. Candau, and J. Avalos. 1991. Fusarin C and 8Z-fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 30: 2259-2263.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Brizuela M., A., L. García, L. Pérez, y M. Mansur. 1998. Basiidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 69-74.
- Burmeister, H. R., G. A. Bennett, R. F. Vesonder, and C. W. Hesseltine. 1974. Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. *Antimicrob. Agents Chemother.* 634-639.
- Cantoral-Fernández, J. M. 2000. Microbiología industrial y micopatología. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S29-S30.
- Carlile M. J., S. C. Watkinson, and G. W. Goody. 2001. The Fungi. Academic Press. San Diego, CA. USA. 586 p.
- Dvorska, J. E., P. F. Surai, B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2001. Effect of the mycotoxin aurofusarin on the fatty acid profile and antioxidant composition of quail eggs. *Br. Poult. Sci.* 42: 664-670.
- Dvorska, J. 2002. Aurofusarin, a newly described *Fusarium graminearum* mycotoxin: oxidative stress and protective effect of MycosorbTM. <http://en.engormix.com/MA-poultry->

industry/nutrition/articles/aurofusarin-newly-described-fusarium-t109/p0.htm (Consulta: mayo 2012).

Ferdes, M., C. Ungureanu, N. Radu, and A. A. Chirvase. 2009. Antimicrobial effect of *Monascus purpureus* red rice against some bacterial and fungal strains. *Chem. Eng. Trans.* 17: 1089-1094.

González-Ruiz, A., A. Méndez, R. Rodríguez-Herrera, y C. N. Aguilar. 2009. Pigmentos microbianos: ¿aditivos o nutraceuticos?. *Cienciencia* 5 (19).

Griffith, G. W., G. L. Easton, A. Detheridge, K. Roderick, A. Edwards, H. J. Worgan, J. Nicholson, and W. T. Perkins. 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 165-171.

Gutiérrez, S., R. E. Cardoza, J. Casqueiro, and J. F. Martín. 2004. Commercial production and biosynthesis of fungal antibiotics: An overview. In: Arora, D. K. (ed). *Handbook of Fungal Biotechnology*. pp: 401-411.

Koryk, A. N., V. A. Trufanova, and V. A. Breslavets. 1990. A syndrome of changing egg quality. *Nauchno-technicheskij Bull. Uk. Poultry Res. Institute, Kharkov* 29: 41-42.

Lacey, M. S. 1950. The antibiotic properties of fifty-two strains of *Fusarium*. *J. Microbiol.* 4: 122-131.

Malz, S., M. N. Grell, C. Thrane, F. J. Maier, P. Rosager, A. Felk, K. S. Albertsen, S. Salomon, L. Bohn, W. Schafer, and H. Giese. 2005. Identification of gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 42: 420-433.

CONCLUSIONS

A concentration of 16 mg mL^{-1} crude extract of the pigment produced by *G. zeae* (*F. graminearum*), inhibited of growth of *S. typhi* and *S. aureus* but not of *B. subtilis*, *Shigella* sp., *E. coli*, *C. albicans*, *C. acutatum*, *C. fragariae* or *C. gloeosporioides*.

—End of the English version—

-----*

- Medentsev, A. G., and V. K. Akimenko. 1998. Naphthoquinone metabolites in the fungi. *Phytochemistry* 47: 935-959.
- Medentsev, A. G., A. N. Kotik, V. A. Trufanova, and V. K. Akimenko. 1993. Identification of aroclorin in *Fusarium graminearum* isolates, causing a syndrome of egg quality in chickens. *Prikl Biokhim. Mikrobiol.* 29: 542-546.
- Medentsev, A. G., A. Y. Arinbasarova, and V. K. Akimenko. 2005. Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. *App. Biochem. Microbiol.* 41: 573-577.
- Muriuki, E., C. Hall, J. J. Sasanya, and A. Boddada. 2008. Purification, analysis and antimicrobial activity of *Fusarium graminearum* pigment. 60th SERMACS. Nov 12-15. Nashville, TN. <http://acs.confex.com/acs/serm08/techprogram/P64014.HTM> (Consulta: enero 2012).
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* Species An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. USA. 193 p.
- NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaría de Salud. México. 7 p.
- Sansanya, J. J. 2008. *Fusarium* pigments. In: Sansanya, J. J. (ed). Quantification and Characterization of Micotoxins, Masked Micotoxins, and *Fusarium graminearum* Pigments. ProQuest LLC. An Arbor, MI. USA. pp: 15-40.
- SAS (Statistical Analysis System). 1988. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 1028 p.
- Snyder, W. C., and H. N. Hansen. 1947. Advantages of natural media and environments in the culture of fungi. *Phytopathology* 37: 420-421.
- Stamets, P. 2002. Novel antimicrobials from mushrooms. *HerbalGram* 54: 1-6.
- Trigos A., G. Mendoza, M. Luna, G. Heredia, y R. M. Arias. 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Rev. Mex. Micol.* 20: 89-92.
- Ungureanu, C., and M. Ferdes. 2010. Antibacterial and antifungal activity of red rice obtained from *Monascus purpureus*. *Chem. Eng. Trans.* 20: 223-228.
- Villanueva-Arce, R. 2004. Caracterización morfológica y molecular de *Colleotrichum* spp. e histopatología de la antracnosis causada por *C. fragariae* en frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 98 p.
- von Arx, J. A. 1981. The Genera of Fungi Sporulation in Pure Culture. J. Cramer. Germany. 424 p.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. CRC Press. Boca Raton, Fla., USA. 485 p.
- Zachariah, A. T., H. N. Hansen, and W. C. Snyder. 1956. The influence of environmental factors on cultural characters of *Fusarium* species. *Mycologia* 48: 459-67.