



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez”  
División de Estudios de Posgrado



TESIS:

**Actividad antibacteriana del medio extracelular de cultivos  
líquidos de la cepa fúngica del ascomycete *Paraconiothyrium* sp.**

que para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud

PRESENTA:

**Q.F.B. Edgar Manuel Villa Villa**

DIRECTOR DE TESIS:

**D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo**

Morelia, Michoacán. Diciembre, 2021.

**COMITÉ TUTORAL:**

**D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas**

**D. en C. Virginia Robinsón Fuentes**

**D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza**

**D. en C. Rafael Salgado Garciglia**

**El presente trabajo se realizó en:**

**El Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana  
del Centro de Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología  
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
y en**

**El Laboratorio de Genética Molecular Microbiana  
de la División de Estudios de Posgrado  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

**Se agradece la Beca del CONACyT Núm:732554  
para la realización de estudios de posgrado.**

## TABLA DE CONTENIDO:

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Aspecto general sobre los antibióticos .....  | 1         |
| 1.2 Resistencia a los antibióticos.....   | 2         |
| 1.2.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos .....                                | 3         |
| 1.2.2 Enfermedades causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos.....         | 4         |
| 1.3 Fuentes biológicas para la obtención de nuevos antibióticos.....                    | 5         |
| 1.3.1 Aspectos generales de la clasificación de reino Fungi .....                       | 6         |
| 1.4. Metabolismo secundario en hongos .....   | 7         |
| 1.5 Inducción del metabolismo secundario en hongos .....                                | 9         |
| 1.6 Producción de metabolitos secundarios en el género <i>Paraconiothyrium</i> .....    | 12        |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3. HIPÓTESIS .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>  | <b>16</b> |
| 4.1 Objetivo general .....  | 16        |
| 4.2 Objetivos específicos.....  | 17        |
| <b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>   | <b>19</b> |
| 6.1 Cepa de estudio .....   | 19        |
| 6.2 Cepas bacterianas de prueba .....   | 19        |
| 6.3 Medios de cultivo y obtención de inóculos .....                                     | 19        |
| 6.4 Cultivos en medio líquido .....   | 19        |
| 6.5 Cultivos en medio líquido inducidos con biomasa bacteriana inerte .....             | 21        |
| 6.6 Cinética de crecimiento.....  | 21        |
| 6.7 Obtención del medio de crecimiento de la cepa CMU-196 .....                         | 21        |
| 6.8 Determinación de la actividad antibacteriana por antibiograma .....                 | 21        |
| 6.9 Determinación de la actividad antibacteriana en microplacas de 96 pozos .....       | 22        |
| 6.10 Detección de metabolitos por cromatografía en capa fina (TLC).....                 | 22        |
| 6.11 Recuperación de los compuestos separados por cromatografía en capa fina (TLC)..... | 23        |
| 6.11 Análisis estadístico de resultados .....   | 23        |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>   | <b>24</b> |
| 7.1 Cinéticas de crecimiento .....  | 24        |
| 7.2. Separación de metabolitos mediante cromatografía en capa fina .....                | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>8. Determinación de la actividad antibacteriana de los concentrados extracelulares por antibiograma.....</b>                                     | <b>28</b> |
| <b>9. Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de 96 pozos .....</b>   | <b>30</b> |
| 9.1. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de 96 pozos a partir de las bandas recuperadas de la cromatografía en capa fina ..... | 40        |
| <b>9. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>10. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>11. CONCLUSIÓN.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>56</b> |

## INDICE DE FIGURAS

| Num. | Nombre   | Pag. |
|------|--|------|
| 1    | Estructuras de fitoalexinas.   | 5    |
| 2    | Grupos de genes y enzimas para el metabolismo secundario de hongos.  | 8    |
| 3    | Cromatogramas de HPLC de extractos de cultivo de <i>Chaetomium</i> sp. con células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inactivadas por autoclave.                         | 11   |
| 4    | Metabolitos producidos por <i>Penicillium</i> sp. estimulado por lipopolisacárido bacteriano.  | 12   |
| 5    | Cinéticas de crecimiento de la cepa CMU-196 de <i>Paraconiothyrium</i> sp.   | 24   |
| 6    | Inóculos de la cepa CMU-196 en caldo extracto de malta y caldo peptona.  | 25   |
| 7    | Masa liofilizada de 150 mL de los cultivos basales e inducidos de la cepa CMU-196.   | 26   |
| 8    | Cromatografía en capa fina de los medios de cultivo de la cepa CMU-196 en fase estacionaria revelada por luz UV a 302 nm y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% (v/v). | 27   |
| 9    | Cromatografía en capa fina de los medios de cultivo de la cepa CMU-196 en fase estacionaria revelada por luz UV a 254 nm, 302 nm y 365 nm.                             | 28   |
| 10   | Ensayos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por la técnica de antibiograma.  | 29   |
| 11   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina por la técnica de placa de 96 pozos.                                      | 30   |
| 12   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC por la técnica de placa de 96 pozos.   | 31   |
| 13   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium ATCC14028 (ST19).  | 32   |
| 14   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium SAL004 (ST19).   | 33   |
| 15   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium SAL115 (ST19).   | 34   |
| 16   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC-ST).  | 35   |
| 17   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ATCC EIEC).  | 36   |
| 18   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).   | 37   |
| 19   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).   | 38   |
| 20   | Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC-LT-ST).   | 39   |
|      |  |      |

| <b>Num.</b> | <b>Nombre</b>  | <b>Pag.</b> |
|-------------|--|-------------|
| 21          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina.      | 41          |
| 22          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina                          | 42          |
| 23          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium ATCC 14028 (ST19) en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina. | 43,44       |
| 24          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium SL004 en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina.             | 45          |
| 25          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium SL113 (ST213) en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina.     | 46          |
| 26          | Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Escherichia coli</i> uropatógena en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina.                       | 47          |

## INDICE DE TABLAS

| <b>Num.</b> | <b>Nombre</b>   | <b>Pag.</b> |
|-------------|---|-------------|
| 1           | Antibióticos producidos por distintos microorganismos | 6           |
| 2           | Cepas bacterias de prueba y sus características       | 20          |

## RESUMEN

**Introducción:** La resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado la mortalidad de pacientes, al disminuir la efectividad de los tratamientos. Entre los organismos que pueden producir metabolitos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas están las especies del reino Fungi. Las estrategias empleadas para inducir la producción de metabolitos secundarios en hongos incluyen el cambio de fuentes de C y N del medio de cultivo, el co-cultivo y el reto con biomasa microbiana inerte. El género *Paraconiothyrium*, tiene gran potencial para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana. **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana del concentrado extracelular de cultivos basales e inducidos de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. contra bacterias multirresistentes a antibióticos. **Metodología:** Se construyó la cinética de crecimiento de la cepa CMU-196 determinando el peso seco del micelio en cultivos líquidos de caldo extracto de malta (CEM) y caldo peptona (CP) basales (CEM-B, CP-B) e inducidos (CEM-IN, CP-IN) con biomasa bacteriana (*Salmonella enterica*) inerte. Se recuperó y liofilizó el medio de extracelular, determinándose el rendimiento (masa) obtenido, se analizó la actividad antibacteriana del liofilizado y de bandas observadas mediante cromatografía de capa fina, hacia cepas de *S. enterica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** La fase estacionaria de la cepa CMU-196 inició al séptimo día de incubación, con mayor producción de biomasa en el medio CEM (0.96 mg). Cultivada en medio CP, la cepa CMU-196 presentó micelio laxo y pigmentado, lo que sugiere una mayor producción de metabolitos secundarios extracelulares. Los rendimientos obtenidos de los liofilizados fueron CP-IN (285.6 mg) > CP-B (258.9 mg) > CEM-IN (187 mg) > CEM-B (134.3 mg). La cromatografía en capa fina mostró una mayor producción de metabolitos extracelulares en medio CP que en CEM y al menos un metabolito extra en CP-IN. Algunas de las bandas extraídas de las separaciones de metabolitos mediante TLC presentan actividad antibiótica significativa.

**Palabras clave:** *Paraconiothyrium*, ascomycota, diversidad, metabolitos secundarios, resistencia bacteriana, antibióticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bacterial resistance to antibiotics has increased patient mortality by reducing the effectiveness of treatments. Among the organisms that can produce metabolites that inhibit the growth of pathogenic bacteria are the species of the kingdom Fungi. The strategies used to induce the production of secondary metabolites in fungi include changing the sources of C and N in the culture medium, co-cultivation and challenge with inert microbial biomass. The genus *Paraconiothyrium* has great potential for the production of compounds with antimicrobial activity.

**Objective:** To evaluate the antibacterial activity of the extracellular concentrate of basal and induced cultures of the *Paraconiothyrium* sp. Strain CMU-196. against antibiotic multi-resistant bacteria.

**Methodology:** The growth kinetics of the CMU-196 strain was constructed by determining the dry weight of the mycelium in liquid cultures of basal (CEM-B, CP-B) and induced (CEM-B, CP-B) and induced malt extract broth (CEM) and peptone broth (CP). CEM-IN, CP-IN) with inert bacterial biomass (*Salmonella enterica*). The extracellular medium was recovered and lyophilized, determining the yield (mass) obtained, the antibacterial activity of the lyophilisate and the bands observed by thin layer chromatography were analyzed against strains of *S. enterica*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

**Results:** The stationary phase of the CMU-196 strain began on the seventh day of incubation, with higher biomass production in the CEM medium (0.96 mg). Cultured in CP medium, the CMU-196 strain presented loose and pigmented mycelium, which suggests a higher production of extracellular secondary metabolites. The yields obtained from the lyophilisates were CP-IN (285.6 mg) > CP-B (258.9 mg) > CEM-IN (187 mg) > CEM-B (134.3 mg). Thin layer chromatography showed a higher production of extracellular metabolites in CP medium than in CEM and at least one extra metabolite in CP-IN. Some of the bands extracted from the TLC metabolite separations show significant antibiotic activity.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Aspecto general sobre los antibióticos

Los antibióticos han jugado un papel relevante en la reducción de la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas. Su introducción en la práctica clínica en la década de los años cuarenta del siglo XX supuso una de las intervenciones más importantes, aumentando en varios años la esperanza de vida de la población (Alós, 2015). Los antibióticos han sido considerados tradicionalmente como los compuestos producidos de forma natural por microorganismos o derivados semisintéticos de los mismos, con actividad inhibitoria o bactericida específica frente a las bacterias (Wohlleben *et al.*, 2016). Existen autores que consideran que también las moléculas orgánicas sintéticas que inhiben el crecimiento o matan a las bacterias mediante mecanismos específicos, como las sulfonamidas o las fluoroquinolonas, deben de considerarse antibióticos (Davies y Davies, 2010).

Los antibióticos son medicamentos diseñados para combatir una infección causada por bacterias, interrumpiendo o inhibiendo la reproducción de las mismas. A lo largo de la historia ha aparecido una gran variedad de este tipo de moléculas, con mecanismos de acción diferentes. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de proteínas es el mecanismo mediante el cual ejercen su acción antibióticos como los aminoglucósidos. Estos antibióticos se unen a la subunidad ribosomal 30S impidiendo la síntesis proteica, provocando la muerte del microorganismo (Calvo y Martínez, 2009). Los macrólidos, liconsamidas y estreptograminas son grupos de antibióticos que también actúan impidiendo la síntesis proteica, pero en este caso su mecanismo de acción consiste en unirse de forma reversible a la subunidad 50S de ribosomal en el dominio V de la peptidiltransferasa, impidiendo la elongación proteica (Calvo y Martínez, 2009).

Los antibióticos con mayor uso en la clínica actualmente son los  $\beta$ -lactámicos, los cuales tienen como blanco la pared bacteriana, inhibiendo las enzimas conocidas como

proteínas fijadoras de penicilinas, o PBPs por sus siglas en inglés (Suárez y Gudiol, 2009). Al bloquear a estas enzimas se afecta la elongación y polimerización de los polisacáridos de la pared celular, aunque también pueden afectar la forma y la división celular de las bacterias. Existen diferentes subgrupos de estos antibióticos, encontrándose entre los más importantes las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos (Calvo y Martínez, 2009). Los componentes encargados de la replicación y transcripción del ADN también son blancos terapéuticos para algunos antibióticos, como es el caso de las quinolonas que afectan a las topoisomerasas II (ADN-girasa) y IV, al interactuar con los pequeños cortes que estas proteínas realizan en el ADN, formando de forma irreversible un complejo quinolona-ADN-topoisomerasa impidiendo que los procesos de transcripción o replicación continúen (Alós, 2009). La inhibición de la síntesis de folatos también es un mecanismo de acción antibacteriana, mediante el cual actúan las sulfonamidas, compitiendo por la enzima dihidropteroato sintetasa, como análogos del ácido para-aminobenzoico, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico (Calvo y Martínez, 2009).

## **1.2 Resistencia a los antibióticos**

Uno de los problemas actuales más graves de salud pública a nivel global, es sin duda el gran incremento que existe en la resistencia bacteriana a los antibióticos, ya que dichos compuestos permiten el control de las enfermedades infecciosas tanto en medicina humana como veterinaria, una vez establecida la infección. Una recopilación de evidencia hospitalaria realizada en 2014, indicó que aproximadamente 700,000 muertes en todo el mundo eran atribuibles a infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos, mostrando que, de no tomarse ninguna medida preventiva, dicho número podía alcanzar los 10 millones para el año 2050 (Allcock *et al.*, 2017). La resistencia bacteriana se ha definido como la capacidad de las bacterias para crecer en presencia de un antibiótico a una concentración que normalmente los mataría o limitaría su crecimiento (Allcock *et al.*, 2017).

### **1.2.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos**

Se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden generar resistencia a los antibióticos. En general, los mecanismos de resistencia a antibióticos de las bacterias pueden agruparse en tres grandes categorías (Vignoli, 2000):

1. Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como la acetilación, la adenilación o la fosforilación
2. Modificaciones en el sitio blanco: existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo, entre las que se incluyen modificaciones en el gen que codifica al blanco del antibiótico, así como la adquisición de genes que codifican para sustitutos de los blancos originales.
3. Alteraciones de la permeabilidad: las modificaciones de las membranas bacterianas se presentan principalmente en bacterias Gram negativas, en las que la membrana externa es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan restringidas a la penetración a través de proteínas transmembranales con función de porinas. Además, se puede incrementar la expulsión de antibióticos por bombas de eflujo, de manera inespecífica. En bacterias Gram negativas estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. En bacterias Gram positivas se presenta una proteína transmembrana con función de ATPasa que actúa como bomba de eflujo.

Las bacterias pueden resistir la acción de un antibiótico al reducir la permeabilidad de la membrana (Hooper, 2001). Así, la disminución en el número de porinas en la membrana externa conduce a una disminución de la entrada de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en la célula. También existen proteínas integrales de membrana plasmática denominadas bombas de eflujo que expulsan a los antibióticos al exterior de la célula, las cuales mantienen bajas concentraciones intracelulares de antibióticos (Levy, 2002). La mayoría de las bombas de eflujo son transportadores de múltiples fármacos que son capaces de expulsar desde el citoplasma hacia el exterior celular una amplia gama de antibióticos. Otro

mecanismo común de resistencia a los antimicrobianos es la modificación del sitio de unión del fármaco. En este caso, las bacterias que desarrollan resistencia a los aminoglucósidos modifican la subunidad 30S ribosomal evitando que el antibiótico pueda ejercer su acción (Liou *et al.*, 2006). En el caso de los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, la subunidad ribosomal modificada es la 50S (Roberts, 2004).

La mutación en una proteína PBP es un mecanismo de resistencia muy común en las bacterias Gram positivas, como estrategia para sobrevivir a los  $\beta$ -lactámicos. Aunque también pueden presentar un cambio en el dipéptido D-alanil-D-alanina, precursor para la síntesis de la pared bacteriana, que cambia por D-alanil-lactato para bloquear la acción de los  $\beta$ -lactámicos. La producción de enzimas con la capacidad de hidrolizar antibióticos es uno de los mecanismos más comunes en bacterias Gram negativas (Shaikh *et al.*, 2015). En particular, la producción de diferentes tipos de  $\beta$ -lactamasas permite generar resistencia de las bacterias hacia los antibióticos tipo  $\beta$ -lactámicos.

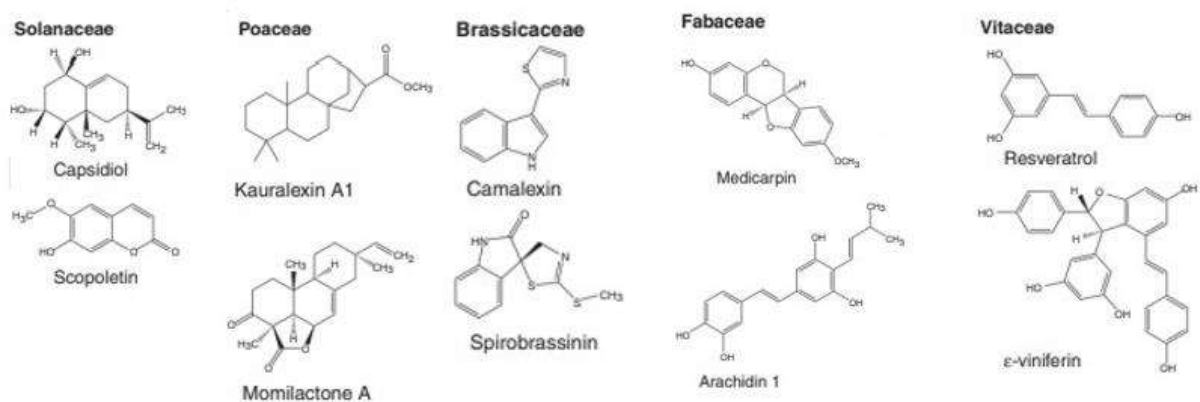
### **1.2.2 Enfermedades causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos**

En la actualidad las enfermedades causadas por bacterias resistentes a antibióticos representan un grave problema de salud pública. Por ejemplo, las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, causa enfermedades nosocomiales como osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia (Galar *et al.*, 2019). Otro patógeno Gram positivo de relevancia clínica por su resistencia a vancomicina es *Enterococcus* sp., una bacteria que causa infecciones urinarias, endocarditis, bacteriemia así como infección en heridas intra-abdominales (Hammerum *et al.*, 2019). Estos dos microorganismos son de gran relevancia epidemiológica, por lo que se encuentran en la lista de prioridades para el desarrollo de nuevos antibióticos que sean capaces de atacarlos (OMS, 2017). Entre las bacterias Gram negativas de importancia clínica están *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, siendo la primera especie responsable de la mayoría de las infecciones gastrointestinales, además de causar infecciones urinarias, próstata y de torrente sanguíneo. En el caso *S. Typhimurium*, el patógeno causante de salmonelosis, una de las enfermedades gastrointestinales más común en niños menores de cinco años (Manges *et al.*, 2019). Se estima que *S. enterica* serotipo Typhimurium es

responsable de 180 millones de infecciones gastrointestinales por año, solo por debajo de *E. coli*, la cual es responsable de 241 millones de infecciones (Besser, 2018).

### 1.3 Fuentes biológicas para la obtención de nuevos antibióticos

Una gran parte de los antibióticos han sido aislados de fuentes naturales, particularmente de las plantas, a las cuales se les ha estudiado la capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana como las fitoalexinas (Ahuja *et al.*, 2012). Estos metabolitos son producidos por varias familias de plantas como Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Vitaceae y Poaceae (Fig. 1). Por ejemplo, la escopoletina que es una cumarina producida por plantas de la familia Solanaceae, tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas (Gnonlonfin *et al.*, 2012). Una de las principales fuentes biológicas de antibióticos son los microorganismos, grupo en el que destaca la participación de las bacterias, actinobacterias y hongos. Estos microorganismos aportaron 70 de los 90 antibióticos del mercado en los años 1982-2002, los cuales se obtuvieron a partir de diferentes especies de los grupos de microorganismos antes mencionados (Peláez, 2006), y cuyos ejemplos se muestran en la Tabla 1.



**Figura 1.** Estructuras de fitoalexinas producidas por miembros de Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Vitaceae y Poaceae (Ahuja *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Antibióticos producidos por distintos microorganismos (Peláez, 2006).

| Microorganismo                                     | Metabolito       | Nombre comercial                                     |
|--|------------------|--|
| <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.   | Penicilina       | Penicilina G, V, ampicilina, meticilina, Amoxicilina |
| <i>Acremonium</i> spp., <i>Emericellopsis</i> spp. | Cefalosporinas   | MEFOXIN, CECLOR                                      |
| <i>Fusidium griseum</i>                            | Ácido fusídico   | FUCIDIN LEO  |
| <i>Streptomyces griseus</i>                        | Estreptograminas | Dalfopristina / quinupristina                        |
| <i>Streptomyces orientalis</i>                     | Vancomicina      | VANCOCINA  |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                     | Mupirocina       | BACTROBAN  |

### 1.3.1 Aspectos generales de la clasificación de reino Fungi

El reino Fungi es un grupo taxonómicamente diverso, en el que se considera que existen al menos 5 millones de especies (Casadevall, 2019). Las especies dentro de este reino presentan diversos estilos de vida, incluyendo parasitismo, saprofitismo y mutualismo con especies de otros grupos biológicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Grossart *et al.*, 2019). Los hongos también presentan variedad morfológica macroscópica y microscópica, además de variaciones en los procesos de diferenciación celular en su ciclo de vida (Stadler, 2001). Dentro de la clasificación del reino de los hongos destacan dos *phyla* por ser los hongos más estudiados, y en los que se ha descrito la mayoría de las especies, los cuales son Ascomycota y Basidiomycota. Ambos grupos forman el subreino Dikarya, que se caracteriza por formar micelios dicarióticos. El subreino Dikarya representa el 98% de los hongos descritos (Stajich *et al.*, 2009).

El phylum Basidiomycota representa el 34% de los hongos descritos y comprende tres grupos que son Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina y Agaricomycotina. En los tres grupos, la forma de crecimiento puede ser una levadura, una hifa o dimórfica (Stajich *et al.*,

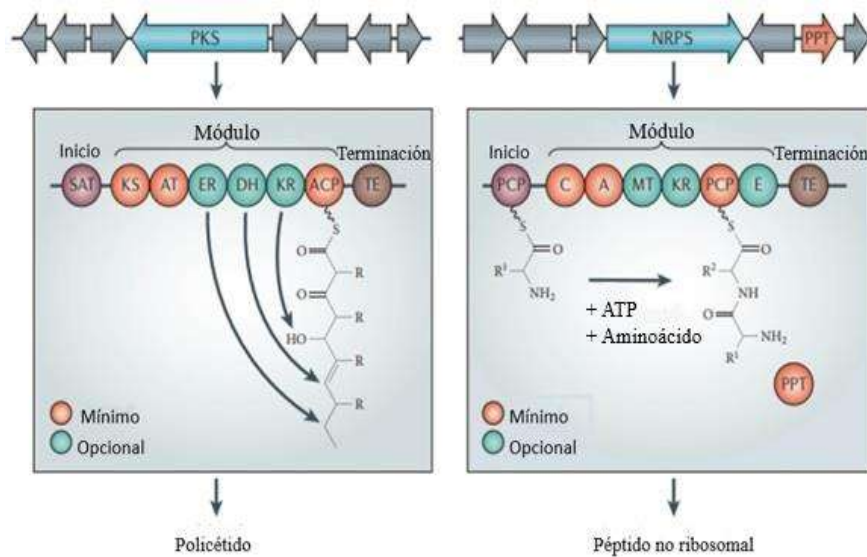
2009). El phylum Ascomycota es el taxón más grande de Dikarya, con el 64% de los hongos descritos. Hay tres clados bien definidos de Ascomycota: Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina. En el subphylum Pezizomycotina se encuentran prácticamente todas las especies de ascomycetes que protegen sus ascos con estructuras multicelulares, que van desde cuerpos fructíferos microscópicos hasta estructuras de 25 cm de altura (Stajich *et al.*, 2009). En este subphylum se encuentra la clase Dothideomycetes, dentro de la cual está el género *Paraconiothyrium*, en el orden de los Pleosporales (Damm *et al.*, 2008).

#### **1.4. Metabolismo secundario en hongos**

Los metabolitos secundarios son compuestos heterogéneos de baja masa molecular que no se requieren directamente para asegurar el crecimiento de los organismos, al menos *in vitro*. Bacterias y hongos pueden producir una amplia gama de metabolitos secundarios que son utilizados para sobrevivir en sus complejos ecosistemas, utilizados como señales químicas para la comunicación, defensa o inhibir el crecimiento de competidores (Yim *et al.*, 2007). Estos compuestos tienen importantes aplicaciones farmacológicas y la mayoría de ellos derivan de péptidos no ribosomales (NPR), policétidos o terpenos. Por ejemplo, los antibióticos de uso clínico como la penicilina y la cefalosporina son derivados de NPR (Brakhage y Schroeckh, 2011). Miles de metabolitos secundarios derivan del andamio de los policétidos, como la lovastatina, compuesto que ayuda a la reducción del colesterol (Hoffmeister y Kellerb, 2007). También existen compuestos que presentan moléculas mixtas de policétidos y péptidos no ribosomales. Además, existen otras vías de síntesis como las giberelinas que derivan de los terpenos y las oxilipinas, que derivan de los ácidos grasos (Brodhun y Feussner, 2011).

Los genes responsables para la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis del metabolismo secundario fúngico se encuentran en grupos que pueden abarcar más de 10,000 pares de bases (Brakhage y Schroeckh, 2011), aunque existen excepciones en donde se pueden encontrar genes en cromosomas diferentes que codifican para enzimas en la biosíntesis de un solo metabolito secundario (Lo *et al.*, 2012). La mayoría de los grupos contienen genes de biosíntesis central que codifican para multidominios grandes, enzimas multimodales que pertenecen a las policétido sintasas (PKS) o sintetisas peptídicas no

ribosomales (NRPS). Las enzimas PKS y NRPS construyen los andamios estructurales de la mayoría de los metabolitos secundarios. Estas enzimas utilizan como bloques de construcción malonil CoA (PKS) y aminoácidos (NRPS) para la síntesis de las estructuras centrales de los respectivos metabolitos secundarios (Hertweck, 2009). Aunque sus sustratos difieren considerablemente, estas enzimas multimodales tienen notables similitudes en su arquitectura, así como en los mecanismos utilizados para el ensamblaje del producto. Ambos sistemas enzimáticos están organizados en módulos, cada uno de los cuales es responsable de un paso de alargamiento de la molécula y en estos existen dominios que coordinan y controlan la elección de la unidad de extensión (Brakhage, 2013). Como mínimo, un módulo de las sintetisas peptídicas no ribosomales está formado por tres dominios: un dominio de adenilación responsable de la activación de aminoácidos; una proteína portadora de péptido (también conocida como dominio de tiolación), que se une al cofactor 4'-fosfopanteteína (4'PP), a la que se une covalentemente el aminoácido activado, y un dominio de condensación que cataliza la formación de enlaces peptídicos (Kehr *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Grupos de genes y enzimas para el metabolismo secundario de hongos. Agrupaciones de genes con un gen central de péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) (derecha) y gen de policétido sintasa (PKS) (izquierda). Los dominios mínimos de las enzimas codificadas se indican como esferas, y los dominios mínimos necesarios para formar un módulo de la enzima se muestran en rojo (Brakhage, 2013).

Las policétido sintetasas contienen un dominio de inicio de ACP transacilasa (SAT) y uno de terminación. El dominio de aciltransferasa (AT) selecciona unidades de extensión para agregar al producto y las transfiere al dominio de la proteína portadora de acilo (ACP), que carga las unidades para extender el producto y un dominio cetoacil sintasa (KS). Durante la síntesis pueden ocurrir modificaciones del producto que son realizadas por los diversos dominios que pueden estar presentes en la enzima. Por ejemplo, un dominio de  $\beta$ -cetoacil reductasa (KR), un dominio deshidratasa (DH), un dominio enoil reductasa (ER) (Kehr *et al.*, 2011). En el caso de las sintetasas peptídicas no ribosomales, estas se encuentran constituidas por un dominio iniciador de proteína portadora de peptidilo (PCP), que se une al cofactor 4'-fosfopanteteína (4'PP), al que se une covalentemente el aminoácido activado, un dominio de adenilación (A); un dominio de condensación (C), que cataliza la formación de enlaces peptídicos, y un dominio 4'PP transferasa (PPT), que normalmente está codificado por otro gen en el grupo. Ambos mecanismos tienen un dominio de tioesterasa (TE) (Brakhage, 2013).

Los grupos de genes del metabolismo secundario fúngico están controlados por una red reguladora compleja que involucra múltiples proteínas y complejos que responden a diversos estímulos ambientales. Estos estímulos incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, temperatura, luz, pH, aminoácidos en el medio ambiente, especies reactivas de oxígeno, condiciones hipóxicas y disponibilidad de hierro, pero también estímulos derivados de otros organismos (Yin y Keller, 2011).

### **1.5 Inducción del metabolismo secundario en hongos**

Los metabolitos secundarios producidos por hongos presentan gran variedad estructural y funcional (Brakhage y Schroeckh, 2011), lo que genera gran interés sobre las aplicaciones que estos pueden tener en beneficio de la salud humana, por lo que la investigación de estos microorganismos es una herramienta importante para combatir el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Como se mencionó anteriormente, los productos naturales producidos por bacterias, hongos y plantas que se consideran metabolitos secundarios no son necesarios para la supervivencia del microorganismo *in vitro*, pero le proporcionan una ventaja específica en su hábitat natural. Debido a la estructura altamente especializada, resultado de millones de años de evolución, los productos naturales tienen interacciones

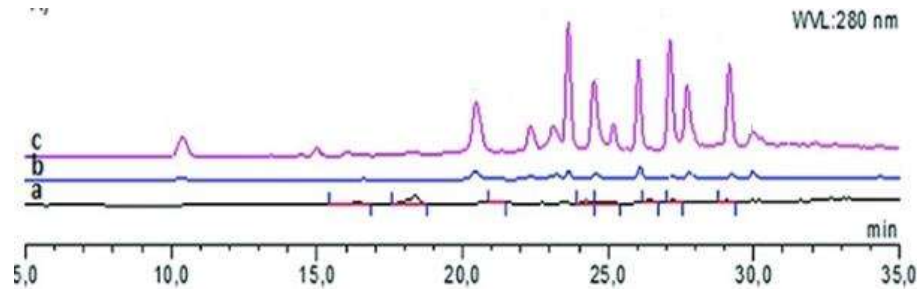
biológicas específicas, lo que los convierte en moléculas con un alto potencial farmacológico (Tomm *et al.*, 2019).

Por lo anterior, los productos naturales han sido de ayuda para el desarrollo de la medicina, aportando la mayoría de los antibióticos y aproximadamente la mitad de los medicamentos contra el cáncer en uso clínico, contribuyendo así en el aumento de la esperanza de la vida humana a través de tratamientos efectivos contra patologías potencialmente mortales (Du y van Wezel, 2018). La mayoría de estos compuestos fueron descubiertos en la era dorada del descubrimiento de productos naturales (1950-1960), por lo que las fuentes de estos metabolitos parecían estar agotadas y nuevas fuentes producían moléculas previamente conocidas. Esto derivó en un interés mayor por la síntesis química de nuevos compuestos. Sin embargo, es difícil lograr en el laboratorio la complejidad y diversidad que poseen los productos naturales. El escaso descubrimiento de nuevos antibióticos de los últimos años, junto con el aumento en las muertes causados por diferentes patologías por bacterias resistentes, ha renovado el interés y la urgencia por encontrar nuevos compuestos producidos por fuentes naturales (Tomm *et al.*, 2019).

Se ha documentado que las condiciones estándar de cultivo de laboratorio provocan el silenciamiento de genes del metabolismo secundario de algunos microorganismos. Esto ha llevado a la búsqueda de diferentes estrategias para promover la expresión de dichos genes, como lo es la inducción en el medio de cultivo (Park *et al.*, 2009), una de las formas más simples de estimular su transcripción. Existen diferentes formas para lograr la inducción del metabolismo secundario en el medio de cultivo, una de las cuales consiste en modificar las fuentes de carbono y nitrógeno, o su proporción en el medio. Las características del medio de cultivo y de las condiciones ambientales de incubación también tienen un impacto significativo en la cantidad y diversidad de los metabolitos secundarios producidos por una cepa fúngica (VanderMolen *et al.*, 2013). En ese sentido, existe una técnica denominada OSMAC (una cepa-muchos compuestos, por sus siglas en inglés) la cual fue descrita por Zeeck y colaboradores a principios de la década de los 2000 y se desarrolló para maximizar la productividad de un solo microorganismo, mediante la modificación de los parámetros de cultivo, como composición del medio, pH, temperatura, suministro de oxígeno, calidad y cantidad de luz, plataforma o la adición de precursores o inhibidores enzimáticos (Miao *et al.*, 2006). Así, se estudió el desarrollo de una cepa de un

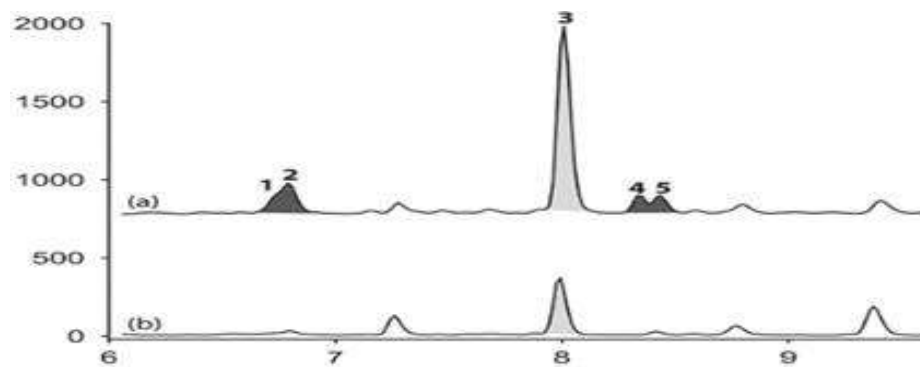
hongo de la clase Dothideomycetes de especie desconocida con el enfoque OSMAC, realizando cambios en el medio de cultivo, preparando el caldo papa dextrosa de manera casera en el laboratorio con tubérculos frescos, comparando con medios caldo papa dextrosa de marcas comerciales y comparando dicho medio con dos marcas comerciales del caldo extracto de malta. En los cultivos con medio preparado a partir de tubérculos frescos se obtuvieron tres derivados de azafilona, un policétido tricíclico; en cambio, en los cultivos de PDB comercial se obtuvieron dos derivados de azafilona y tres nuevos policétidos. En el caso de los cultivos con extracto de malta comercial, se obtuvieron cuatro policétidos y dos derivados de azafilona empleando el medio de cultivo de una marca de origen español, mientras que en el medio de la marca de origen estadounidense se obtuvieron tres policétidos y los mismos dos derivados de azafilona (Hewage *et al.*, 2014). Estos datos muestran cómo no solo diferentes medios de cultivo, sino diferencias sutiles en la composición del medio, pueden modificar el patrón de síntesis de metabolitos secundarios de una cepa fúngica.

Una de las técnicas empleadas en los últimos años para activar la producción de metabolitos secundarios es la del co-cultivo, en la cual se cultivan en el mismo medio dos especies de microorganismos, que pueden ser incluso de diferentes reinos, como hongos y bacterias (Tomm *et al.*, 2019). Las interacciones en este tipo de cultivos provocan la inducción en la producción de metabolitos que ayudan a la defensa, la comunicación o la competencia, logrando la activación del metabolismo secundario, incrementando la producción y síntesis de nuevos metabolitos (Tomm *et al.*, 2019). Los cultivos entre especies de distintos reinos representan una oportunidad para acceder a una gama más amplia de metabolitos fúngicos, los cuales han sido una fuente importante en la producción de antibióticos en el pasado (Park *et al.*, 2009). Otra alternativa para inducir la producción de metabolitos secundarios es mediante el empleo de células microbianas no viables. Por ejemplo, el cultivo de *Chaetomium* sp. con células de *Pseudomonas aeruginosa* inactivadas por autoclave provocó la inducción en la síntesis de metabolitos (Fig. 3), incrementando algunos y generando la síntesis de nuevos (Ancheeva *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Cromatogramas de HPLC de extractos de EtOAc de los experimentos de co-cultivo (detección UV a 280 nm): (a) control de *Pseudomonas aeruginosa* en autoclave, (b) *Chaetomium* sp. control, y (c) co-cultivo de *Chaetomium* sp. con *P. aeruginosa* inactivada por autoclave (Ancheeva *et al.*, 2017).

Una variante del método anterior es inducir la producción de metabolitos con componentes moleculares específicos de células microbianas. Por ejemplo, en *Penicillium* sp. se ha reportado que agregar al medio de cultivo un componente de la pared bacteriana como los lipopolisacáridos, se modifican los patrones de producción de metabolitos secundarios (Khalil *et al.*, 2014), como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Metabolitos 1 a 5 son producidos por *Penicillium* sp. al ser estimulado por lipopolisacáridobacteriano (Khalil *et al.*, 2014).

### 1.6 Producción de metabolitos secundarios en el género *Paraconiothyrium*

Las especies del género *Paraconiothyrium* representan una fuente de metabolitos secundarios y su caracterización es una importante área de desarrollo dentro de este grupo taxonómico. Existe una amplia diversidad de compuestos descritos que tienen actividad biológica producidos por *Paraconiothyrium* spp. No obstante, los metabolitos con actividad farmacológica obtenidos de *Paraconiothyrium* spp. han sido evaluados principalmente por

su actividad anticarcinogénica *in vitro*. Así, se ha identificado la producción de taxol por parte de *P. variable*, por lo que se considera su potencial para la fabricación de este fármaco el cual es utilizado para el tratamiento del cáncer (Somjaipeng *et al.*, 2015). Modificando las condiciones de cultivo en la producción de taxol, se observó que el mayor rendimiento de  $68.9 \pm 11.9 \mu\text{g/L}$  se produjo bajo estrés iónico modificado de 0.98 a<sub>w</sub> (KCl) a pH 5 cuando se suplementó con ácido salicílico a 20 mg/L (Somjaipeng *et al.*, 2016). También, se aislaron seis nuevos sesquiterpenos de una cepa de *P. brasiliense* cultivado en un medio de cultivo que contenía 0.4% de glucosa, 1% de extracto de malta y 0.4% de extracto de levadura y el pH final de los medios se ajustó a 6.5. Uno de los compuestos mostró citotoxicidad significativa contra las líneas celulares tumorales MCF-7 y MGC, sin afectar a concentraciones aún mayores a las líneas normales HaCaT (queratinocito humano) y NIH-3T3 (fibroblasto de embrión de ratón) (Guo *et al.*, 2015). Por otra parte, una cepa marina de *P. sporulosum* produce dos compuestos caracterizados como epoxifomalinas A (1) y B (2). El esqueleto básico de estas moléculas está compuesto por un sistema de anillo de decalina isoprenoide fusionado a un residuo de epoxidona que presentan patrones de sustitución y oxidación. La epoxifomalina A mostró citotoxicidad en concentraciones nano molares hacía varias líneas celulares tumorales (Kelter *et al.*, 2010).

Tres nuevos metabolitos secundarios se aislaron del extracto de fermentación a gran escala de *P. hawaiiense*, entre los metabolitos descritos están dos tipos de cassano de lactonas diterpénicas y un cleistantano. Uno de los primeros compuestos mostró actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas T24 y MCF-7 (Chen *et al.*, 2014). Además, de una cepa de *P. brasiliense* aislada del tracto digestivo de *Acrida cinerea* se obtuvieron una serie de furanonas de las cuales una presentó actividad neuroprotectora hacia células PC12 que fueron inducidas a apoptosis por exposición a peróxido de hidrógeno (Liu *et al.*, 2016). De la misma forma, de seis glicósidos diterpenos de tipo isopimarano aislados de una cepa endófito de *Paraconiothyrium* sp., dos tuvieron actividad citotóxica contra la línea celular HL60 de leucemia promielocítica (Shiono *et al.*, 2011). En otros estudios, además de la actividad anticarcinogénica *in vitro*, se han analizado otro tipo de propiedades farmacológicas. Por ejemplo, una cepa endófito de *Paraconiothyrium* sp. se aisló de la planta medicinal *Rhedia brasiliense*; el producto de fermentación obtenido con este hongo en acetato de etilo se evaluó a través de un ensayo de antioxidantes y también se realizaron

ensayos antiproliferativos con la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT). Los resultados fueron positivos, mostrando actividad antioxidante y antiproliferativa para esta línea celular, por lo que podría tener aplicación en el tratamiento de psoriasis (Ikegaki, 2012).

En términos de compuestos con actividad contra agentes infecciosos, se han descrito cuatro moléculas del tipo sesquiterpenos tricíclicos con esqueleto de bergamotano, producidos por *P. brasiliense*, denominados como brasilamidas A, B, C y D. Dos de ellos presentaron actividad regular para inhibir la replicación del virus HIV-1 en células C8166 (Liu *et al.*, 2010). Entre los primeros metabolitos en ser descritos dentro de dicho taxón se encuentran un diterpenoide tipo glucósido de isopimarano y un análogo ácido que presentaron actividad contra los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*. Estos fueron obtenidos gracias a un fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto de acetato de etilo de los cultivos de fermentación en sustrato sólido en la especie *Paraconiothyrium fungicola* (Verkley *et al.*, 2004).

En términos de la actividad antibacteriana, son pocos los estudios realizados con extractos o compuestos de cepas de *Paraconiothyrium* spp. Así, el extracto de micelio de una cepa de *Paraconiothyrium* sp. se evaluó contra *Bacillus subtilis* (ATCC11562), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas lachrymans* (ATCC11921) y *Xanthomonas vesicatoria* (ATCC11633), encontrándose porcentajes de inhibición del 50% con respecto al control de las cepas empleadas, con el extracto de 0.5 mg/mL (Zhou, 2011). También se probó la actividad antimicrobiana de los extractos de micelio de una cepa de *Paraconiothyrium* sp. contra *Bacillus subtilis* (MTCC 121), *Escherichia coli* (MTCC 723) y *Staphylococcus aureus* (MTCC 96). El compuesto bioactivo producido se separó mediante fraccionamiento guiado por bioactividad y se identificó por GC-MS como dantrón, un derivado de antraquinona (Anisha *et al.*, 2018)

Por la capacidad del género *Paraconiothyrium* para producir metabolitos secundarios, las cepas silvestres de las especies de dicho taxón pueden ser utilizadas como una herramienta en el desarrollo de nuevos compuestos para el beneficio de la salud humana. Un aspecto interesante de los estudios de *Paraconiothyrium* spp. antes citados es que todos los metabolitos y las actividades caracterizadas se han realizado en extractos de micelio, sin que a la fecha se haya evaluado la capacidad para secretar metabolitos

bioactivos en este género. El Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UMSNH cuenta con la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium brasiliense*, la cual forma parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU) y fue aislada de una muestra de suelo en el año 2005, en el estado de Michoacán de Ocampo. A la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. se le ha determinado una amplia versatilidad metabólica, la actividad positiva de la enzima lacasa y la capacidad efectiva de antagonizar microorganismos fitopatógenos (Arredondo- Santoyo *et al.*, 2018). No obstante, no se ha evaluado la capacidad para producir metabolitos con actividad antibacteriana de dicha cepa.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública a nivel global que es necesario atender, ya que cada vez son menos los tratamientos que aun resultan efectivos contra patologías causadas por distintas especies y cepas bacterianas. Esto ha provocado un incremento en la morbilidad y mortalidad de enfermedades infecciosas causadas por bacterias en todo el mundo, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que puedan ser efectivas contra los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias en la actualidad.

La caracterización y estudio de metabolitos secundarios producidos por fuentes naturales como distintas especies fúngicas es una herramienta de investigación importante que tiene el potencial para dar solución al problema de la resistencia bacteriana. Existen cepas del género *Paraconiothyrium* en las que se ha documentado la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, además de ser cepas de rápido crecimiento y que no representan un riesgo para el humano. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de metabolitos extracelulares no se ha evaluado en *Paraconiothyrium* spp.

### **3. HIPÓTESIS**

La cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. produce una mayor variedad química de metabolitos extracelulares en un cultivo inducido que en un cultivo basal, presentando una actividad inhibitoria significativamente mayor contra bacterias multirresistentes a antibióticos.

### **4. OBJETIVOS**

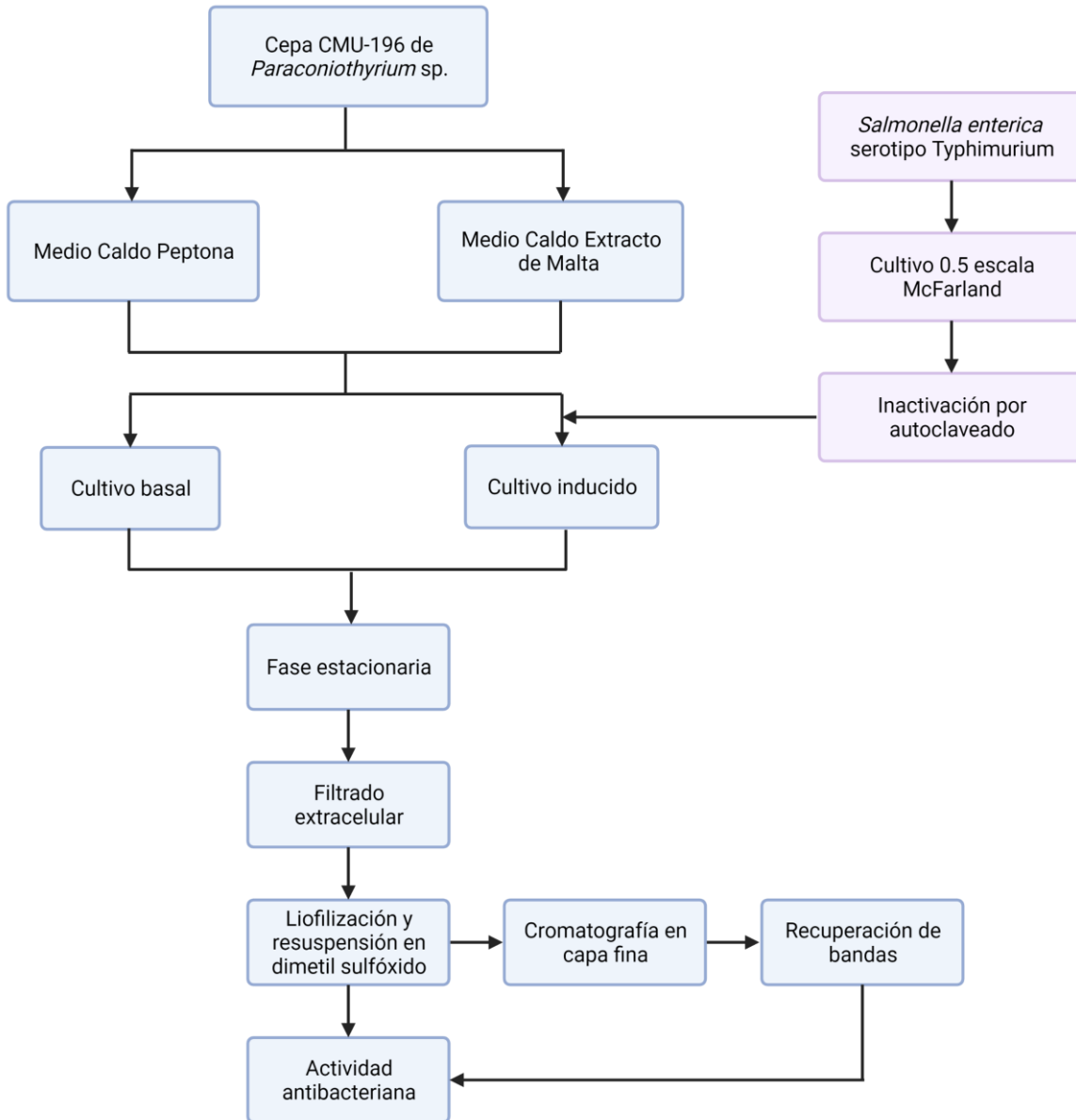
#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antibacteriana del concentrado extracelular de cultivos basales e inducidos de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. contra bacterias multirresistentes a antibióticos.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- i. Determinar la actividad antimicrobiana del filtrado extracelular de la fase estacionaria de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. crecida en distintos medios de cultivo líquidos basales.
  
- ii. Evaluar el efecto de la adición de biomasa bacteriana inerte sobre la actividad antimicrobiana del filtrado extracelular de la fase estacionaria de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp.
  
- iii. Identificar grupos de compuestos presentes en el filtrado extracelular de la fase estacionaria de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. crecida en medios de cultivo inducidos y no inducidos.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepa de estudio**

Se estudió a la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp., la cual forma parte del Cepario Michoacano Universitario (CMU) y fue aislada de una muestra de suelo en el año 2005, en el municipio de Atécuaro (19°83'40" N – 10°18'130" W), del estado de Michoacán de Ocampo. La cepa se mantuvo tanto en agua a temperatura ambiente como en criopreservación a -80 °C.

### **6.2 Cepas bacterianas de prueba**

La colección de cepas de prueba (Tabla 2) incluyó especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas, cepas de referencia, aislados clínicos y ambientales obtenidos en el estado de Michoacán, varios de los cuales presentan multirresistencia a antibióticos.

### **6.3 Medios de cultivo y obtención de inóculos**

El medio Agar Papa y Dextrosa (PDA, Difco™ BD, Diagnostics) se empleó para el cultivo y mantenimiento del micelio vegetativo de la cepa de estudio y la obtención de inóculos. Los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia en la fase logarítmica de crecimiento con un sacabocados de 6 mm de diámetro a partir de colonias creciendo en medio PDA a 28 °C. Los medios caldo peptona (CP, Difco™ BD Diagnostics) y caldo extracto de malta (CEM, Difco™ BD Diagnostics) se utilizaron para elaborar las cinéticas de crecimiento en medio líquido y evaluar la actividad antibacteriana. Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

### **6.4 Cultivos en medio líquido**

Los cultivos en medio líquido se emplearon para determinar el crecimiento de la cepa y evaluar el nivel de actividad antibacteriana tanto basal como inducida. Para la actividad basal, matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio CP y CEM se inocularon con 3 inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Dichos cultivos se incubaron a 28 °C en agitación (120 rpm).

**Tabla 2.** Cepas bacterias de prueba y sus características.

| Clave de cepa | Especie/Serotipo                        | Patotipo/ Genotipo (ST) | Información adicional  |
|---------------|---|-------------------------|--|
| Gram (-)      |   |                         |  |
| SAL004        | <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium | ST19                    | Aislada de una muestra de queso fresco.  |
| SAL115        | <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium | ST213                   | Aislada de una muestra de queso asadero.<br>Cepa multirresistente a antibióticos (cloranfenicol, ampicilina, carbenicilina, cefalotina). |
| ATCC 14028    | <i>Salmonella enterica</i> /Typhimurium | (ST19)                  | Cepa de referencia.  |
| 0111          | <i>Escherichia coli</i>                 | EPEC                    | Cepa de referencia.  |
| ATCC          | <i>Escherichia coli</i>                 | EIEC                    | Cepa de referencia.  |
| 25611         | <i>Escherichia coli</i>                 | ETEC-ST                 | Cepa de referencia.  |
| H10407        | <i>Escherichia coli</i>                 | ETEC-LT-ST              | Cepa de referencia   |
| No.10         | <i>Escherichia coli</i>                 | Uropatógena             | Resistencia a trimetropin, gentamicina, ampicilina, amoxicilina, cefotaxima, cefazolina, cefoperazona, cefalexina, cuprofloxacina        |
| Gram (+)      |   |                         |  |
| No disponible | <i>Staphylococcus aureus</i>            | Desconocido             | Aislado clínico<br>Resistente antibióticos   |
| ATCC          | <i>Staphylococcus aureus</i>            | Desconocido             | Cepa de referencia   |

Se utilizó como inductor en cultivos líquidos la cepa 115 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium inactivada por autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min.

### **6.5 Cultivos en medio líquido inducidos con biomasa bacteriana inerte**

Estos cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio CP y CEM, los cuales se inocularon con 3 inóculos cilíndricos de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. A dichos cultivos se les agregó 1 mL por cada 100 mL de medio de cultivo de una dilución de colonias bacterianas con una turbidez del 0.5 en la escala de McFarland, previamente inactivadas por esterilización de la manera antes descrita y se incubaron a 28 °C en agitación (120 rpm).

### **6.6 Cinética de crecimiento**

La cinética de crecimiento se elaboró midiendo la tasa de crecimiento (mg/día) cada 24 h por un periodo de diez días en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. El micelio se obtuvo filtrando el contenido de cada matraz a través de un papel filtro grado 41 (Whatman, UK) puesto a peso constante. La biomasa obtenida se lavó con agua destilada, el papel filtro con el micelio se secó a 60 °C por 24 h, se colocó en un desecador y se pesó. El peso seco del micelio se determinó por la diferencia de peso al restar el peso del papel.

### **6.7 Obtención del medio de crecimiento de la cepa CMU-196**

El medio de crecimiento se obtuvo separando el micelio filtrando el contenido de cada matraz a través de un papel filtro grado 41 (Whatman, UK). El medio líquido de la fase estacionaria de la cepa cultivada en forma basal e inducida se liofilizó. El liofilizado obtenido se disolvió en el volumen mínimo necesario para la su completa disolución, tanto en dimetilsulfóxido (DMSO) como de agua desionizada esterilizada.

### **6.8 Determinación de la actividad antibacteriana por antibiograma**

La actividad antibacteriana se midió por el método de antibiograma de Kirby-Bauer mediante disco-placa, colocando una concentración conocida en un intervalo de 10 mg/mL del concentrado, disuelto en DMSO en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro. Posteriormente, se distribuyen en una caja Petri de 9.5 cm de diámetro con agar Müller

Hinton previamente inoculada por estría masiva con una solución estandarizada al 0.5 de turbidez en la escala de McFarland, de un cultivo líquido de cada una de las cepas de prueba, en ensayos independientes. Se utilizaron dos sensidiscos control, uno se impregnó con DMSO y otro con concentrado de medio de cultivo sin inocular. Se determinó la efectividad de los discos impregnados con el concentrado del medio líquido con la observación de la placa y la presencia de halos de inhibición.

### **6.9 Determinación de la actividad antibacteriana en microplacas de 96 pozos**

La actividad antibacteriana se determinó en microplacas de 96 pozos con un volumen final de 160  $\mu$ L por pozo, determinando el crecimiento con relación a las lecturas de absorbancia a 590 nm en el equipo MicroStation (Biolog, USA) cada 2 h durante 10 h, utilizando el programa Microlog3™ Release 4.20. Las cepas bacterianas de prueba se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) durante 24 h a 37 °C para posteriormente tomar inóculos de 50  $\mu$ L, los cuales se diluyen en 2 mL de medio LB para obtener una densidad de 0.08 – 0.1 nm, equivalente a 0.5 en la escala de McFarland. De este volumen final, se tomaron alícuotas para los ensayos de inhibición y los controles. Para los ensayos de inhibición se utilizó un inóculo en 110  $\mu$ L del medio con las cepas bacterianas a los que se les adicionó de 10 mg/mL de concentrado resuspendido. Se utilizaron dos tratamientos control, el primero consiste en 160  $\mu$ L del inóculo de las cepas de prueba para seguir su crecimiento, y el segundo de 110  $\mu$ L de inóculo de las cepas bacterianas de prueba, a los que se les adicionan 50  $\mu$ L del medio de medio CP y CEM, en ensayos independientes, para evaluar la inhibición por el medio de cultivo fúngico. Las placas así preparadas se inocularon a 37 °C durante el periodo de tiempo especificado en cada caso.

### **6.10 Detección de metabolitos por cromatografía en capa fina (TLC)**

La detección de compuestos orgánicos extracelulares producidos por la cepa CMU-196 se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina. La cromatografía se llevó a cabo en placas de cromatografía de gel de sílice (Merck). Las placas de TLC se cortaron (4 x 5 cm) y se marcó el espacio para la colocación de muestra. La muestra del concentrado resuspendido en metanol, se aplicó mediante un capilar en una placa de gel de sílice. La placa se secó al aire y se desarrolló de manera ascendente en una cámara de cromatografía. El desarrollo de la placa se llevó a cabo utilizando como fase móvil

hexano:acetato de etilo (1:9) y metanol:acetato de etilo (1:9). Después de la separación, las placas se revelaron en una cámara UV (longitud de onda,  $\lambda = 254, 302$  y  $365$  nm) y con  $H_2SO_4$  al 5% (v/v) como revelador y se calculó el factor de retención (RF).

#### **6.11 Recuperación de los compuestos separados por cromatografía en capa fina (TLC)**

La recuperación de los compuestos separados por cromatografía en capa fina se realizó mediante una extracción orgánica. Una vez obtenida la TLC preparada con 200  $\mu$ L de los liofilizados a una concentración de 100 mg/mL se marcaron los compuestos separados, se recuperó la sílice donde se encuentran retenidos los compuestos y posteriormente se filtró a través de un papel filtro grado 41 (Whatman, UK) para separar la sílice, la cual se lavó con metanol. Después se recuperó el metanol utilizado en los lavados y se concentró en rotavapor a 40 °C y 40 rpm hasta sequedad, el concentrado se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril. Se evaluó la actividad antibacteriana de los compuestos recuperados utilizando la técnica en placa de 96 pozos anteriormente descrita.

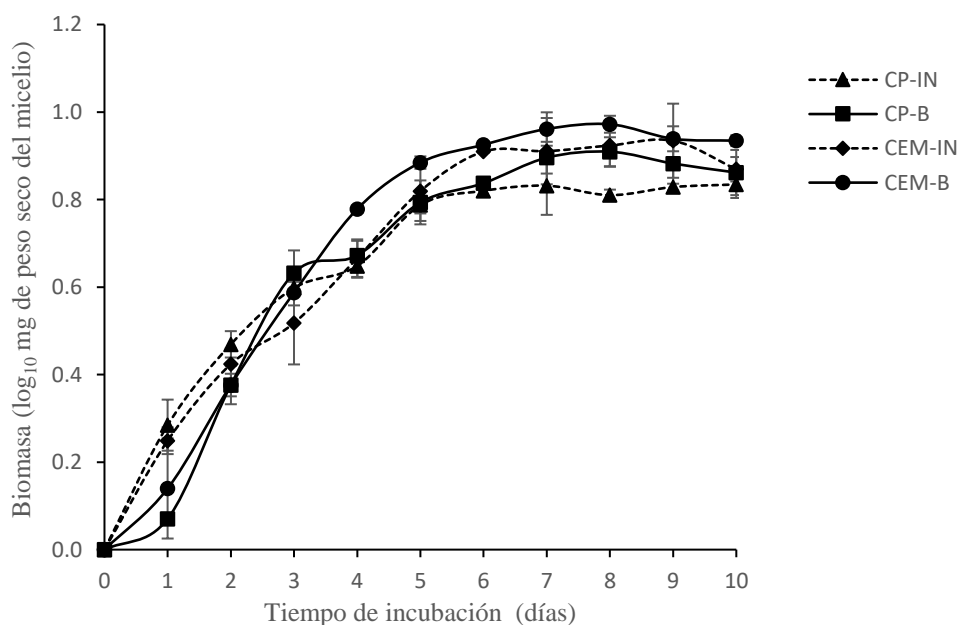
#### **6.11 Análisis estadístico de resultados**

Se realizó un análisis de estadística descriptiva, así como pruebas de T para evaluar si presentaron diferencias significativas en la producción de metabolitos en condición basal e inducida. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba de Tukey para la comparación de medias y determinar las diferencias significativas en las pruebas de inhibición con valor de significancia de  $P < 0.05$ . Se utilizó el software JMP® (USA) para este análisis.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cinéticas de crecimiento

La fase estacionaria de crecimiento de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. en ambos medios de cultivo comenzó entre los días 6 y 7 de incubación (Fig. 5). En el séptimo día de incubación existe una diferencia de 7.1 % (0.064 mg) entre el peso seco del micelio obtenido con caldo peptona basal (CP-B) y el obtenido con caldo peptona inducido (CP-IN), obteniéndose más biomasa en el CP-B. En el caso del micelio obtenido en caldo extracto de malta basal (CEM-B) y caldo extracto de malta inducido (CEM-IN), hay una diferencia de 5.2%, (0.050 mg) en el peso seco del micelio, siendo mayor en el primero. La velocidad de crecimiento en los medios de cultivo inducidos fue mayor en los dos primeros días de la cinética. Sin embargo, en estos cultivos se presenta menor biomasa de micelio en la fase estacionaria. No se observa diferencia significativa entre los cultivos basales e inducidos del mismo medio de cultivo, pero se observa una diferencia significativa entre los medios CEM-B y CP-IN.



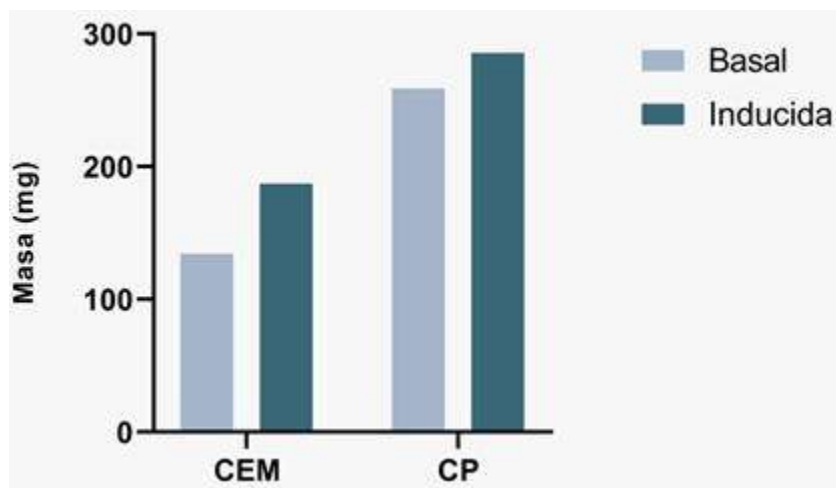
**Figura 5.** Cinéticas de crecimiento de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestran las cinéticas de crecimiento en caldo extracto de malta (CEM) y caldo peptona (CP) en condiciones basales (B) y de inducción (IN) con biomasa inerte de *Salmonella enterica*. Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación orbital. Se observa una diferencia significativa entre los medios CEM-B y CP-IN con un valor de  $p > 0.01$ .

Con respecto al desarrollo del micelio en los dos medios de cultivo, se observan diferencias en la morfología del micelio, presentándose un cambio de pigmentación en el CP en los que la biomasa adquiere un tono café oscuro (Fig. 6). Además, en dicho medio se observa un micelio menos compacto que muestra tanto agregaciones o *pellets* de gran tamaño como micelio disgregado, con menor nivel de compactación. En contraste, la biomasa del medio CEM conserva un tono crema y *pellets* de micelio bien definidos, pero de tamaño variable.



**Figura 6.** Inóculos de la cepa CMU-196 en caldo extracto de malta (izquierda) y caldo peptona (derecha). Los cultivos se incubaron a 28 °C y 120 rpm de agitación orbital.

Del liofilizado de 150 mL del medio de cultivo CEM-B, se obtuvieron 134.3 mg de concentrado. De manera similar, de 150 mL del medio caldo extracto de malta inducido se obtuvieron 187.0 mg. También se liofilizaron 150 mL de caldo peptona basal, del cual se obtuvieron 258.9 mg y del mismo volumen de caldo peptona inducido se obtuvieron 285.6 mg. Todos los cultivos se incubaron por siete días, de tal forma que los rendimientos de liofilizado provienen de la fase estacionaria (Fig. 7).



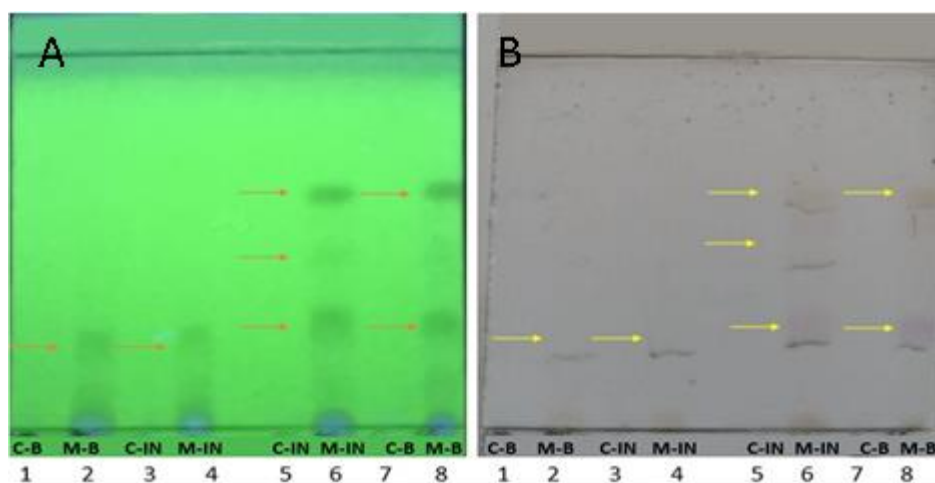
**Figura 7.** Masa liofilizada de 150 mL de los diferentes medios de cultivo; caldo extracto de malta (CEM) basal e inducido, caldo peptona (CP) basal e inducido.

Así, se observa una diferencia en la cantidad de liofilizado entre los dos medios de cultivo empleados, obteniendo mayor cantidad en los cultivos de CP-B y CP-I. También se observa un incremento en el rendimiento del liofilizado en los medios inducidos. Además, los liofilizados presentan diferencias en solubilidad. En el caso de los obtenidos de caldo peptona, muestran solubilidad en acetona y metanol, mientras que los obtenidos de caldo extracto de malta solo son solubles en metanol (datos no mostrados). Esto sugiere que los liofilizados presentan metabolitos de naturaleza química distinta, siendo compuestos más polares los obtenidos en el medio CEM.

## 7.2. Separación de metabolitos mediante cromatografía en capa fina

Se realizaron las cromatografías de los liofilizados obtenidos de ambos medios de cultivo, a partir de una solución del liofilizado disuelto en metanol, a una concentración de 100 µg/mL. De la misma manera, se prepararon los controles correspondientes de cada medio de cultivo y condición. Se observaron bandas en los liofilizados de ambos medios a 302 nm. En el caso del liofilizado proveniente de CEM se observan las mismas bandas en condición basal e inducida, con un factor de retención de 0.225. Sin embargo, en el liofilizado obtenido del crecimiento de la cepa de estudio en CP, se pueden observar dos pares de bandas con factores de retención idénticos de 0.3 en la primera y 0.6 en el segundo par (Fig. 8). Además, se presenta una banda extra en el liofilizado de CP-I, la cual tiene un factor de retención de 0.45. Al revelar la placa con ácido sulfúrico al 5% (v/v) solo se

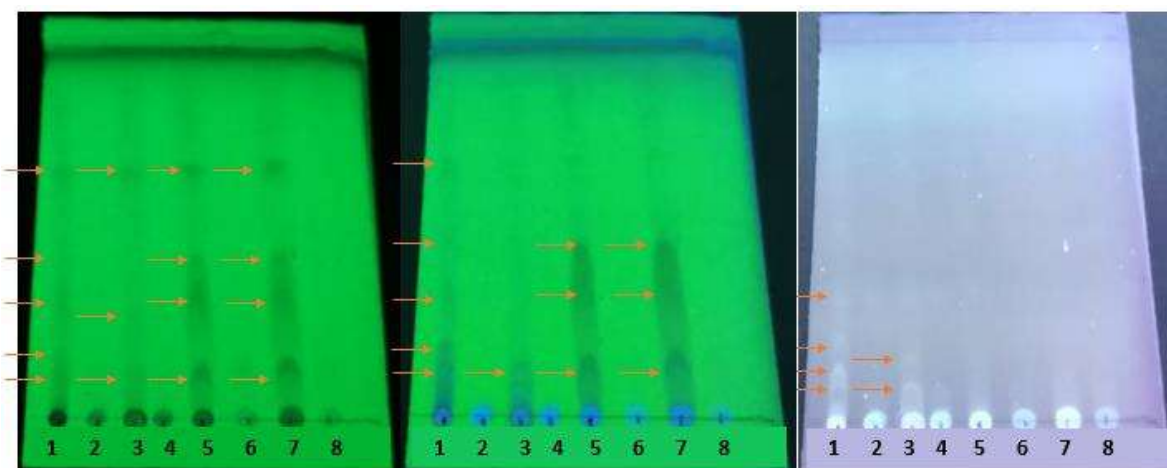
observaron bandas en CP. Esto indica que el revelador no interacciona con los compuestos orgánicos del medio extracto de malta, por lo que se trata de compuestos diferentes que tienen factores de retención similares (Fig. 8).



**Figura 8.** Cromatografía en capa fina de los medios de cultivo de la cepa CMU-196 en fase estacionaria revelada por luz UV a 302 nm (A) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (v/v) (B). Se emplearon controles de cada medio sin inocular con la cepa CMU-196. De izquierda a derecha en ambos cromatogramas: caldo extracto de malta (CEM) control basal sin inocular (1), CEM basal inoculado (2), CEM control inducido sin inocular (3), CEM inducido inoculado (4); caldo peptona (CP) control inducido sin inocular (5), CP inducido e inoculado (6), CP control basal sin inocular (7) y CP basal inoculado (8). La fase móvil fue acetato de etilo:hexano (9:1).

Se desarrollaron otras cromatografías con la misma muestra y a la misma concentración que las anteriores, pero empleando una fase móvil de acetato de etilo:metanol (9:1). En este caso se observó una mejor separación de las muestras liofilizadas provenientes de ambos medios de cultivo en donde había crecido la cepa CMU-196. Las cromatografías se revelaron a 254 nm, 302 nm y 365 nm (Fig. 9). En el caso del medio CEM en la cromatografía revelada a 254 nm se observaron las mismas bandas en condiciones de crecimiento basal e inducida, cuatro bandas con factores de retención idénticos de 0.55, 0.45, 0.325 y 0.15. Sin embargo, en el caso de los liofilizados de cultivos en CP revelado a 254 nm se observaron dos bandas idénticas con un factor de retención de 0.55 y 0.15 en condición basal e inducida. Además, en la condición inducida se observan tres bandas extras las cuales presentaron factores de retención de 0.475, 0.3 y 0.2. En el caso de la condición basal se observa una banda extra con un factor de retención de 0.225 (Fig. 9). En el revelado de la cromatografía a 302 nm se observa en los liofilizados de CP una banda similar en condiciones basal e inducida, con un factor de retención de 0.15. Sin

embargo, en la condición inducida se observan tres bandas extras con factores de retención de 0.475, 0.3 y 0.2. En el caso de los liofilizados de cultivos en CEM se observan tres bandas similares con un factor de retención de 0.45, 0.325 y 0.15 (Fig. 9). Con el revelado a 365 nm se observan bandas únicamente en los liofilizados de cultivos en CP en la condición inducida se observan tres bandas con factores de retención de 0.35, 0.255, 0.125 y 0.1. En la condición basal de estos medios se observan dos bandas con factores de retención de 0.1 y 0.175 (Fig. 9).



**Figura 9.** Cromatografía en capa fina de los medios de cultivo de la cepa CMU-196 en fase estacionaria revelada por luz UV a 254 nm (izquierda), 302 nm (centro) y 365 nm (derecha). En cada panel se incluyó una muestra control de ambos medios de cultivo sin inocular con la cepa CMU-196. En los tres paneles, de izquierda a derecha: CP inducido e inoculado (1), CP control inducido sin inocular (2), CP basal inoculado (3), CP basal sin inocular (4); caldo extracto de malta (CEM) inducido e inoculado (5), CEM control inducido sin inocular (6), CEM basal inoculado (7), CEM control basal sin inocular (8). La fase móvil fue acetato de etilo:metanol (9:1).

## 8. Determinación de la actividad antibacteriana de los concentrados extracelulares por antibiograma

Se evaluó la inhibición del crecimiento de las distintas cepas bacterianas de prueba en medio sólido empleando el método de antibiograma de Kirby-Bauer mediante disco-placa, como se describe en Materiales y Métodos (Tabla 2). Las cepas de *Staphylococcus aureus*

mostraron una sensibilidad limitada a los metabolitos extracelulares obtenidos de cultivos en caldo extracto de malta (CEM) y caldo peptona (CP) de la cepa de estudio (Fig.10).

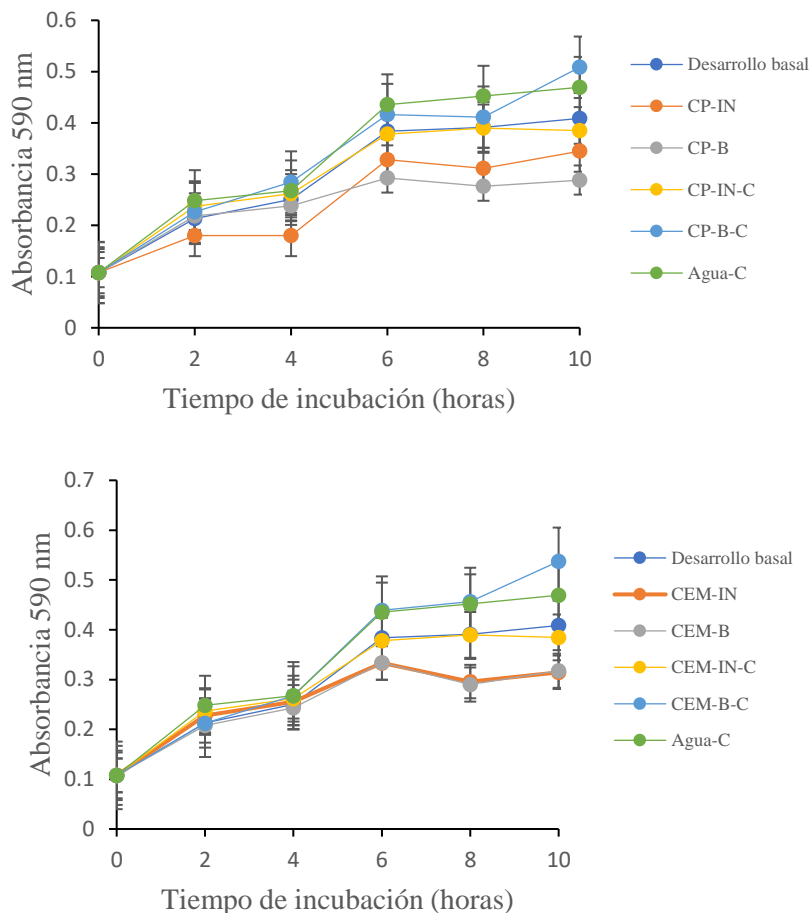


**Figura 10.** Ensayos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con los concentrados extracelulares de cultivos basales e inducidos de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestran los resultados de los concentrados de los cultivos en caldo extracto de malta (izquierda) y cultivos en caldo peptona (derecha) hacia una cepa clínica multirresistente a antibióticos (panel superior) y la cepa de ATCC (panel inferior) de *S. aureus*. Las abreviaturas indican el sedis disco control (DMSO-C) con dimetilsulfoxido, así como los sensidis cos con los concentrados extracelulares basales e inducidos de cultivos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN).

Las cepas de bacterias Gram negativas no presentaron sensibilidad a los concentrados extracelulares en medio sólido (datos no mostrados).

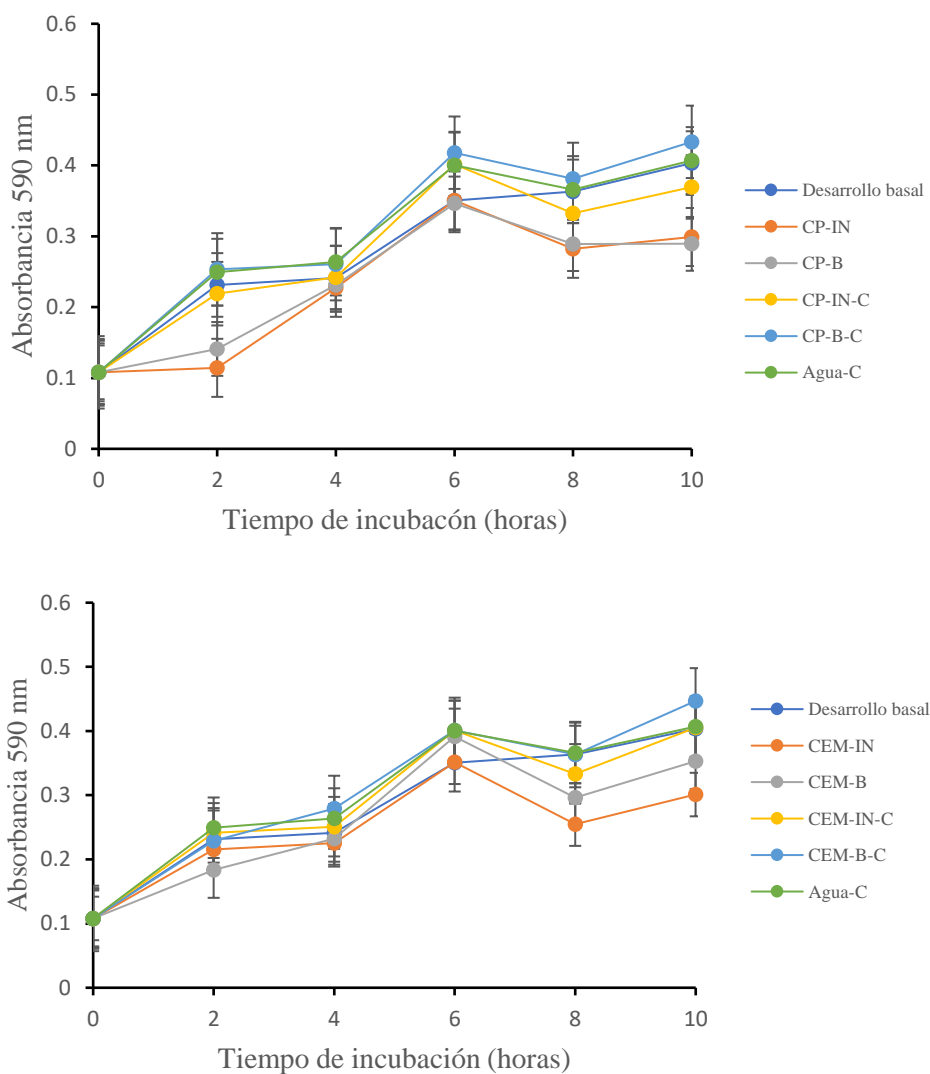
## 9. Ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de 96 pozos

Se evaluó la inhibición del crecimiento de las distintas cepas bacterianas de prueba en medio líquido empleando microplacas de 96 pozos como se describe en Materiales y Métodos. Las cepas de *S. aureus* muestran inhibición del crecimiento con los liofilizados de cultivos de la cepa CMU-196 en CP resuspendidos en agua (Fig. 11). En el caso de la cepa clínica de *S. aureus* resistente a meticilina, se observa una inhibición significativa tanto con el concentrado inducido como con el concentrado basal de dicho medio. Esta misma cepa también presenta inhibición al ser incubada con los concentrados de CEM basal e inducido.



**Figura 11.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C). Las placas se incubaron a 37 °C.

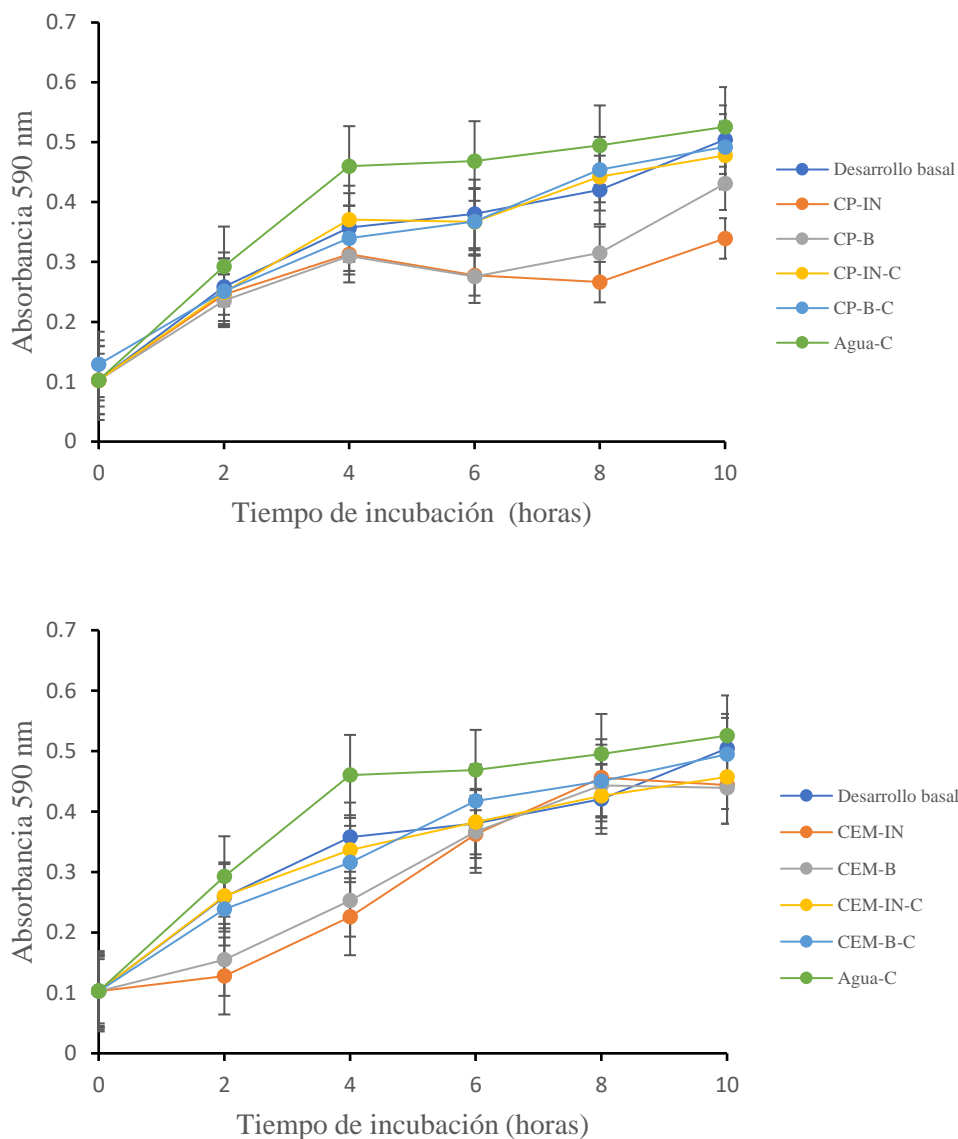
La cepa de referencia ATCC de *S. aureus* mostró sensibilidad a los liofilizados de los cultivos en CEM y CP en condiciones basal e inducida (Fig. 12).



**Figura 12.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

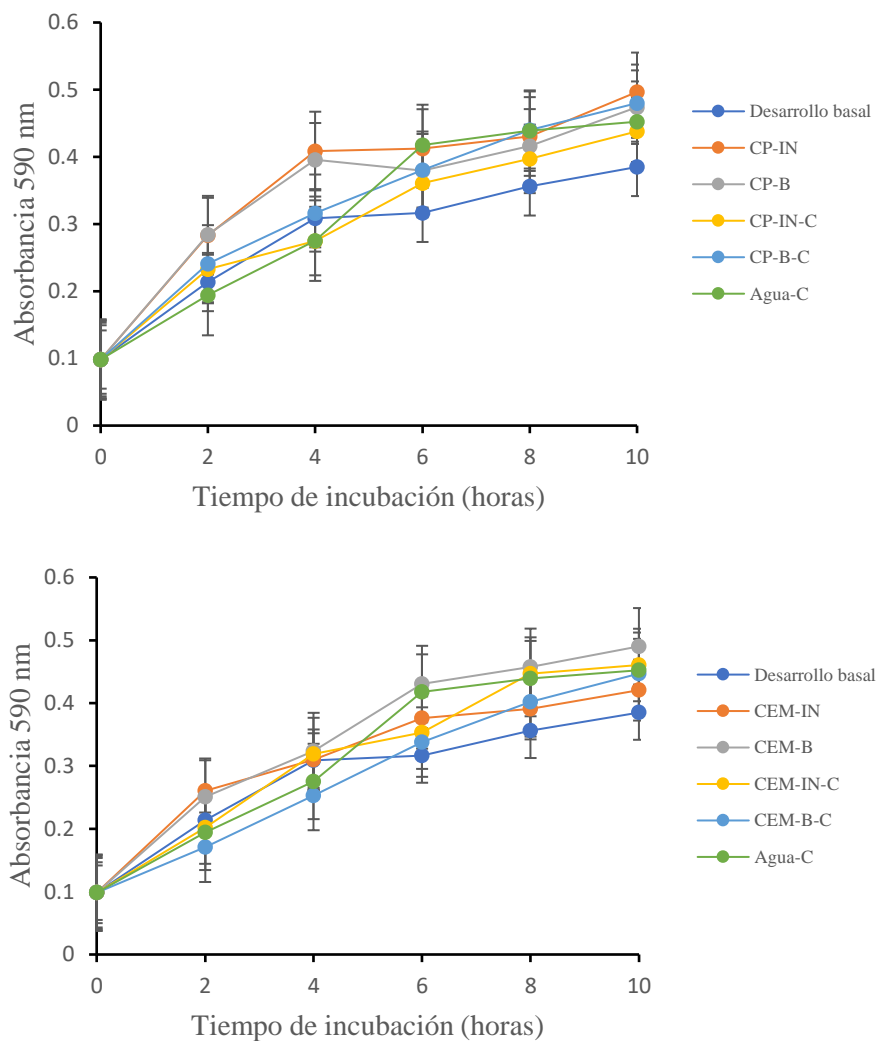
La cepa de *S. enterica*/Typhimurium ATCC14028 mostró una inhibición significativa del crecimiento al incubarse en presencia de los liofilizados de cultivos en CP basal e inducido.

La misma cepa también presentó un retraso significativo del crecimiento al incubarse con los concentrados de los cultivos en CEM (Fig. 13). No obstante, hacia las 8 horas de incubación los cultivos con los extractos alcanzan los mismos niveles de crecimiento en los cultivos control.



**Figura 13.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica*/Typhimurium ATCC14028 (ST19) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CP-IN-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

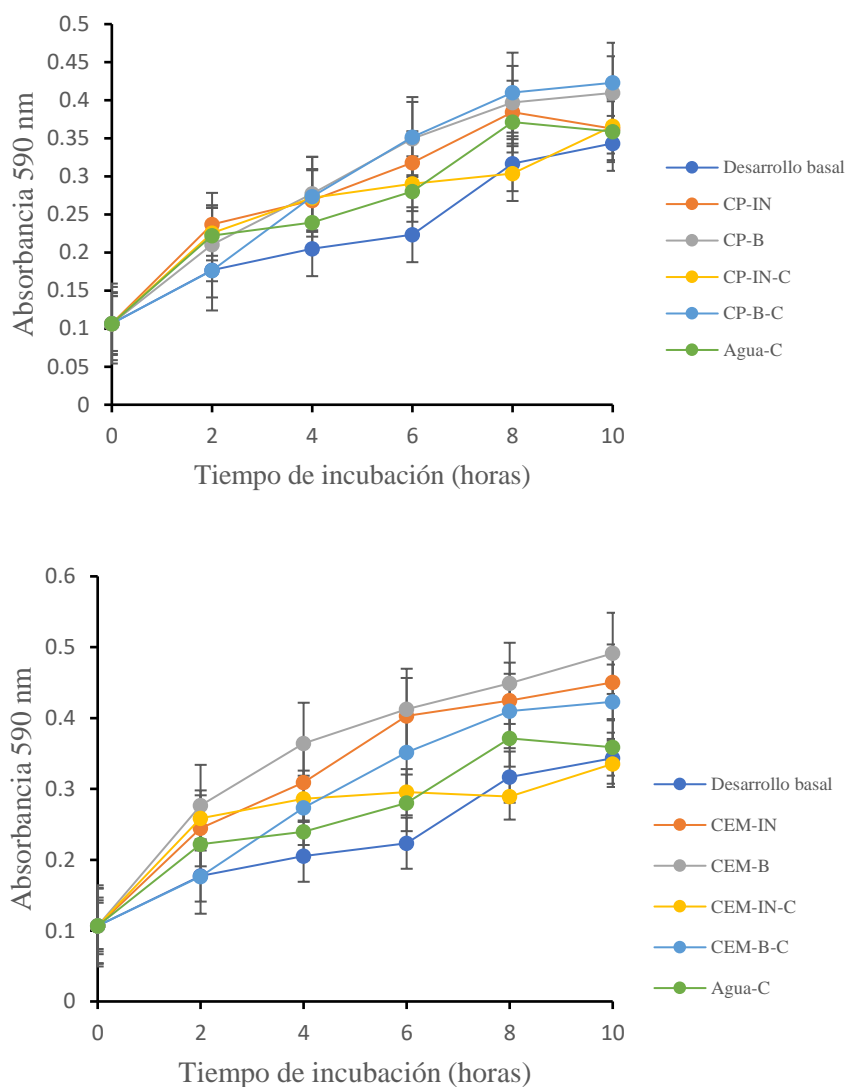
La cepa de *S. enterica*/Typhimurium SAL004 (ST19) no presentó una inhibición significativa del crecimiento con los liofilizados probados. En este caso se presentó una estimulación en el crecimiento con respecto al cultivo control durante todo el periodo de incubación con los concentrados de ambos medios de cultivo, basales e inducidos (Fig.14).



**Figura 14.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica*/Typhimurium SAL004 (ST19) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

La cepa SAL115 de *S. enterica*/Typhimurium no presentó sensibilidad a los liofilizados de los medios CP y CEM probados, ya que también en esta cepa se observó una estimulación

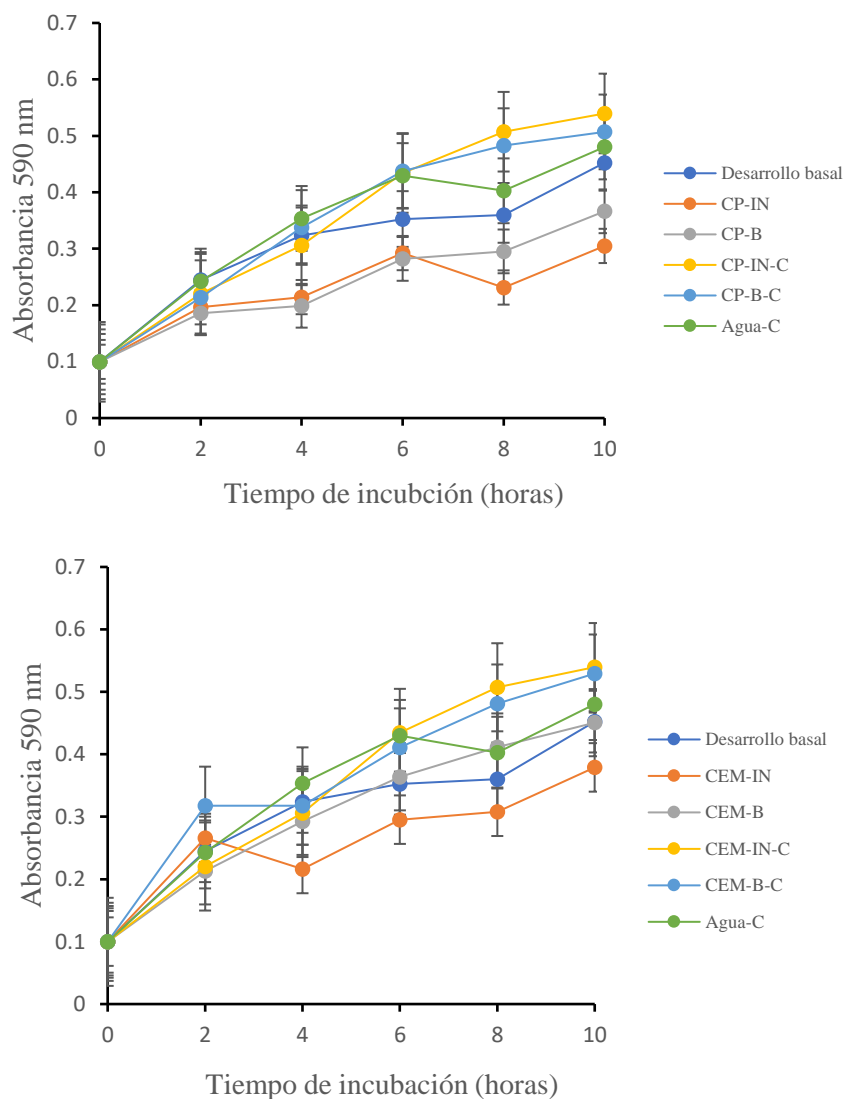
en el desarrollo de la bacteria con los concentrados de los cultivos del hongo en estudio, en relación con sus controles respectivos (Fig.15).



**Figura 15.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica*/Typhimurium SAL115 (ST19) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

La cepa de referencia *E. coli* enterotoxigénica (ETEC-ST) presentó inhibición significativa del crecimiento con los concentrados de cultivos de CP basal e inducido. Esta cepa también

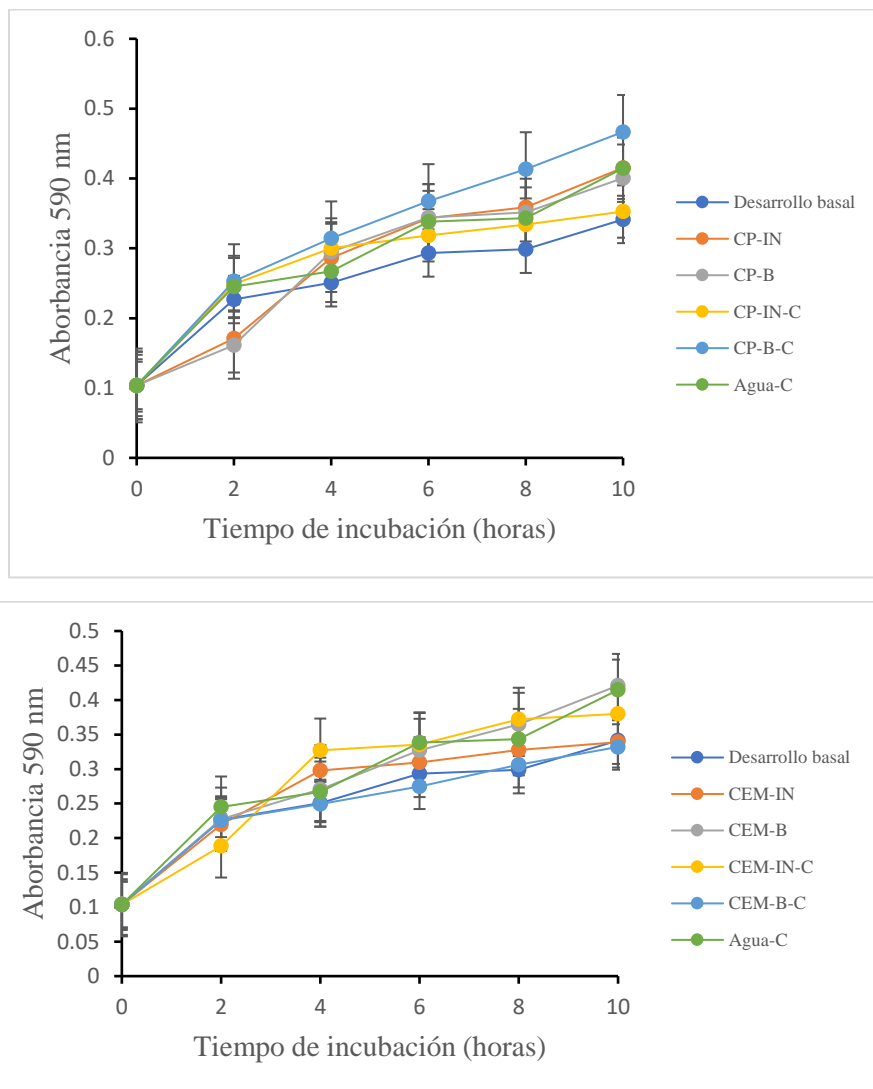
presenta sensibilidad significativa al liofilizado del cultivo en CEM inducido, pero en presencia de los otros concentrados se estimula el crecimiento de la bacteria (Fig. 16).



**Figura 16.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC-ST) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

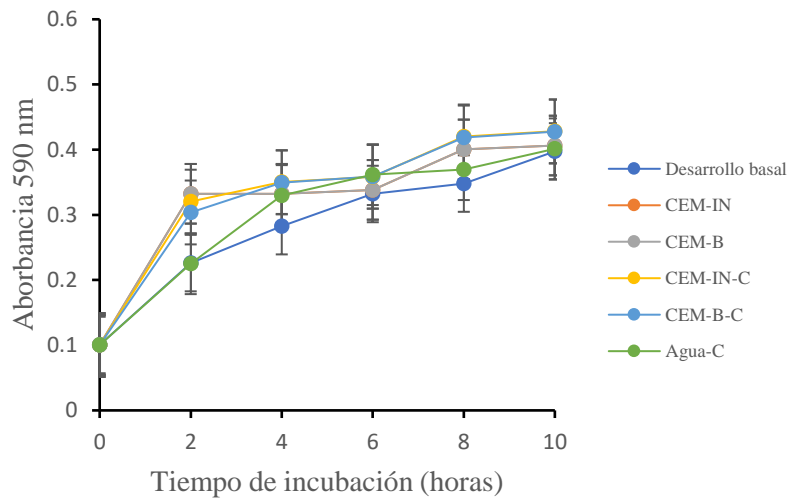
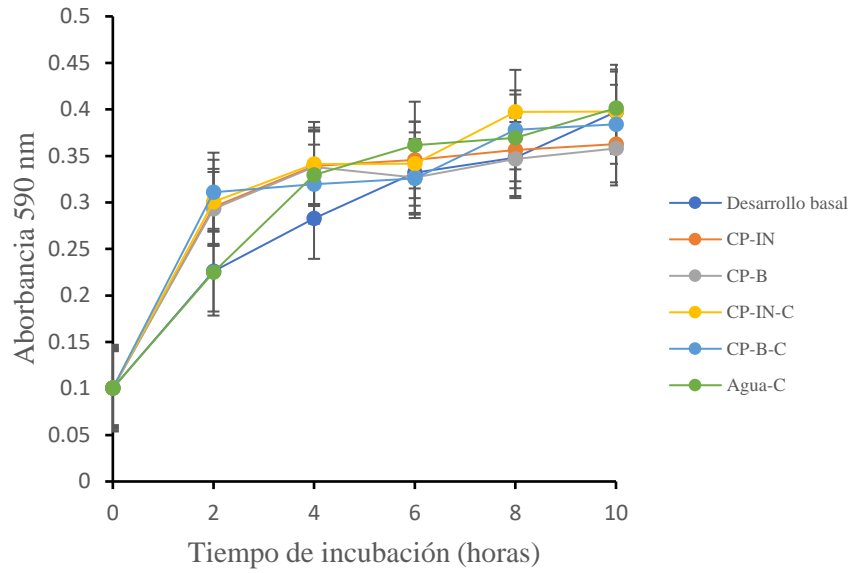
La cepa de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) presentó una inhibición significativa en presencia de los concentrados del cultivo en CP basal e inducido a las 2 horas de incubación. No obstante, en las siguientes horas se observó una estimulación del crecimiento de la bacteria

con respecto al cultivo control. En el caso de los concentrados de cultivos de CEM, en ambos casos se observa una estimulación en el desarrollo de la bacteria (Fig.17).



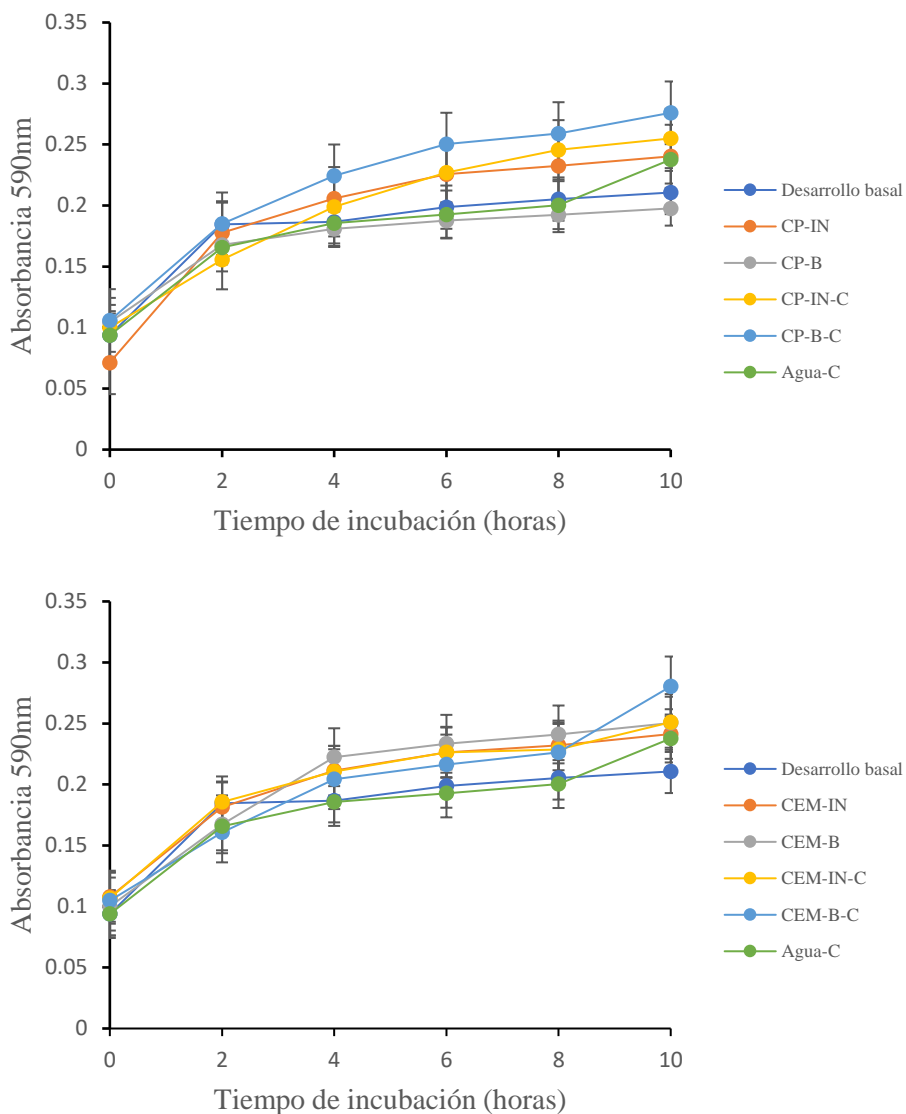
**Figura 17.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteroinvasiva (ATCC EIEC) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

La cepa de referencia *E. coli* enteropatógena EPEC no presentó una inhibición significativa en presencia de ninguno de los concentrados de prueba (Fig. 18).



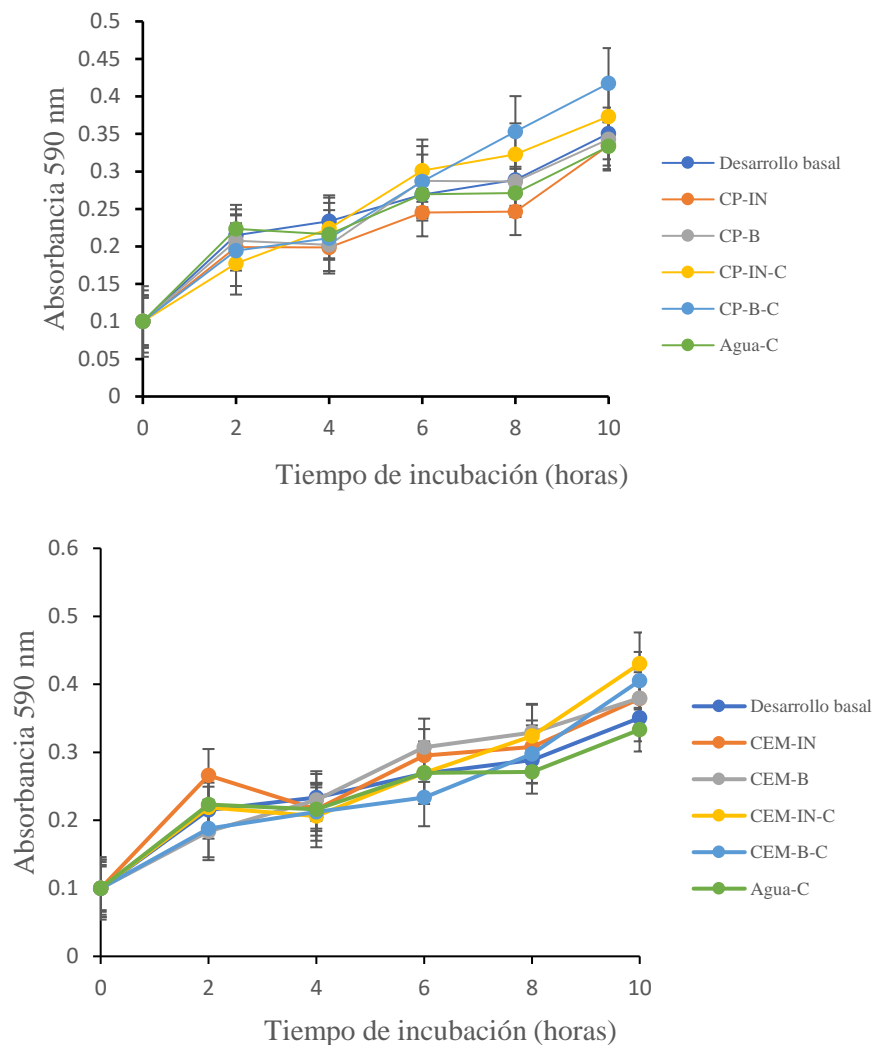
**Figura 18.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteropatogena (EPEC) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

La cepa de *E. coli* uropatógena tampoco presentó una sensibilidad significativa al ser incubada con los diferentes liofilizados del medio extracelular de la cepa CMU-196 (Fig. 19).



**Figura 19.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

La cepa de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC-LT-ST) presentó una inhibición significativa con el liofilizado del cultivo en CP inducido. En el caso del concentrado del cultivo en CP basal, únicamente presentó un retraso significativo del crecimiento a las 4 horas de incubación. No se observó inhibición con los concentrados de cultivos en CEM basal e inducido (Fig. 20).

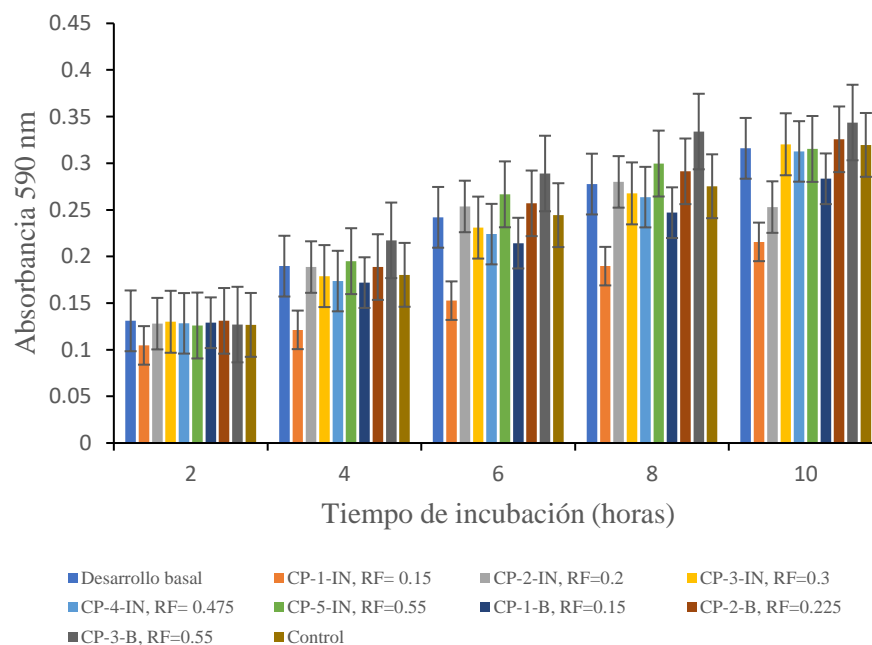


**Figura 20.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC-LT-ST) en presencia de los concentrados de cultivos basales e inducidos en caldo extracto de malta (CEM-B, CEM-IN) y caldo peptona (CP-B, CP-IN) de la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. Se muestra también las cinéticas de los controles de cada medio de cultivo basal (CEM-B-C, CP-B-C) e inducido (CEM-IN-C, CEM-B-C), así como el desarrollo con un control donde se agregó agua (Agua-C).

### 9.1. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de 96 pozos a partir de las bandas recuperadas de la cromatografía en capa fina

Se recuperaron las bandas visualizadas en los ensayos de cromatografía en capa fina de los concentrados obtenidos, como se describe en Materiales y Métodos. Se recuperaron cinco bandas del liofilizado de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona inducido con factores de retención de 0.15, 0.2, 0.3, 0.475 y 0.55, y tres bandas de cultivos basales con factores de retención de 0.15, 0.225 y 0.55. En el caso de cultivos de la cepa CMU-196 en CEM se recuperaron cuatro bandas tanto del cultivo basal como del inducido, con factores de retención idénticos de 0.15, 0.325, 0.45 y 0.55. Se probó la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en las bandas recuperadas con las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* ATCC, *S. enterica*/Typhimurium 14028, SL004 y SL113 también con la cepa de *E. coli* uropatógena.

Se observó una inhibición significativa en el crecimiento de la cepa de *S. aureus* resistente a meticilina con el compuesto con un factor de retención de 0.15 (CP-1-IN, CP-1-B, CEM-IN, CEM-B) de cultivos en CP y CEM basales e inducidos (Fig. 21).



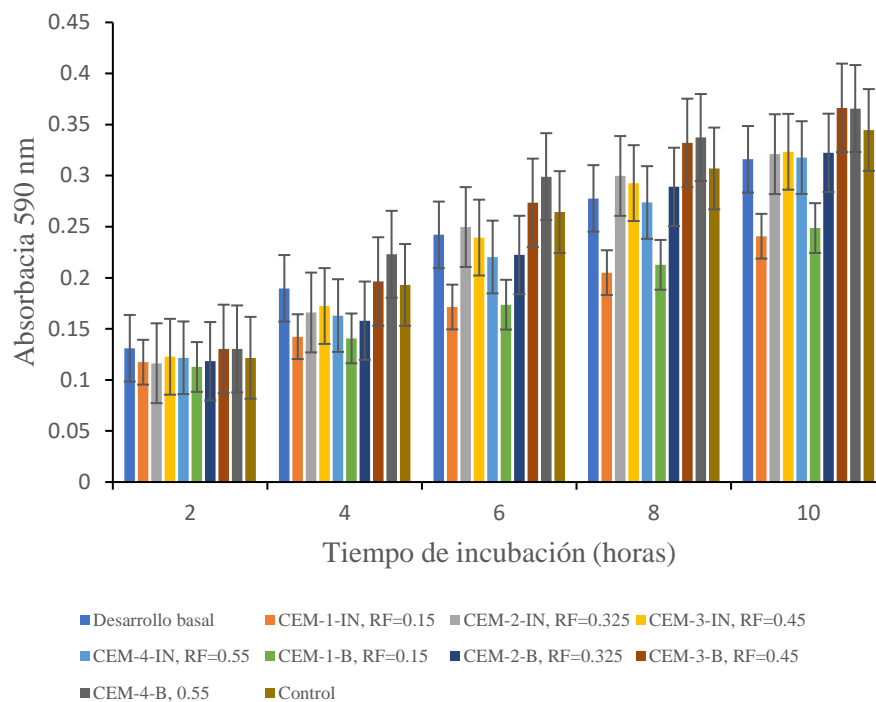
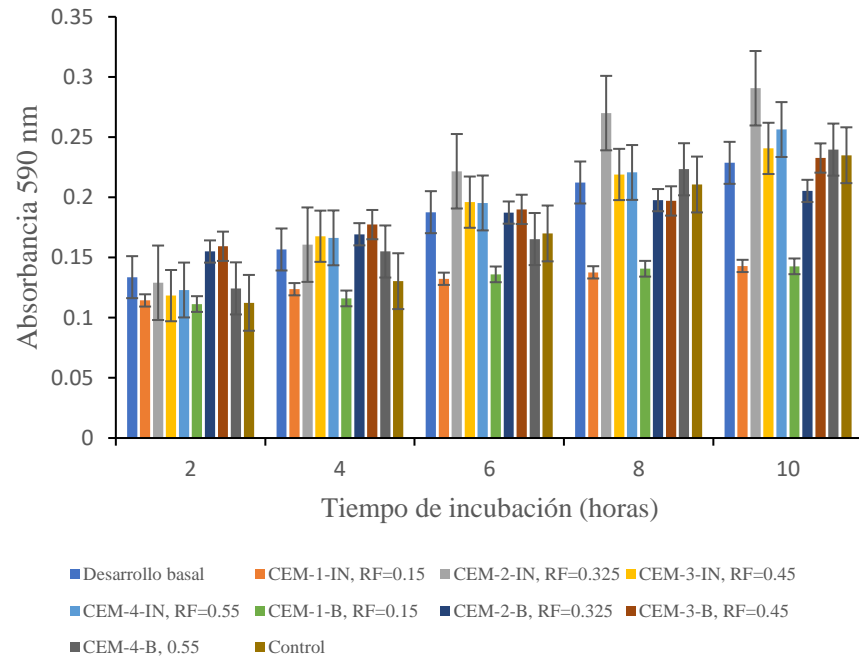
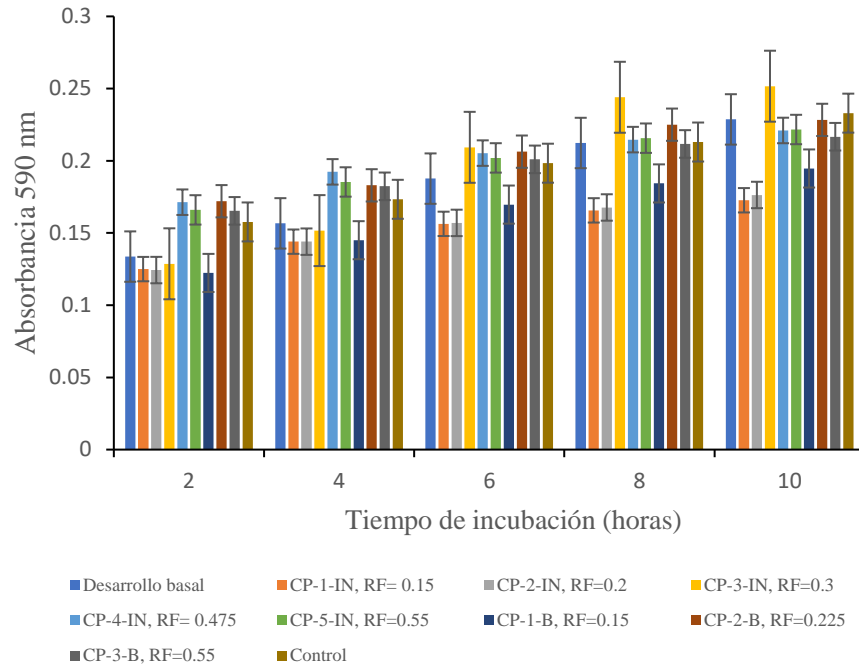


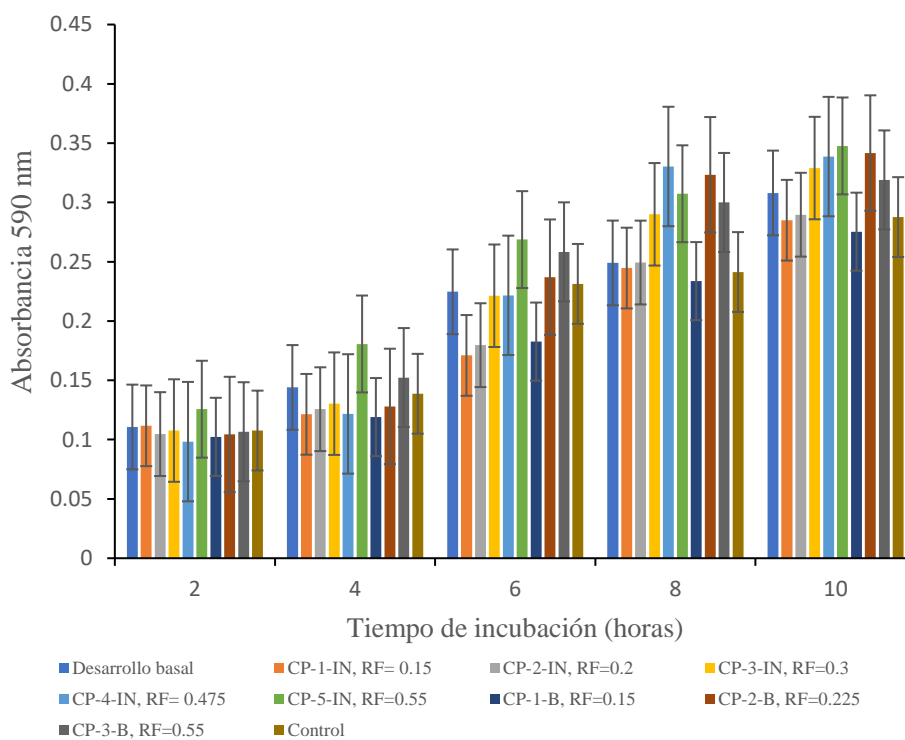
Figura 21. Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido.

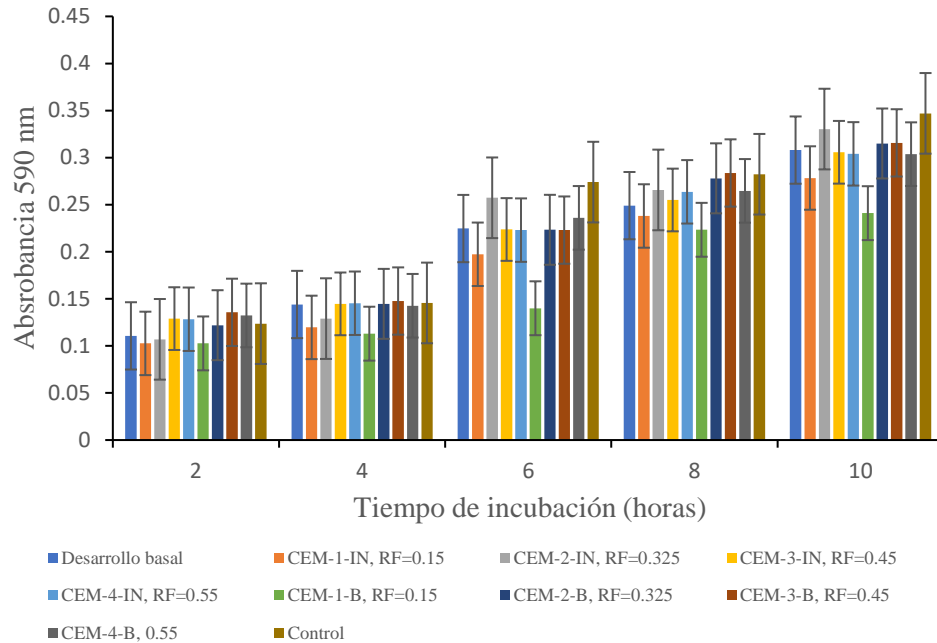
La cepa de *S. aureus* ATCC presentó sensibilidad significativa a los compuestos del liofilizado del cultivo de la cepa en estudio en CP inducido con factores de retención de 0.15 y 0.2. Esta cepa también presenta inhibición significativa del crecimiento al compuesto del cultivo en CP basal presente en la banda con un factor de retención de 0.15. En las bandas recuperadas del liofilizado de CEM se presenta una inhibición significativa del compuesto presente en la banda con un factor de retención de 0.15 en cultivos basal e inducido (Fig. 22).



**Figura 22.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido.

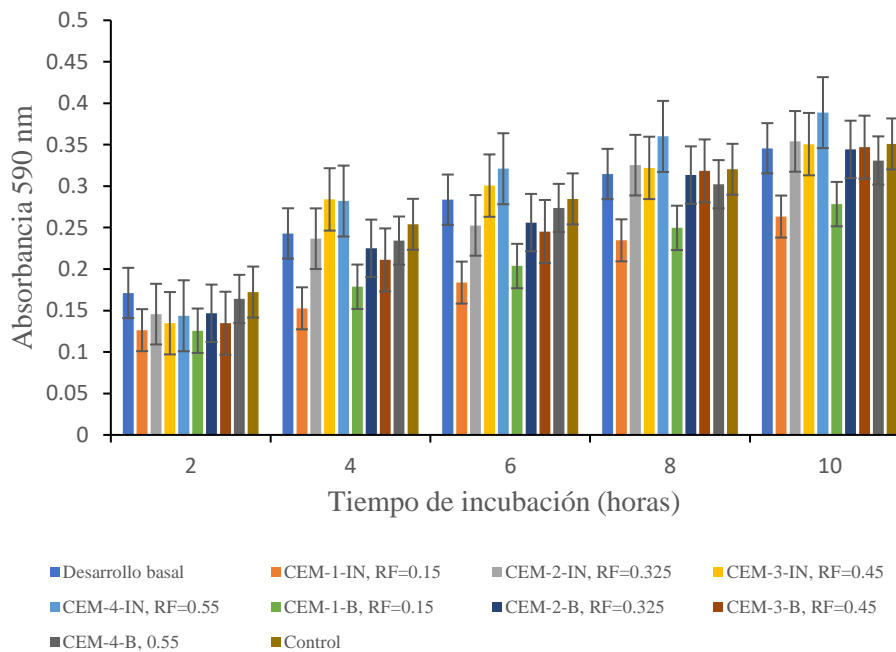
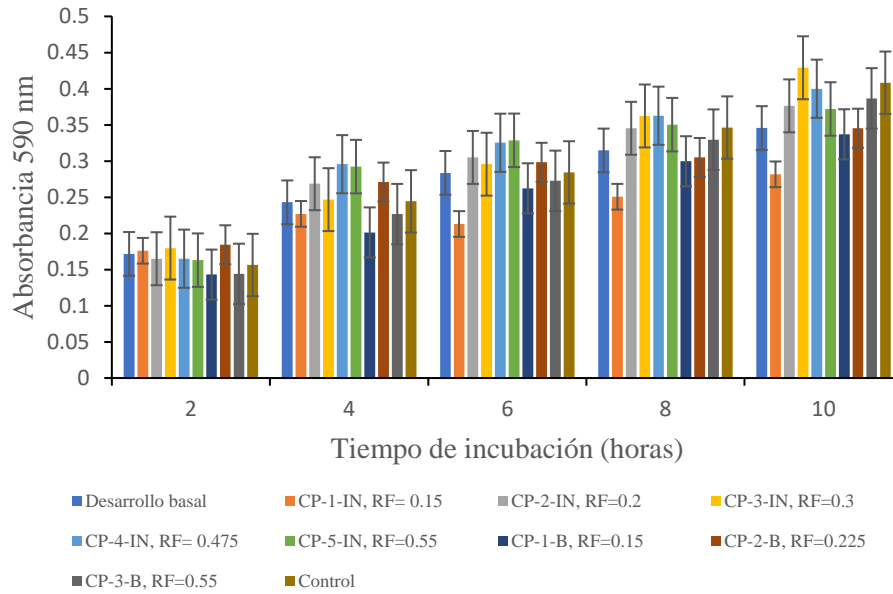
La cepa de *S. enterica*/Typhimurium ATCC 14028 (ST19) presentó una inhibición significativa a los compuestos del liofilizado de cultivos en CP inducido en las bandas con un factor de retención de 0.15 y 0.2 a las 4, 6, y 10 horas de incubación. Además, presenta una inhibición al compuesto del cultivo en CP basal en la banda un factor de retención de 0.15 a partir de las 4 horas. También presenta una inhibición significativa con los compuestos del liofilizado de los cultivos en CEM basal e inducido, específicamente con el compuesto presente en la banda con factor de retención de 0.15 a las 4, 6 y 10 horas de incubación (Fig. 23).





**Figura 23.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Salmonella enterica*/Typhimurium ATCC 14028 (ST19) en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido.

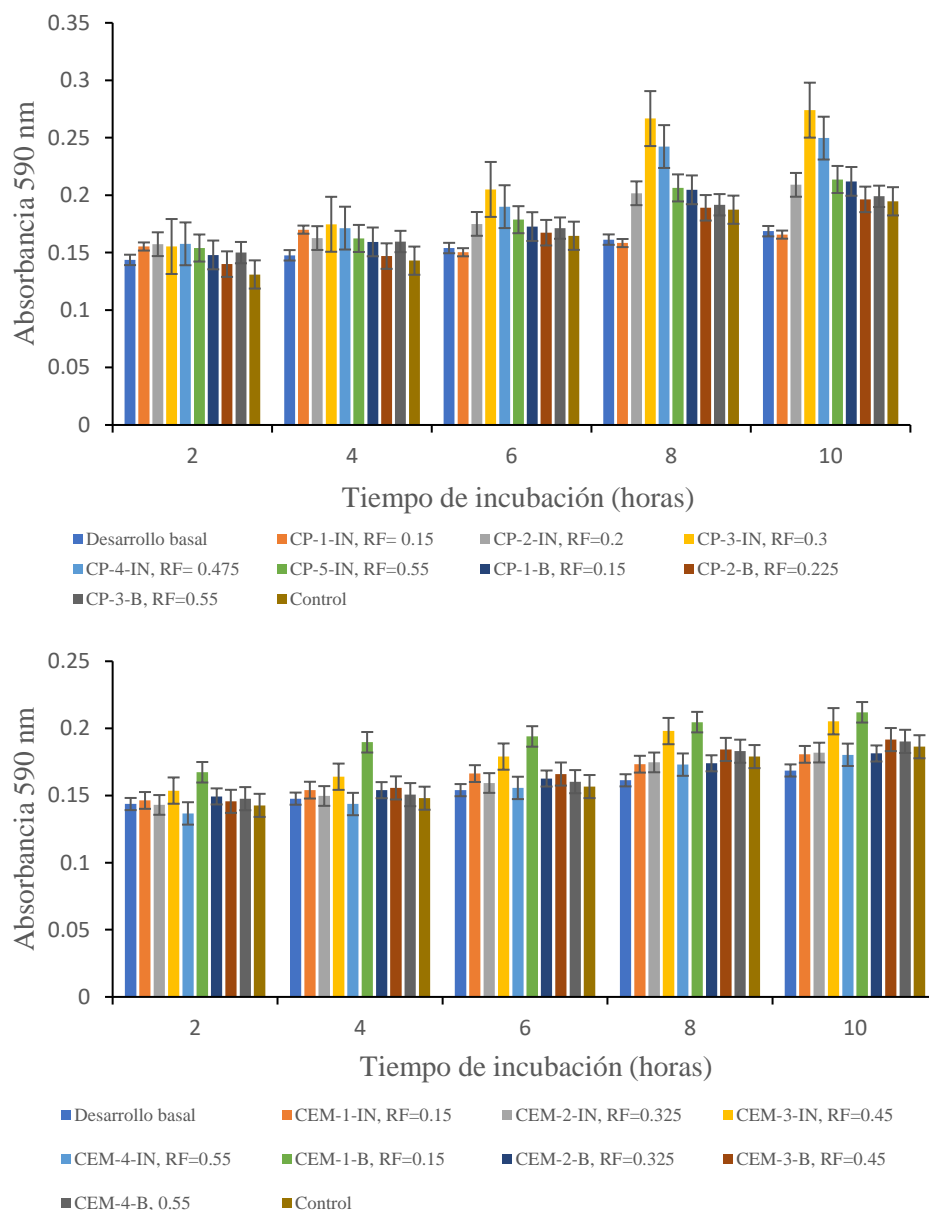
La cepa de *S. enterica*/Typhimurium SL004 (ST19) presentó una inhibición significativa del crecimiento a partir de las 6 horas de incubación con el compuesto del liofilizado del cultivo en CP inducido presente en la banda con un factor de retención de 0.15, y durante todo el periodo de incubación con la banda del mismo factor de retención presente en el cultivo CP basal. También se observó una inhibición significativa con el compuesto de la banda con factor de retención de 0.15 del liofilizado de cultivos en CEM basal e inducido (Fig. 24).



**Figura 24.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Salmonella enterica*/Typhimurium SL004 en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido

La cepa *S. enterica*/Typhimurium SL113 (ST213) no presentó una inhibición significativa del crecimiento con los liofilizados de la cepa CMU-196. En contraste, se observó una

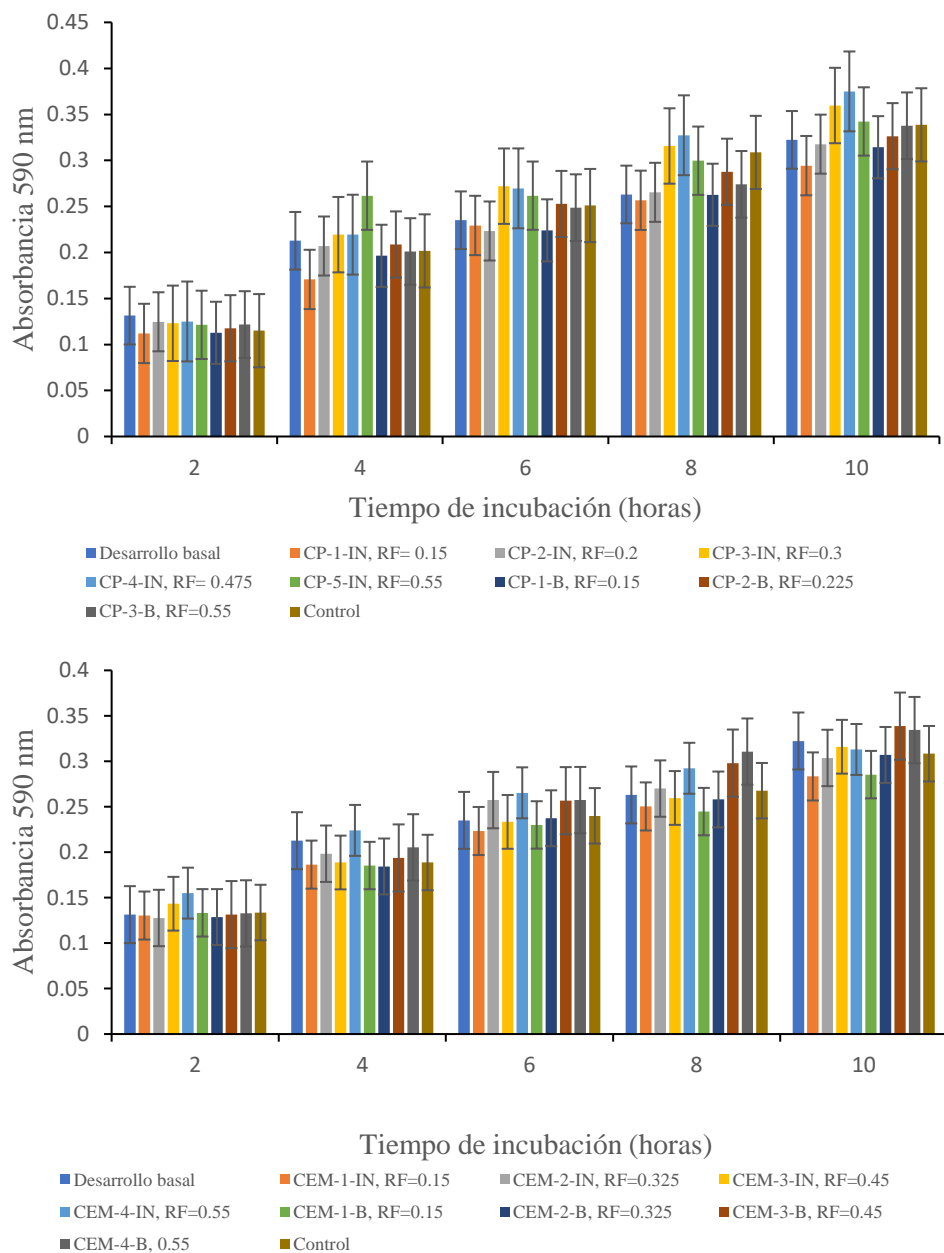
estimulación del crecimiento por parte de algunos compuestos del liofilizado del cultivo en CP inducido, en las bandas con factores de retención de 0.2, 0.3 y 0.475 (Fig. 25).



**Figura 25.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Salmonella enterica*/Typhimurium SL113 (ST213) en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido.

La cepa de *E. coli* uropatógena presentó inhibición significativa del crecimiento con el compuesto del liofilizado del cultivo en CP inducido presente en la banda con un factor

de referencia de 0.15 a las 2, 4 y 10 horas de incubación. En el caso del compuesto con factor de retención idéntico, presente en el cultivo en CP basal se observó retraso del crecimiento durante las primeras 4 horas de incubación. También presentó inhibición significativa con los compuestos en la banda con factor de referencia de 0.15 obtenidos del liofilizado de cultivos en CEM basal e inducido a las 4 y 10 horas (Fig. 26).



**Figura 26.** Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *Escherichia coli* uropatógena en presencia de los compuestos presentes en las bandas recuperadas mediante el desarrollo de cromatografía en capa fina de los liofilizados extracelulares de cultivos de la cepa CMU-196 en caldo peptona y caldo extracto de malta basal e inducido.

## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió a la cepa silvestre CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. con relación a su potencial para producir metabolitos extracelulares con actividad antimicrobiana. Debido a que se encuentra ampliamente documentado que tanto la composición del medio de cultivo como las condiciones de incubación pueden influir en el desarrollo del micelio fúngico, ocasionando diferencias morfológicas y variaciones en la producción de biomasa (VanderMolen *et al.*, 2013), se evaluó inicialmente el crecimiento del micelio vegetativo de la cepa CMU-196 en distintos medios de cultivo líquidos. Se observó un desarrollo totalmente diferente de la cepa CMU-196 en el medio caldo extracto de malta con relación al medio de caldo peptona, incluyendo distintas morfologías miceliales, patrones de pigmentación y cantidad de biomasa producida. Una de estas particularidades fue la formación de *pellets* o agregados de micelio de la cepa CMU-196 cuando se cultivó en caldo extracto de malta, lo cual es de relevancia biotecnológica para la producción de metabolitos extracelulares.

Debido al interés biotecnológico en los rendimientos de producción de metabolitos y proteínas a escala industrial, en las últimas décadas se han desarrollado diversos estudios para abordar la relación entre la morfología de *pellets* miceliales y la producción de sustancias durante el cultivo líquido (Zhang *et al.*, 2016; Veiter *et al.*, 2018). En los cultivos fúngicos en fermentación sumergida, el micelio puede formar distintas morfologías macroscópicas, incluyendo hifas dispersas, *pellets* compactos, o intermedios entre estos dos tipos de crecimiento denominados agregados laxos o *loose clumps* en inglés. Estas morfologías son el resultado de distintos fenómenos de interacción entre hifas, esporas y otras estructuras de propagación o resistencia que se forman en cultivo líquido. La formación de *pellets* de micelio en medio líquido se ha distinguido en procesos de asociación coagulativos y no-coagulativos. En el primer caso, la agregación se presenta cuando en un inóculo a base de esporas, estas se aglomeran debido tanto a las atracciones electrostáticas y puentes salinos entre los polisacáridos, como a la hidrofobicidad de las proteínas de la superficie de la pared celular (Veiter *et al.*, 2018). Así, la germinación de esporas de un mismo conglomerado origina la presencia de *pellets* de micelio en el desarrollo del cultivo (Dynesen y Nielsen, 2003). La formación de gránulos no-

coagulativos se origina cuando las esporas del inóculo permanecen dispersas durante la germinación, y la aglomeración se produce entre las hifas ramificadas en las últimas etapas de crecimiento, por lo que una sola espora puede formar un *pellet* (Zhang *et al.*, 2016).

Como en este trabajo no se utilizaron esporas como inóculo, los modelos anteriores no aplican para la formación de pellets en la cepa CMU-196. No obstante, se ha observado que el micelio puede inducir *pellets* tanto por mecanismos de coagulación como de no-coagulación, como en el caso de *Penicillium chrysogenum*, en el que diferentes componentes de las hifas llevan a la agregación de micelio para la formación de *pellets* (Veiter *et al.*, 2018). Este puede ser el caso de la cepa aquí estudiada. Tanto la formación de *pellets* como el crecimiento en forma disgregada del micelio en cultivo líquido presentan ventajas y desventajas desde el punto de vista biotecnológico. El micelio agregado en *pellets* presenta una mayor resistencia al estrés y una menor viscosidad en biorreactores de producción a mayor escala (Gibbs *et al.*, 2000; Kaup *et al.*, 2008). Sin embargo, el micelio en el interior de los *pellets* se encuentra sujeto a una baja tensión de oxígeno, lo que limita el crecimiento y metabolismo, limitando a su vez la producción de enzimas y metabolitos (Driouch *et al.*, 2010). El micelio disperso o no agregado presenta un rápido crecimiento, sin limitaciones para el transporte de nutrientes (Kurt *et al.*, 2018; Veiter *et al.*, 2018), pero la desventaja es que el medio presenta una viscosidad más alta, tiene limitaciones en la transferencia de masa gas-líquido y la biomasa es más susceptible al estrés total en comparación con los gránulos de *pellets* (Kurt *et al.*, 2018; Veiter *et al.*, 2018).

Las diferencias morfológicas entre los cultivos de CMU-196 en distinto medio de crecimiento no han sido reportadas previamente dentro de las especies del género *Paraconiothyrium*. Debido su gran relevancia en la producción de metabolitos secundarios a escala de laboratorio, el análisis de las variables que influyen en la morfología en fermentación líquida es de relevancia en dicho taxón, previendo la necesidad de escalar el volumen de cultivo con fines biotecnológicos. En ese sentido, entre las variables que se han evaluado en cepas de relevancia biotecnológica para conocer su efecto en la morfología micelial en cultivos líquidos se encuentran la fuente de carbono y su concentración (Papagianni *et al.*, 1999), la presencia de iones metálicos (especialmente manganeso) (Berovic *et al.*, 2006), el pH (Veiter *et al.*, 2018), la adición de surfactantes (Liu *et al.*, 2012), el aumento de la tensión de oxígeno (Wongwicharn *et al.*, 1999), la agitación

(Papagianni, 2007) y la osmolaridad (Wucherpfennig *et al.*, 2011), entre otros. Una perspectiva interesante de evaluar a futuro en la cepa CMU-196 con la finalidad de optimizar las condiciones para la producción de metabolitos extracelulares.

Otro fenómeno observado en el cultivo de la cepa CMU-196 en medio caldo peptona es la pigmentación del micelio de una tonalidad un café oscuro. Es común que la pigmentación en tono oscuro del micelio fúngico se asocie con la producción de melanina (Cordero y Casadevall, 2015), pigmento de alto peso molecular, hidrofóbico y con carga negativa, formado por la polimerización de fenoles y/o indoles (Nosanchuk *et al.*, 2015). La melanina fúngica se ha asociado a diversas funciones entre las que se incluyen la fotoprotección, la resistencia a la desecación, la termoregulación y resistencia a temperaturas extremas, la resistencia al estrés químico y mecánico, así como la unión y resistencia a metales, entre otras (Cordero y Casadevall, 2015). De manera interesante, una de las dos rutas de biosíntesis de melanina descritas en hongos involucra la polimerización de un intermediario de 1, 8-dihidroxi-naftaleno (DHN), cuya síntesis inicia con la condensación de acetil-coA o malonil-coA mediada por una policétido sintasa (PKS) (Eisenman y Casadevall, 2012). Se ha documentado que en *Aspergillus nidulans* la PKS responsable de la síntesis de DHN también produce nafto- $\gamma$ -pirona (Chiang *et al.*, 2011); las pironas son metabolitos con actividad antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena, entre otras (Choque *et al.*, 2015). Existe una estrecha relación entre la biosíntesis de melanina y la producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular. No obstante, no se ha documentado plenamente dicha relación en términos de los mecanismos moleculares que la regulan. En este trabajo se observó que el desarrollo de la cepa CMU-196 en el medio en el cual se observa la melanización, se secreta un mayor número de metabolitos secundarios, como lo mostraron los ensayos de cromatografía en capa fina.

La cepa CMU-196 presenta diferencias en la producción de metabolitos secundarios, dependiendo del medio de cultivo en el que se incubó. Dichas diferencias son atribuibles a las fuentes de nitrógeno y carbono, así como los solutos iónicos presentes en cada medio empleado (Miao *et al.*, 2006). La cepa CMU-196 produjo un mayor contenido de metabolitos secundarios en el medio caldo peptona, como lo sugiere tanto la mayor cantidad de peso del liofilizado obtenido como el número de bandas observadas en la cromatografía de capa fina. Además, en dicho medio se observó una banda adicional

cuando se indujo con biomasa inerte. Estos resultados concuerdan con reportes previos que documentan cambios metabólicos en medios inducidos, en comparación con el mismo medio sin inducir, lo que implica el aumento en la producción de un metabolito, la síntesis de nuevos metabolitos, o ambos fenómenos (Tomm *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se cultivó a la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp., asociada a la especie *P. brasilense* (Arredondo-Santoyo *et al.*, 2019), en presencia de células inactivadas mediante esterilización de una cepa clínica de *S. enterica*. Mientras que en el ensayo en sensidisco con el concentrado extracelular crudo no se pudo observar inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas de prueba. En los ensayos en medio líquido en micropozos se observaron resultados diversos, dependiendo del medio de cultivo en el que se creció la cepa fúngica de estudio y de la cepa bacteriana. La cepa de *S. aureus* presentó mayor sensibilidad a los concentrados extracelulares que las enterobacterias de prueba. La cepa de referencia de *S. enterica* serotipo Typhimurium (ATCC14028) mostró sensibilidad a los extractos, mientras que las cepas clínicas no. Por otra parte, la cepa de enteroinvasiva (EIEC) fue la más sensible de las cepas de *E. coli* empleadas en el estudio. Además, los extractos del medio CP, particularmente los inducidos, fueron los que mayor actividad presentaron.

Diversos estudios en los que se analiza la actividad antibacteriana de extractos o metabolitos fúngicos emplean cepas bacterianas de colecciones microbianas de referencia, varias de las cuales tienen décadas de aislamiento (Phongpaichit *et al.*, 2006; Yamaç y Bilgili, 2006; Dissanayake *et al.*, 2016; Duvnjak *et al.*, 2016). Además, en la mayoría de los estudios se emplea una sola cepa de cada especie bacteriana de prueba. Por un lado, las especies patógenas de humano y animales están conformadas por distintas poblaciones que varían en características como la virulencia, a las cuales se les denomina serotipos, patotipos o genotipos, dependiendo de la especie bacteriana y la técnica de tipificación (Shi *et al.*, 2015; Messina *et al.*, 2016; Robins-Browne *et al.*, 2016; Schuetz, 2019). Por otra parte, está ampliamente documentado que en especies bien estudiadas de patógenos bacterianos como *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus* han emergido genotipos que presentan características relevantes de salud pública, como mayor virulencia y resistencia a antibióticos (Karmali, 2017; Elnekave *et al.*, 2018; Abd El-Hamid *et al.*, 2019; Aijuka and Buys, 2019; Monte *et al.*, 2019). Por lo anterior, en el presente trabajo se emplearon,

además de cepas de referencia, cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, así como diferentes patotipos de *E. coli*. La variación de los resultados de inhibición de las bandas recuperadas de los ensayos de cromatografía en capa fina muestra la relevancia del uso de cepas clínicas/ambientales, y de distintos genotipos/patotipos para probar la actividad antimicrobiana. Este trabajo muestra que es necesario el uso de cepas/genotipos/patotipos específicos(as) para la realización de pruebas antimicrobianas de extractos y metabolitos obtenidos de fuentes naturales, con la finalidad de validar dicha actividad contra variantes de un mismo patógeno. Esto es particularmente relevante para variantes emergentes de especies bacterianas de gran relevancia en salud pública a nivel global y/o local.

La variación en la actividad antibacteriana entre los extractos provenientes de distinto medio de cultivo es acorde con la variación en la producción de metabolitos extracelulares dependiendo del medio de cultivo ampliamente documentada en hongos (Teoh *et al.*, 2012; Zárate-Chaves *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2021). Esta variación se debe en gran medida a la regulación transcripcional diferencial ejercida por distintas fuentes de C y N sobre clusters de genes del metabolismo secundario (Brakhage, 2013). Esta regulación diferencial se realiza vía la activación/inactivación de reguladores transcripcionales como como Cre1 en el caso de fuentes de carbono y AreA en el caso de fuentes de nitrógeno (Brakhage, 2013). A futuro es posible incrementar la cantidad y diversidad de metabolitos producidos por la cepa CMU-196 utilizando herramientas estadísticas para la optimización de los componentes del medio, como el diseño Plackett-Burman o Box-Behnken (Teoh *et al.*, 2012), o bien emplear biomasa residual vegetal (Pu *et al.*, 2021), o bien una combinación de ambas estrategias.

Se ha reportado que una cepa de *Paraconiothyrium variable* aislada como endófito foliar del árbol de las coníferas *Cephalotaxus harringtonia* secreta el sesquiterpeno 4-epi-microsaeropsisina (eremofilano), el cual es transformado en dihidrofurano-2(1H)-naftalenona (variabilona 2) en el ambiente ácido extracelular y es activo contra una cepa de *Bacillus subtilis* aislada del mismo ambiente foliar que el hongo (Amand *et al.*, 2017). De la misma cepa se obtuvo el sesquiterpeno de ácido graso 13-oxo-9,11-octadecadienoico del grupo de las oxilipinas (Combès *et al.*, 2012), del cual se ha reportado actividad contra las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *B. brevis* y *S. aureus*, pero no contra

*Micrococcus luteus* ni la especie Gram negativa *Enterobacter dissolvens* (Weber et al., 2006; Trapp et al., 2015). Esta cepa fúngica también produce el policétido nivefuranona A, activo contra *Bacillus subtilis* (Vallet et al., 2017), y que además se ha probado su actividad contra *Staphylococcus aureus*, pero no hacia *Pseudomonas aeruginosa* (Shiono et al., 2012). La nivefuranona A se obtuvo de la zona de interacción entre *B. subtilis* y la cepa *P. 53variable* de un ensayo de competencia *in vitro* en medio sólido (Vallet et al., 2017), lo que sugiere que es un metabolito extracelular.

De una cepa de *Paraconiothyrium* filogenéticamente relacionada con *P. hawaiiensis*, aislada de los tallos de la planta *Laguncularia racemosa* se caracterizó la producción de la furanona graminina B en extractos acetónicos del micelio junto con el medio de cultivo líquido en el que el hongo se incubó (Almeida et al., 2014). Dicho metabolito presentó actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *S. aureus* resistente a meticilina pero no presentó actividad contra las bacterias Gram negativas *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, ni contra los hongos *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. De manera interesante, la graminina B no resultó activa contra una segunda cepa de *E. coli* (Almeida et al., 2014), lo que coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo, en donde se observaron resultados contrastantes entre las distintas cepas de *E. coli* y *S. enterica* empleadas en los ensayos de inhibición. El extracto metanólico del micelio de una cepa no identificada de *Paraconiothyrium* aislada del alga marina *Chondrus ocellatus* produce cinco policétidos del tipo ácido paralactónico, de los cuales solo el ácido paralactónico E presentó actividad moderada contra *Staphylococcus aureus* pero no contra *Pseudomonas aeruginosa* ni contra los hongos *C. albicans* y *Aspergillus clavatus* (Suzuki et al., 2019).

De manera interesante, compuestos relacionados con la nivefuranona A previamente mencionada, como los policétidos pafuranonas A y B, así como la 7,8-dihidronivefuranona A, obtenidos de una cepa de *Paraconiothyrium* sp. aislada del alga marina *Enteromorpha prolifera*, no presentaron actividad contra *S. aureus* ni *P. aeruginosa*; así mismo, en contraste con el estudio anterior en el que se observó actividad contra *B. subtilis*, tampoco la nivefuranona A obtenida de esta cepa resultó activa contra dichas especies bacterianas (Du et al., 2019). El interés por caracterizar los metabolitos producidos por esta última cepa de *Paraconiothyrium* sp. surgió de la actividad antibacteriana observada en el extracto

orgánico de esta (Du *et al.*, 2019), lo que contrastó con el resultado de los metabolitos caracterizados. Los autores del trabajo no establecen si la actividad el extracto se debe a la presencia de otros metabolitos no caracterizados o a la acción sinérgica en el extracto de los metabolitos caracterizados. Los resultados de Du *et al.* (2019) coinciden con los resultados del presente trabajo en donde se observó que varias de las bandas obtenidas en los ensayos de cromatografía en capa fina no presentaron actividad antibacteriana. Más aún, la cromatografía en capa fina del extracto extracelular de la cepa CMU-196, y los correspondientes ensayos de actividad antimicrobiana de cada banda, muestran que dicho extracto presenta una mezcla de metabolitos, algunos de los cuales no tienen efecto sobre las bacterias patógenas de prueba, otros inhiben el crecimiento de éstas y un tercer grupo estimula el crecimiento bacteriano. Así, la actividad del extracto está determinada por el balance concentración/potencia de la actividad biológica de los distintos compuestos presentes en este, de ahí la relevancia de realizar estudios con fracciones o compuestos purificados, lo que sería el siguiente paso en el estudio de la cepa CMU-196. No obstante, el presente trabajo muestra que una técnica relativamente simple y barata como la cromatografía en capa fina aquí empleada, permite realizar una caracterización inicial de la actividad biológica de los metabolitos mayoritarios en el medio extracelular de una cepa fúngica.

Hasta donde se pudo documentar durante la realización del presente trabajo, en ninguno de los estudios previamente comentados en los que se analiza la actividad antimicrobiana de extractos o metabolitos de *Paraconiothyrium* spp. se estudia la producción de metabolitos extracelulares inducidos con bacterias inertes. En este sentido, los únicos trabajos en los que se estudian metabolitos extracelulares como respuesta a competencia con otros microorganismos serían los realizados con *Fusarium oxysporum* (Combès *et al.*, 2012) y *B. subtilis* (Amand *et al.*, 2017), pero en dichos trabajos se emplearon cepas ambientales y no una cepa clínica como la de *S. enterica* aquí utilizada. A futuro es necesario empezar a caracterizar los metabolitos presentes en las bandas de cromatografía en capa fina con el objetivo de ver si representan nuevas estructuras con capacidad antibiótica o son moléculas previamente descritas.

## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Los resultados obtenidos muestran que la cepa CMU-196 presenta un desarrollo óptimo de micelio vegetativo en los dos medios de cultivo empleados, alcanzando la fase estacionaria al séptimo día de incubación. Además, se observaron deferencias macro-morfológicas del micelio de la cepa de estudio, que consistieron en la formación de agregados (*pellets*) en cultivo en CEM y un micelio laxo y pigmentado (melanizado) en cultivo en CP.
2. La cepa CMU-196 presenta diferencia en los rendimientos de biomasa de los liofilizados, obteniéndose una mayor cantidad en los cultivos inducidos y en medio CP.
3. La cromatografía en capa fina (TLC) realizada a partir del medio extracelular muestra una mayor producción de metabolitos extracelulares en medio CP inducido con respecto a la condición basal.
4. La banda obtenida de la cromatografía en capa fina con un factor de retención de 0.15 recuperada de los liofilizados de cultivos en CP y CEM basales e inducidos presenta actividad antibacteriana significativa contra cepas multirresistentes a antibióticos.

## 11. CONCLUSIÓN

Los metabolitos extracelulares producidos en el medio de cultivo líquido inducido de la cepa CMU-196 de *Paraconiothyrium* sp. fueron más diversos que los encontrados en el medio basal y presentaron la mayor actividad antibacteriana. Esta actividad es significativamente mayor contra bacterias multirresistentes a antibióticos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hamid, M. I., Bendary, M. M., Merwad, A. M. A., Elsohaby, I., Mohammad Ghaith, D., Alshareef, W. A. (2019). What is behind phylogenetic analysis of hospital-, community-and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?. *Transboundary and Emerging Diseases*. 66(4): 1506-1517.
- Ahuja I., Kissen R., Bones A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*. 17(2): 73–90.
- Aijuka, M., Buys, E. M. (2019). Persistence of foodborne diarrheagenic *Escherichia coli* in the agricultural and food production environment: implications for food safety and public health. *Food Microbiology*. 82: 363-370.
- Allcock S., Young E. H., Holmes M., Gurdasani D., Dougan G., Sandhu M. S., Török M. E. (2017). Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. *Global Health, Epidemiology and Genomics*. 2: e4.
- Alós J.I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33(10): 692–699.
- Alós J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(5): 290–297.
- Almeida, C., El Aouad, N., Martin, J., Perez-Victoria, I., Gonzalez-Menendez, V., Platas, G., de la Cruz, M., Monteiro, M.C., de Pedro, N., Bills, G. F., Vicente, F., Genilloud, O., Reyes, F. (2014). Graminin B, a furanone from the fungus *Paraconiothyrium* sp. *Journal of Antibiotics*. 67(5): 421-423.
- Amand, S., Vallet, M., Guedon, L., Genta-Jouve, G., Wien, F., Mann, S., Dupont, J., Orcid, S. P., Nay, B. (2017). A reactive eremophilane and its antibacterial 2 (1 H)-naphthalenone rearrangement product, witnesses of a microbial chemical warfare. *Organic Letters*. 19(15): 4038-4041.
- Anisha C., Sachidanandan P., Radhakrishnan E. K. (2018). Endophytic *Paraconiothyrium* sp. from *Zingiber officinale* Rosc. Displays broad-spectrum antimicrobial activity by production of Danthron. *Current Microbiology*: 75(3): 343–352.
- Ancheeva E., Küppers L., Akone S. H., Ebrahim W., Liu Z., Mándi A., Proksch P. (2017). Expanding the metabolic profile of the fungus *Chaetomium* sp. through co-culture with autoclaved *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Organic Chemistry*. 2017(22): 3256–3264.
- Arredondo Santoyo M., Vázquez Garcidueñas M. S., Vázquez Marrufo G. (2018). Identification and characterization of the biotechnological potential of a wild strain of *Paraconiothyrium* sp. *Biotechnology Progress*. 34(4): 846–857.
- Berovic M., Vodopivec M., Milicic S. (2006). The Influence of manganese ions on *Aspergillus niger* biomass and citric acid biosynthesis in repeated fed batch fermentation. *Chem Biochem Eng Q*. 20(3):281–4.
- Besser J. M. (2018). Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*. 71: 55–59.
- Brakhage A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*. 11(1): 21–32.
- Brakhage A. A., Schroeckh V. (2011). Fungal secondary metabolites - Strategies to activate

- silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*. 48(1): 15–22.
- Brodhun F., Feussner I. (2011). Oxylipins in fungi. *FEBS Journal*. 278(7): 1047–1063.
- Calvo J., Martínez-Martínez L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(1): 44–52.
- Casadevall A. (2019). Global catastrophic threats from the Fungal Kingdom. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg, Elsevier.
- Chen S., Zhang Y., Zhao C., Ren F., Liu X., Che Y. (2014). Hawaiiinolides E-G, cytotoxic cassane and cleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense*. *Fitoterapia*. 99(1): 236–242.
- Chiang, Y. M., Meyer, K. M., Praseuth, M., Baker, S. E., Bruno, K. S., & Wang, C. C. (2011). Characterization of a polyketide synthase in *Aspergillus niger* whose product is a precursor for both dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and naphtho- $\gamma$ -pyrone. *Fungal Genetics and Biology*. 48(4): 430-437.
- Choque E., Rayess Y., Raynal J., Mathieu F. (2015). Fungal naphtho- $\gamma$ -pyrones—secondary metabolites of industrial interest. *Applied microbiology and biotechnology*. 99(3): 1081-1096.
- Combès, A., Ndoye, I., Bance, C., Bruzard, J., Djediat, C., Dupont, J., Nay, B., Prado, S. (2012). Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variable* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE* 7(10): e47313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047313>
- Cordero R. J., Casadevall A. (2017). Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews*. 31(2): 99-112.
- Damm U., Verkley G. J. M., Crous P. W., Fourie P. H., Haegi A., Riccioni L. (2008). Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia*. 20: 9–17.
- Davies J., Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología*. 12(1): 9–16.
- Driouch H., Sommer B., Wittmann C. (2010). Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*. 105(6):1058–68.
- Du, Y., Chen, Z., Li, H., Wang, Y., Fu, P., Zhu, W. (2019). Pafuranones A and B, two dimeric polyketides from a rare marine algae-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. *Chinese Chemical Letters*. 30(5): 981-984.
- Dynesen J., Nielsen J. (2003). Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnol Prog*. 19(3):1049–1052.
- Dissanayake, R. K., Ratnaweera, P. B., Williams, D. E., Wijayarathne, C. D., Wijesundera, R. L., Andersen, R. J., de Silva, E. D. (2016). Antimicrobial activities of endophytic fungi of the Sri Lankan aquatic plant *Nymphaea nouchali* and chaetoglobosin A and C, produced by the endophytic fungus *Chaetomium globosum*. *Mycology*. 7(1): 1-8.
- Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016). Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 34: 1-8.
- Eisenman H. C., Casadevall A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3): 931-940.
- Elnekave, E., Hong, S., Mather, A. E., Boxrud, D., Taylor, A. J., Lappi, V., Johnson, T.J., Vannucci, Fabio., Davies, P., Hedberg, C., Perez, A., Alvarez, J. (2018). *Salmonella enterica* serotype 4,[5], 12: i:-in swine in the United States Midwest: an emerging

- multidrug-resistant clade. *Clinical Infectious Diseases*. 66(6): 877-885.
- Fincham J. R. S. (2001). Fungal genetics. *Encyclopedia of Genetics*. University of Edinburgh, Edinburgh, UK. 738.
- Galar A., Weil A. A., Dudzinski D. M., Muñoz P., Siedner M. J. (2019). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Valve Endocarditis: Pathophysiology, Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 32(2): 1–26.
- Gibbs P. A., Seviour R. J., Schmid F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol*. 20(1):17–48.
- Gnonlonfin G. J. B., Sanni A., Brimer L. (2012). Review Scopoletin - A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 31(1): 47–56.
- Grossart H. P., Van den Wyngaert S., Kagami M., Wurzbacher C., Cunliffe M., Rojas-Jimenez K. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*. 17(6): 339–354.
- Guo Z., Ren F., Che Y., Liu G., Liu, L. (2015). New bergamotane sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Molecules*. 20(8): 14611–14620.
- Hammerum A. M., Justesen U. S., Pinholt M., Roer L., Kaya H., Worning P., Holzknecht J. (2019). Surveillance of vancomycin-resistant enterococci reveals shift in dominating clones and national spread of a vancomycin-variable vanA *Enterococcus faecium*. *Euro Surveill*. 24(34): 1-12.
- Hertweck C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie - International Edition*. 48(26): 4688–4716.
- Hewage R. T., Aree T., Mahidol C., Ruchirawat S., Kittakoop P. (2014). One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete sp.* *Phytochemistry*. 108: 87–94.
- Hoffmeister D., Keller N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes and their regulation. *Natural Product Reports*. 24(2): 393–416.
- Hooper D. C. (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 7(2): 337–341.
- Ikegaki M., Negreiros de Carvalho P.L., Oliveira Amaral P., Gois Ruiz A. L., Alencar S. M., Pfenning L. H., Carvalho J., Rosalen L. P. (2012). *Paraconiothyrium sp.* P83F4/1: Antioxidant and antiproliferative activities an endophytic fungus associated with *Rhedia brasiliensis* plant. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. 1(3): 172–176.
- Karmali, M. A. (2017). Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment. *Clinical Infectious Diseases*. 64(3): 371-376.
- Kaup B. A., Ehrich K., Pescheck M., Schrader J. (2008). Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng*. 99(3):491–498.
- Kehr J. C., Picchi D. G., Dittmann E. (2011). Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 7(1): 1622–1635.
- Kelter G., Maier A., Fiebig H.H., König G. M., Malek N. P., Kehraus S., Kalesse, M.

- (2010). Mode of action of epoxyphomalins A and B and characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium sp.* *Journal of Natural Products*. 73(12): 2053–2056.
- Khalil Z. G., Kalansuriya P., Capon R. J. (2014). Lipopolysaccharide (LPS) stimulation of fungal secondary metabolism. *Mycology*. 5(3): 168–178.
- Kurt T., Marbà-Ardébol A.M., Turan Z., Neubauer P., Junne S., Meyer V. (2018). Rocking *Aspergillus*: morphology-controlled cultivation of *Aspergillus niger* in a wave-mixed bioreactor for the production of secondary metabolites. *Microb Cell Fact*. 17(1):1-9.
- Lambert P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(10): 1471–1485.
- Levy S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92(1): 65–71.
- Liou G F., Yoshizawa S., Courvalin P., Galimand M. (2006). Aminoglycoside resistance by ArmA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *Journal of Molecular Biology*. 359(2): 358–364.
- Liu C. X., Yu X. Q., Guo Z. Y., He H. B., Tu X., Deng Z. S., Zou K. (2016). Structural elucidation and NMR spectral assignments of paraconfuranones I-M from the insect-associated fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 54(11): 916–921.
- Liu L., Gao H., Chen X., Cai X., Yang L., Guo L., Che, Y. (2010). Brasilamides A-D: Sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. *European Journal of Organic Chemistry*. 10(17): 3302–3306.
- Liu Y. S., Wu J. Y. (2012). Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 39(4):623–628.
- Lo H. C., Entwistle R., Guo C. J., Ahuja M., Szewczyk E., Hung J. H., Wang C. C. C. (2012). Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*. 134(10): 4709–4720.
- Manges A. R., Geum H. M., Guo A., Edens T. J., Fibke C. D., Pitout J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic escherichia coli lineages. *Clinical Microbiology Reviews*. 32(3): 1–25.
- Messina, J. A., Thaden, J. T., Sharma-Kuinkel, B. K., Fowler Jr, V. G. (2016). Impact of bacterial and human genetic variation on *Staphylococcus aureus* infections. *PLoS Pathogens*. 12(1): e1005330.
- Miao L., Kwong T. F. N., Qian P. Y. (2006). Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(5): 1063-1073.
- Monte, D. F., Lincopan, N., Fedorka-Cray, P. J., Landgraf, M. (2019). Current insights on high priority antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in food and foodstuffs: a review. *Current opinion in Food Science*. 26: 35-46.
- Nosanchuk J. D., Stark R. E., Casadevall A. (2015). Fungal melanin: what do we know about structure?. *Frontiers in microbiology*. 6: 1463.
- Papagianni M., Matthey M., Kristiansen B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb Technol*. 25(8–9):710–717.
- Papagianni M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*:

- biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv.* 25:244–63.
- Park H. B., Kwon H. C., Lee C. H., Yang H. O. (2009). Glionitrin A, an antibiotic–antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *Journal of Natural Products.* 72(2): 248–252.
- Peláez F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology.* 71(7): 981–990.
- Pu, X. J., Hu, Q. Y., Li, S. S., Li, G. H., Zhao, P. J. (2021). Sesquiterpenoids and their quaternary ammonium hybrids from the mycelium of mushroom *Stereum hirsutum* by medium optimization. *Phytochemistry.* 189: 112852.
- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 48(3): 367–372.
- Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 6: 141.
- Schuetz, A. N. (2019). Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. *Seminars in Diagnostic Pathology.* 36(3):187-192.
- Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi S. M. D., Kamal M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 22(1): 90-101.
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M. L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A. I. (2015). Molecular methods for serovar determination of Salmonella. *Critical Reviews in Microbiology.* 41(3): 309-325.
- Shiono Y., Kikuchi M., Koseki T., Murayama T., Kwon E., Aburai N., Kimura K. I. (2011). Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. *Phytochemistry.* 72(11): 1400–1405.
- Shiono, Y., Hatakeyama, T., Murayama, T., Koseki, T. (2012). Polyketide metabolites from the endophytic fungus *Microdiplodia* sp. KS 75-1. *Natural Product Communications,* 7(8): <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700825>.
- Somjaipeng S., Medina A., Kwaśna H., Ordaz Ortiz J., Magan, N. (2015). Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from English yew trees (*Taxus baccata*). *Fungal Biology.* 119(11): 1022–1031.
- Somjaipeng S., Medina A., Magan N. (2016). Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and Microbial Technology.* 90: 69–75.
- Stajich, J. E., Berbee M. L., Blackwell M., Hibbett D. S., James T. Y., Spatafora J. W., Taylor J. W. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany.* 98(3): 426–438.
- Suárez C., Gudiol F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 27(2): 116–129.
- Suzuki, T., Ariefta, N. R., Koseki, T., Furuno, H., Kwon, E., Momma, H., Harneti, D., Maharani, R., Supratman, U., Kimura, K., Shiono, Y. (2019). New polyketides, paralactonic acids A–E produced by *Paraconiothyrium* sp. SW-B-1, an endophytic fungus associated with a seaweed, *Chondrus ocellatus* Holmes. *Fitoterapia.* 132: 75-81.

- Teoh, Y. P., Don, M. M., Ujang, S. (2012). Nutrient improvement using statistical optimization for growth of *Schizophyllum commune*, and its antifungal activity against wood degrading fungi of rubberwood. *Biotechnology Progress*. 28(1): 232-241.
- Tomm H. A., Ucciferri L., Ross A. C. (2019). Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 46(10): 1381–1400.
- Trapp, M. A., Kai, M., Mithöfer, A., Rodrigues-Filho, E. (2015). Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry*. 110: 72-82.
- Vallet, M., Vanbellingen, Q. P., Fu, T., Le Caer, J. P., Della-Negra, S., Touboul, D., Duncan, K. R., Nay, B., Brunelle, A., Prado, S. (2017). An integrative approach to decipher the chemical antagonism between the competing endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*. 80(11): 2863-2873.
- VanderMolen K. M., Raja H. A., El-Elimat T., Oberlies, N. H. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*. 3(1): 1–7.
- Veiter L., Rajamanickam V., Herwig C. (2018). The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102: 2997–3006.
- Verkley G. J. M., Da Silva M., Wicklow D. T., Crous P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*. 50(2): 323–335.
- Vignoli R, Sejia V. (2000). *Principales Mecanismos de Resistencia antibiótica, Temas de bacteriología y Virología Médica*. 649–662.
- Weber, D., Erosa, G., Sterner, O., Anke, T. (2006). New bioactive sesquiterpenes from *Ripartites metrodii* and *R. tricholoma*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 61(9-10): 663-669.
- Wohlleben W., Mast Y., Stegmann E., Ziemert N. (2016). Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*. 9(5): 541–548.
- Wongwicharn A., McNeil B., Harvey L. M. (1999). Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol Bioeng*. 65:416–24.
- Wucherpennig T., Hestler T., Krull R. (2011). Morphology engineering—osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb Cell Fact*. 10(1):58.
- Yamaç, M., Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*. 44(9): 660-667.
- Yim G., Wang H. H., Davies J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 362(1483): 1195–1200.
- Yin W., Keller N. P. (2011). Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *Journal of Microbiology*. 49(3): 329–339.
- Zárate-Chaves, C. A., Romero-Rodríguez, M. C., Niño-Arias, F. C., Robles-Camargo, J., Linares-Linares, M., Rodríguez-Bocanegra, M. X., Gutiérrez-Rojas, I. (2013). Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44: 215-223.

- Zhang J., Zhang J. (2016). The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit Rev Biotechnol.* 36(6):1066–1077.
- Zhou Y. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of the endophytic fungi from medicinal herb *Trillium tschonoskii*. *African Journal of Microbiology Research.* 5(27): 4917-4921.