



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

Efecto del compuesto dimetilhexadecilamina en la madera de *Pinus*
sp. como tratamiento preventivo al daño ocasionado por *Trametes*
versicolor

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias y Tecnología de la Madera

PRESENTA:

Wilber Montejo Mayo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Crisanto Velázquez Becerra

CODIRECTOR

Dr. León Francisco Ruiz Herrera

SINODALES

Dr. José Cruz De León
Dr. Pablo López Albarrán
Dr. Raúl Espinoza Herrera

Morelia Michoacán, febrero de 2024

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo a mi familia, en especial a mis padres Bartolo y María que estuvieron desde el inicio de mi carrera profesional, por sus consejos, su apoyo incondicional, todo lo que soy ahora gracias a ellos.

A mis hermanos: Miguel, Nicolás, María, Alejandro, Graciela y Eduardo; gracias por estar siempre a mi lado.

A mi compañera de vida María Salud gracias por apoyarme en todo momento, por su amor y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por guiarme día a día y darme la fortaleza para alcanzar este logro importante de mi vida profesional.

Agradecerle a mi asesor el Dr. Crisanto por su orientación, su persistencia, paciencia y motivación para concluir esta etapa de mi carrera profesional.

A mi co-asesor el Dr. León Francisco por la disponibilidad y orientación en este trabajo.

A mis sinodales: Dr. Pablo, Dr. Raúl, Dr. José Cruz; muchas gracias por sus consejos y disponibilidad.

Agradezco infinitamente a la división de estudios de posgrado de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera incorporada a la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, por darme la oportunidad de formar parte de ella.

A mis compañeros de laboratorio: Eduardo, Vanne, Gaby y Rossy; muchas gracias.

A mis amigos Samuel, Martin y primo Miguel, muchas gracias.

Agradecerles a las personas que de una u otra manera me apoyaron en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. HIPÓTESIS.....	10
5. OBJETIVOS.....	11
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
5.2 Objetivos específicos	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Material de estudio	12
6.1.1 Material biológico.....	12
6.1.2 Compuesto dimetilhexadecilamina.....	12
6.1.3 Medios de cultivos.....	13
6.1.4 Microscopio Electrónico de Barrido	13
6.2 Efecto del compuesto DMHDA en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	13
6.3 Micrografía de <i>Trametes versicolor</i> crecido en diferentes concentraciones del compuesto DMHDA.....	14
6.4 Determinación cualitativa de la actividad lacasa de <i>Trametes versicolor</i> con la adición del compuesto DMHDA.....	15
6.5 Determinación cualitativa de la actividad celulolítica de <i>Trametes versicolor</i> con la adición del compuesto DMHDA	16
6.6 Crecimiento de <i>Trametes versicolor</i> en medio líquido polipeptona CAS con la adición del compuesto DMHDA.....	17
6.7 Pérdida de masa de la madera de <i>Pinus</i> sp. tratada con la mezcla DMHDA-aceite de linaza expuesta a <i>Trametes versicolor</i>	18
7. RESULTADOS	23
7.1 Efecto del compuesto DMHDA en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de <i>Trametes versicolor</i>	23
7.2 Micrografía de <i>Trametes versicolor</i>	26
7.3 Densidad óptica de <i>Trametes versicolor</i> en medio líquido polipeptona CAS con la adición del compuesto DMHDA.....	27

7.4	Determinación cualitativa de la actividad lacasa de <i>Trametes versicolor</i> con la adición de la DMHDA	29
7.5	Determinación cualitativa de la actividad enzimática celulolítica de <i>Trametes versicolor</i> con la adición de la DMHDA.....	31
7.6	Absorción de la mezcla DMHDA-aceite de linaza crudo	32
7.7	Absorción de la mezcla DMHDA-aceite de linaza doble cocido	33
7.8	Pérdida de masa de las probetas de <i>Pinus</i> sp. después de 4 meses de exposición en <i>Trametes versicolor</i>	34
8.	DISCUSIÓN.....	40
9.	CONCLUSIÓN.....	46
10.	RECOMENDACIONES.....	47
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El crecimiento de <i>Trametes versicolor</i> en su medio natural y en condiciones <i>in vitro</i>	12
Figura 2. Fórmula química del compuesto dimetilhexadecilamina.	12
Figura 3. Diámetro de <i>T. versicolor</i>	14
Figura 4. <i>T. versicolor</i> utilizado para la obtención de la micrografía.....	15
Figura 5. Actividad enzimática de <i>T. versicolor</i> mediante la reacción ABTS.....	16
Figura 6. Probetas de <i>Pinus</i> sp.	18
Figura 7. Bloques de alimentación del hongo <i>T. versicolor</i>	19
Figura 8. Probetas de <i>Pinus</i> sp. impregnadas durante 48 horas.....	20
Figura 9. Probetas de <i>Pinus</i> sp. después de ser tratadas.....	21
Figura 10. Montaje de las probetas de <i>Pinus</i> sp.	21
Figura 11. Diámetro de <i>T. versicolor</i> crecidos en las diferentes concentraciones de DMHDA.	24
Figura 12. Imágenes representativas de <i>T. versicolor</i> de 8, 15, 30, 45 y 60 días; crecidos en las diferentes concentraciones del compuesto DMHDA.	25
Figura 13. Reinoculo de <i>T. versicolor</i> crecidos en medio PDA	25
Figura 14. Micrografía de <i>T. versicolor</i> observadas en el microscopio electrónico de barrido: objetivos 1000x y 3000x	26
Figura 15. Micrografía de <i>T. versicolor</i> observadas en el microscopio electrónico de barrido: objetivos 1000x y 3000x.....	27
Figura 16. Densidad óptica de <i>T. versicolor</i> crecidos en las diferentes concentraciones de DMHDA	28
Figura 17. <i>T. versicolor</i> crecidos en medio polipeptona CAS, a los 60 días.....	29
Figura 18. Índice de potencia de la actividad cualitativa lacasa en <i>T. versicolor</i> con la adición de las diferentes concentraciones de la DMHDA.....	30
Figura 19. Actividad cualitativa de la lacasa de <i>T. versicolor</i>	30
Figura 20. Índice de potencia de la actividad cualitativa celulolítica en <i>T. versicolor</i> con la adición de las diferentes concentraciones de la DMHDA	31
Figura 21. Actividad celulolítica de <i>T. versicolor</i> con la presencia del compuesto DMHDA.	32
Figura 22. Absorción de la mezcla DMHDA-ALC aplicadas en las probetas de <i>Pinus</i> sp.....	33
Figura 23. Absorción de la mezcla DMHDA-ALDC aplicadas en las probetas de <i>Pinus</i> sp.....	34
Figura 24. Probetas de <i>Pinus</i> sp. con y sin presencia de <i>T. versicolor</i>	35
Figura 25. Pérdida de masa de las probetas de <i>Pinus</i> sp. impregnadas con la mezcla DMHDA-ALDC expuesto a <i>T. versicolor</i>	36
Figura 26. Cortes anatómicos de las probetas de <i>Pinus</i> sp. tratadas con el compuesto DMHDA-ALDC.	37

Figura 27. Pérdida de masa de las probetas de <i>Pinus</i> sp. impregnadas con la mezcla DMHDA-ALC expuesto a <i>T. versicolor</i>	38
Figura 28. Cortes anatómicos de las probetas de <i>Pinus</i> sp. tratadas con el compuesto DMHDA-ALC.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>T. versicolor</i> crecidos en medio líquido polipeptona CAS.....	17
--	----

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Índice de potencia de la actividad enzimática.....	15
Ecuación 2. Absorción.....	20
Ecuación 3. Pérdida de masa.....	22

RESUMEN

La madera es un material orgánico, heterogéneo que consta de distintas células, moléculas y sus principales componentes químicos son: lignina, celulosa y hemicelulosa. Debido a su composición química, la madera es susceptible al ataque de diversos organismos xilófagos: bacterias, insectos y hongos. En la actualidad para preservar la madera se utilizan diversos compuestos tóxicos para el hombre y el medio ambiente. En este trabajo se evaluó el efecto del compuesto dimetilhexadecilamina (DMHDA) como tratamiento preventivo al daño ocasionado por *Trametes versicolor* en la madera de *Pinus* sp. En un sistema *in vitro*, se expuso el hongo *T. versicolor* a diferentes concentraciones del compuesto DMHDA 50, 150 y 450 μM , obteniendo información sobre el diámetro de crecimiento de micelio, actividad lacasa y celulolítica, además, bajo estas condiciones experimentales se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB) para revisar detalles morfológicos del organismo. Por otro lado, se llevó a cabo el experimento de "Soil Block Test" utilizando probetas de *Pinus* sp. previamente impregnadas con una mezcla DMHDA-aceite de linaza crudo y doble cocido. El crecimiento de *T. versicolor* expuesto a la DMHDA tras 60 días, mostró un comportamiento dosis dependiente de la concentración, también, el análisis de MEB reveló que la morfología y densidad micelial se afectó en los tratamientos con DMHDA, mostrando un engrosamiento y formación de pliegues morfológicos atípicos. De igual manera el efecto antifúngico del compuesto DMHDA se pudo apreciar en la actividad enzimática lacasa de *T. versicolor*. En cuanto a las probetas de *Pinus* sp. expuestas a *T. versicolor* se observó tamponamiento en la estructura celular del hongo. La mezcla DMHDA-aceite de linaza doble cocido mostró una menor pérdida de peso respecto al control. En conclusión, el compuesto DMHDA a mayor concentración presentó efecto antifúngico. El ensayo Soil Block Test, la mezcla DMHDA-aceite de linaza doble cocido mostró menor pérdida de masa, aunque no hubo diferencia con el control.

Palabras clave: xilófagos, *Trametes versicolor*, preservación de madera, aceite de linaza, dimetilhexadecilamina.

ABSTRACT

Wood is a heterogeneous organic material that consists of different cells, molecules and its main chemical components are: lignin, cellulose and hemicellulose. Due to its chemical composition, wood is susceptible to attack by various xylophagous organisms: bacteria, insects and fungi. Currently, various compounds that are toxic to humans and the environment are used to preserve wood. In this work, the effect of the compound dimethylhexadecylamine (DMHDA) was evaluated as a preventive treatment for damage caused by *Trametes versicolor* in the wood of *Pinus* sp. In an *in vitro* system, the fungus *T. versicolor* was exposed to different concentrations of the compound DMHDA 50, 150 and 450 μM , obtaining information on the diameter of mycelium growth, laccase and cellulolytic activity, in addition, under these experimental conditions the scanning electron microscope (SEM) to review morphological details of the organism. On the other hand, the "Soil Block Test" experiment was carried out using specimens of *Pinus* sp. previously impregnated with a mixture of DMHDA-raw and double-cooked linseed oil. The growth of *T. versicolor* exposed to DMHDA after 60 days showed a dose-dependent behavior of the concentration. Also, the SEM analysis revealed that the mycelial morphology and density was affected in the treatments with DMHDA, showing a thickening and formation of atypical morphological folds. Likewise, the antifungal effect of the compound DMHDA could be seen in the laccase enzymatic activity of *T. versicolor*. As for the specimens of *Pinus* sp. exposed to *T. versicolor*, buffering was observed in the cellular structure of the fungus. The DMHDA-double cooked linseed oil mixture showed less weight loss compared to the control. In conclusion, the compound DMHDA at a higher concentration presented an antifungal effect. In the "Soil Block Test", the DMHDA-double cooked linseed oil mixture showed less mass loss, although there was no difference with the control.

Key words: xylophages, *Trametes versicolor*, wood preservation, linseed oil, dimethylhexadecylamine,

1. INTRODUCCIÓN

La madera es un material orgánico y heterogéneo, que consta de distintas células y moléculas; tienen diversas funciones en el árbol (**Schwarze, 2007**). Material que ha sido explotado por los seres humanos a lo largo de la historia; en edificación, fabricación de muebles, producción de diferentes derivados; es de mucha importancia y es el único material utilizado en la construcción que se pueden plantar (**Ramage et al., 2017**). Sus principales componentes químicos es la celulosa, hemicelulosa y lignina; a través de enlaces de hidrógeno interaccionan con el agua, que están presente en el material (**Thybring et al., 2022**).

La lignina es un heteropolímero muy complejo en su estructura molecular y se compone principalmente de tres monómeros: alcohol *p*-cumarílico, alcohol sinapílico y alcohol coniferílico; es el material más numeroso en el mundo después de la celulosa; el porcentaje (lignina) es diferente para cada árbol (**Suota et al., 2021; Britannica, 2022**). De modo que, la lignina es un recurso de origen natural de mucho interés para la humanidad, se aprovecha en la fabricación de sustancias químicas y derivados; es utilizada para la disminución de contaminantes ambientales y almacenamiento de bioenergía (**Erfani et al., 2019**).

En cuanto a la celulosa es el biopolímero más abundante en la tierra, es un polímero simple y su principal componente químico es la unión lineal de *D*-glucosa formado a través de microfibrillas semicristalinas. La celulosa no puede encontrarse por medio de monómeros, es a través de la relación de las energías de van der Waals y las uniones de hidrógeno (**Klemm et al., 2005; Li et al., 2021**).

Otro componente químico importante de la madera es la hemicelulosa, forma parte de los elementos de la pared celular de las plantas y se constituye a partir de polímeros; siendo sus principales monómeros: *D*-glucosa, ácido *D*-glucurónico, *D*-manosa, *D*-arabinosa y *D*-xilosa. La hemicelulosa de la madera podría sustituir los

productos que son fabricados a partir de los derivados del petróleo; las ventajas son amigable al medio ambiente, es un producto renovable y biodegradable (**Mamman et al., 2008; Huang et al., 2021; Rao et al., 2023**).

Debido a su composición química orgánica, la madera es expuesto a la degradación de agentes bióticos, entre los que se encuentran: bacteria, insectos, barrenadores marinos y hongos de pudrición. Este último, por medio de enzimas degradan los principales componentes químicos de la madera, modificando y comprometiendo las propiedades físico-mecánicas, químicas y estéticas del material (**Janusz et al., 2017; Martín y López, 2023**).

Entre los xilófagos de la madera más importantes y perniciosos se tienen a los basidiomicetos causantes de la pudrición café o marrón (*Gloeophyllum trabeum*, *Laetiporus sulfureus*, *Serpula lacrymans*, *Serpula lacrymans* y *Coniophora puteana*) capaces de degradar eficientemente los componentes de la madera (la celulosa y hemicelulosa) mediante enzimas hidrolíticas y oxidativas. Prefieren las gimnospermas, hay indicios en algunas angiospermas y es la causa del mayor número de deterioro de los árboles leñosos (**Carrillo et al., 2014; Bari et al., 2015; Presley y Schilling, 2017; Benítez et al., 2021**).

Por su parte, los ascomicetos causantes de la pudrición blanda (*Chaetomium globosum*, *Monodictys putredinis*, *Hypocrea muroiana*, *Cryphonectria parasítica*, *Fusarium oxysporum*, *Cadophora malorum*, *Cadophora cluteo-olivacea*, *Cadophora fastigiata* y *Trichoderma* sp. WF29) tienen la capacidad de establecerse en la pared celular de la madera, descomponiendo principalmente la celulosa, degradan la estructura molecular de la lignina y causando el blanqueamiento color característico de la celulosa (**Blanchette et al., 2004; Liers et al., 2011; Maroof et al., 2022**).

Entre los hongos de la pudrición blanca se encuentran principalmente los basidiomicetos y algunos ascomicetos (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*,

Schizophyllum commune, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Irpex lacteus* WF36 y *Lentinus edodes* (Patel et al., 2020; Tovar et al., 2018; Maroof et al., 2022). Son los únicos organismos que tienen la capacidad de degradar los tres componentes químicos (lignina, celulosa y hemicelulosa) de la madera (Rodríguez, 2017).

Uno de los hongos más estudiada en los últimos años es *Trametes versicolor*, de acuerdo a las investigaciones tienen múltiples aplicaciones en el área: de la medicina, biotecnología y ambiental. Del hongo se obtienen dos polisacáridos PSP y PSK tienen la capacidad de provocarles daño a las células cancerígenas y hay indicios de liberar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), involucrado en el deterioro de las células dañinas (Córdoba y Ríos, 2012; Habtemariam, 2020). El hongo *T. versicolor* tienen dos mecanismos de acción para la degradación de la madera; de forma simultánea descompone todos los componentes químicos y de forma selectiva degrada de preferencia la lignina, seguida de la celulosa y hemicelulosa (Martínez et al., 2005).

Actualmente para prolongar la vida útil de la madera ante el ataque de microorganismos; se utilizan compuestos químicos entre los que se encuentran la creosota y en algunos países se utilizan para tratar madera para durmientes ferroviarios y postes de servicios públicos. Los productos orgánicos oleosolubles: naftenatos, pentaclorofenol, pentaclorofenol de sodio, óxido tributil stannico y quinolinolato de cobre. De igual manera podemos encontrar los productos inorgánicos sales múltiples, arsénico cobre-amoniacaes (óxido cúprico y arsénico en forma de óxido arsénico, mezclados en amoniaco), cupro cromo arsenicales, cupro cromo bóricas (cobre-boro-cromo) compuestos de boro (De Fuentes, 1998; ATSDR, 2002).

Uno de los preservantes químicos utilizados es el “Arseniato de Cobre Cromatado (Sales CCA)”, a partir de enero de 2004, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), restringió la madera tratada con las sales CCA

empleada para la construcción de vivienda; con el paso del tiempo lixivian compuestos tóxicos, con impactos principalmente en el medio ambiente, la salud humana y animal (**Morais et al., 2021; EPA, 2023**). También la creosota contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos, es un peligro en la salud de los seres vivos; al estar en contacto de forma constante, se puede padecer de diferentes tipos de problemas: la piel, el colon, sistemas reproductivos y órganos internos (**Mallah et al., 2022**). Otra de las sustancias químicas utilizadas es el pentaclorofenol, tienen consecuencias peligrosas en la salud humana, modifican las funciones reproductivas, hay indicios que es cancerígeno y causa alteraciones en el ADN de los seres vivos (**Morales y Pazos, 1998; Thota et al., 2022**).

En contra parte, en la actualidad existen tratamientos aplicados en la madera que no representan un problema ambiental y/o salud humana, por ejemplo, entre los más populares se tiene el “tratamiento térmico”. Una de las ventajas; no se utilizan productos químicos en el proceso de fabricación y no es perjudicial para el medio ambiente. Además, existen estudios donde mencionan que el tratamiento térmico mejoran las propiedades acústicas y la estabilidad dimensional de la madera; en algunos casos disminuye las propiedades físico-mecánicas (**Won et al., 2012**).

Recientemente, se ha demostrado que algunas bacterias producen compuestos orgánicos volátiles (COV) con actividad antifúngico (**Xu et al., 2004; Zou et al., 2007**). Las bacterias como *Bacillus* sp. es capaz de producir metabolitos secundarios antifúngicos contra *Fusarium* sp. (**Rojas-Badía et al., 2017; Salazar et al., 2023**). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 emite un compuesto orgánico identificado como dimetilhexadecilamina, tiene el potencial para el tratamiento preventivo contra hongos xilófagos de la madera (**Orozco-Mosqueda et al., 2015**).

Por lo tanto, en este experimento se evaluó el efecto del compuesto dimetilhexadecilamina en la madera de *Pinus* sp. como tratamiento preventivo al daño ocasionado por *Trametes versicolor*.

2. ANTECEDENTES

Los agentes que degradan la madera se dividen en dos grupos: los bióticos (hongos, insectos xilófagos, bacterias y organismos marinos) y abióticos (degradación de la luz, agua, fuego, agentes químicos). Entre los más importantes se encuentran los hongos xilófagos (hongos de pudrición café, blanda y blanca). Estos organismos representan un impacto muy importante en el material leñoso, como fuente de alimentación o para habitar en ella (**Garrido, 2015; Martín y López, 2023**).

Por lo tanto, para alargar la vida útil de la madera se utilizan preservantes químicos, sales de cobre-cromo-boro y sales arseniato de cobre cromatado, mejoran la resistencia a la degradación de las termitas, hongos de pudrición blanca y blanda (**Mora et al., 2006**). La madera de *Pinus taeda* L. tratadas con sales arseniato de cobre cromatado, al estar expuesto a los hongos xilofagos: *Pycnoporus sanguineus*, *Laetiporus sulphureus*, *Plerotus sajor-caju*, *Ganoderma applanatum*, *Glophyllum* sp. resistió al ataque de los microorganismos (**Bobadilla et al., 2007**). En un estudio realizado por **Encinas y (2003)**, nos mencionan que las sales de arseniato de cobre cromatado impregnadas en la madera de *Pinus caribaea* var. hondurensis, *Pterocarpus acapulcensis* y *Tabebuia serratifolia* inhiben el desarrollo de los hongos de pudrición café y blanca.

Existen tratamientos aplicados en la madera que no representan un problema ambiental; además mejora la resistencia contra la degradación de los organismos xilófagos; le proporciona estabilidad dimensional al material y sufren alteraciones en la composición química (**Boonstra et al., 2008; Candelier et al., 2016**). El tratamiento térmico de la madera de abeto al estar expuesto a los hongos de pudrición café *Serpula lacrymans* y pudrición blanca *Trametes versicolor* sufren modificaciones en su composición química (lignina, celulosa y hemicelulosa) y está relacionada con la pérdida de masa provocada por los organismos xilófagos (**Vidholdová et al., 2022**). La madera de pino silvestre con tratamiento térmico incrementa la durabilidad contra el ataque de *Coniophora puteana*, *Poria placenta*

y *Coriolus versicolor* (**Boonstra et al., 2007**). La madera *Pinus nigra* L. y *Populus* sp. con tratamiento térmico 180 °C y 200 °C, mejoran la resistencia al estar expuesto a los hongos *Coniophora puteana*, *Oligoporus placenta* y *Trametes versicolor* (**Vega et al., 2022**). La madera de bambú tratada térmicamente a una temperatura 140 °C, sufren modificaciones en su composición química y se mejoran la resistencia al estar expuesto a los hongos de pudrición café *Postia placenta* y *Gloeophyllum trabeum* (**Brito et al., 2020**).

Por otro lado, los extraíbles de la madera (canela) *Cinnamomum zeylanicum* tienen efecto antifúngico en el crecimiento micelial de los hongos de pudrición blanca y café (**Valcorte et al., 2020**). Los aceites esenciales de los cítricos impregnados en la madera de conífera; inhiben el desarrollo de los hongos cromógenos identificados como: *Alternaria* sp., *Hypocrea* sp., *Trichoderma* sp. y *Geosmithia* sp.; mediante sus propiedades químicas (**Martínez et al., 2022**). El aceite de *Azadirachta indica* (neem) impregnada en la madera *Ceiba pentandra* le proporciona resistencia contra los hongos xilófagos (**Souza et al., 2020**).

Por otro lado, mediante un análisis cromatográfico de perfil de compuestos volátiles se encontró que *Arthrobacter agilis* UMCV2 produce dimetilhexadecilamina; promueve el desarrollo de la estructura radical de la planta, les sirve de defensa contra patógenos, responsable de la percepción de quórum (QS) y la asimilación de micronutrientes en la planta (**Velázquez-Becerra et al., 2011; Vázquez-Chimalhua et al., 2021; Chávez-Moctezuma et al., 2022**). En otro trabajo realizado por **Hernández-Soberano et al., 2023** nos mencionan, que el compuesto DMHDA tienen efectos sobre el crecimiento de la planta y defensa contra patógenos a través de la señalización del ácido jasmónico y etileno. El compuesto dimetilhexadecilamina aumenta el porcentaje de germinación de achenios de fresa, promueve el desarrollo de las plantas y las protege contra los patógenos comunes de los cultivos agrícolas (**Hernández-Soberano et al., 2021**).

La dimetilhexadecilamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) es un aminolípido que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos fúngicos con extensa distribución, así como *Phytophthora cinnamomi* (**Velázquez-Becerra et al., 2013**). Los COV comerciales: dimetilhexadecilamina, dimetiltetradecilamina, dimetildodecilamina, dimetildecilamina, dimetiloctilamina, dimetilbutanamina tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento hongos xilófagos de la madera *Hypocrea* sp. y *Fusarium* sp. (**Orozco-Mosqueda et al., 2015**). La dimetilhexadecilamina estándar comercial inhibió completamente el desarrollo de *B. cinerea* y *P. cinnamomia* mostrando un potencial inhibidor mayor que el captán. y que podría utilizarse *A. agilis* UMCV2 como alternativa para el control de organismos patógenos (**Velázquez-Becerra et al., 2010**).

De mismo modo, la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 es capaz de producir compuestos antimicrobianos, genes que codifican lipopéptidos como la fengicina, iturina, surfactina, bacilamicina D y policétidos; diffidina, bacilicina, bacilibactina, bacillaeno, con una fuerte actividad antifúngica contra enfermedades del tabaco (**Ahmed et al., 2022**). El aislado de *Bacillus subtilis* CF-3 tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios identificados como benzotiazol, anizol y 3-metilbutanal que reprimen el desarrollo de dos patógenos de interés agrícola *Colletotrichum gloesporoides* y *Monilinia fructicola* en condiciones *in vitro* (**Gao et al., 2018**). La bacteria *Pseudomonas aurantiaca* ST-TJ4 emiten COV de diferentes características, entre el más destacado se encuentra: 1-Nanonal, a partir de 10 μL reprimió en su totalidad el crecimiento de *Verticillium dahliae* (**Ni et al., 2022**). *Bacillus methylotrophicus* BCN2 y *B. thuringiensis* BCN10 emiten COV que inhiben el desarrollo de los fitopatógenos de interés agrícola (**He et al., 2020**). Aislado de *Bacillus atrophaeus* emite compuestos orgánicos y ácidos grasos que tienen actividad antifúngica contra hongos de pudrición blanda *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus awamori* y *Penicillium* sp. (**Korany et al., 2023**).

La cepa de la bacteria *Bacillus mojavensis* I4 libera compuestos orgánicos volátiles que impide el crecimiento de microorganismos patógenos como *Fusarium*

vertillioides, *F. graminearum*, *Rhizoctonia solani* y estimula el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* sp. (Ghazala *et al.*, 2022). El aislado de *Pseudomonas tolaasii* libera COV (metanotiol, dimetil disulfuro y 1-undeceno); reprime el desarrollo micelial de los hongos *Pleotorus ostreatus* y *P. eryngii* en condiciones *in vitro* (Lo Cantore *et al.*, 2015). Las bacterias producen metabolitos secundarios como la dimetilhexadecilamina y 2,4-Di-ter-butilfenol; tienen efectos antifúngicos y posiblemente una opción a los preservadores convencionales de la madera (García-Ortiz *et al.*, 2018). El aislado de *Bacillus* sp. produce metabólicos secundarios, al impregnar en la madera de *Pinus pseudostrobus* inhibe el crecimiento micelial de hongos de pudrición (García-Ortiz *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el uso de compuestos químicos para impregnar la madera, debido a su toxicidad que presenta al medio ambiente, es necesario realizar estudios con otras sustancias amigables al medio ambiente y/o salud humana. La dimetilhexadecilamina es un compuesto orgánico que podría ser una alternativa para el tratamiento preventivo ante el ataque del hongo *Trametes versicolor* en la madera *Pinus* sp.

4. HIPÓTESIS

El compuesto dimetilhexadecilamina en tratamiento con aceite de linaza inhibe el crecimiento del hongo *Trametes versicolor*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del compuesto dimetilhexadecilamina como tratamiento preventivo al daño ocasionado por *Trametes versicolor* en la madera de *Pinus sp.*

5.2 Objetivos específicos

- ✚ Probar el efecto *in vitro* de las diferentes concentraciones del compuesto dimetilhexadecilamina en el crecimiento de *T. versicolor*
- ✚ Evaluar la absorción de la mezcla dimetilhexadecilamina-aceite de linaza impregnadas en las probetas de *Pinus sp.*
- ✚ Ensayar la pérdida de masa de las probetas de *Pinus sp.* después de 4 meses de exposición en *T. versicolor*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material de estudio

La madera de *Pinus* sp. provinieron de un bosque ubicado en la comunidad de Ichaqueo municipio de Morelia Michoacán, México (UTM 14Q 275505.56m Este y 2165602.14m Norte).

6.1.1 Material biológico

El hongo xilófago *Trametes versicolor* se obtuvo en el laboratorio de microbiología de la madera (ver Fig. 1) (FITECMA-UMSNH).



Figura 1. El crecimiento de *T. versicolor* en su medio natural (a), y en condiciones *in vitro* (b) en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

6.1.2 Compuesto dimetilhexadecilamina

El compuesto dimetilhexadecilamina (Figura 2) se obtuvo de la casa comercial Sigma-Aldrich México (40460-100ML), CAS: 112-69-6. Se mantuvo a 4 °C y se disolvió con etanol antes de utilizarlo.

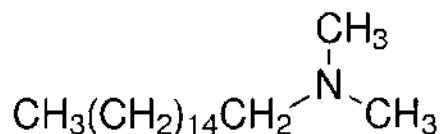


Figura 2. Formula química del compuesto dimetilhexadecilamina (DMHDA).

6.1.3 Medios de cultivos

Como medio de cultivo para el experimento se utilizó agar papa dextrosa (PDA) (Reactivos Química Meyer BD Bioxon Modelo BD211900). Para el experimento de medio líquido polipeptona CAS (Reactivos Química Meyer “DIBICO” Catálogo 2007-E).

6.1.4 Microscopio Electrónico de Barrido

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JOEL modelo JSM6400 (Instituto de Investigación en Metalúrgicas y Materiales-UMSNH).

6.2 Efecto del compuesto DMHDA en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Trametes versicolor*

El efecto del compuesto DMHDA (estándar comercial Sigma CAS: 112-69-6) sobre el crecimiento de *T. versicolor* se llevó a cabo el siguiente experimento: primero se dejó crecer el hongo xilófago en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se colocaron en una incubadora microbiológica a 28°C durante 7 días hasta su uso. Después, este mismo organismo se sembraron en medio PDA disminuido al 25% (9.75 g/L de PDA y 11.25 g/L de agar bacteriológico) adicionado con el compuesto DMHDA en diferentes concentraciones: control (sin DMHDA), 50, 150 y 450 µM. Posteriormente cada una de las cajas Petri se sellaron con Reynolds plástico film y se colocaron en una incubadora microbiológica a 28 °C.

Se realizaron experimentos de 8, 16, 30, 45 y 60 días; se repitió 2 veces con 5 réplicas para cada tratamiento, teniendo las mismas condiciones. El diámetro de *T. versicolor* (Figura 3), se midió como parámetro de inhibición a consecuencia de las diferentes concentraciones del compuesto DMHDA. Los datos obtenidos se capturaron en una base de datos del programa EXCEL®.



Figura 3. Diámetro de *Trametes versicolor*.

Posteriormente, el hongo *T. versicolor* crecidos en una concentración 450 μM de DMHDA y el control se resembraron en medio PDA (100%), se colocaron en una incubadora microbiológica a 28 °C y se evaluaron a los 30 y 60 días tomando en cuenta el diámetro de crecimiento del organismo xilófago. El experimento se repitió 2 veces teniendo las mismas condiciones y con 5 réplicas para cada tratamiento.

6.3 Micrografía de *Trametes versicolor* crecido en diferentes concentraciones del compuesto DMHDA

La obtención de la micrografía se realizó en el “Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales” (www.iim.umich.mx), utilizando un microscopio electrónico de barrido (MEB, marca JOEL modelo JSM6400). El hongo *T. versicolor* se crecieron en medio PDA disminuido al 25% y se le adiciono las diferentes concentraciones de DMHDA (50 y 150 μM) y un tratamiento control (Sin DMHDA) y se dejaron crecer en una incubadora microbiológica a 28 °C durante 30 días. Para la parte microscópica se tomaron muestras de micelio de cada tratamiento en la parte exterior e interior (Figura 4) de cada caja Petri; posteriormente a cada muestra se le aplico un baño de cobre durante 20 minutos, utilizando una metalizadora Edwards y se observaron en dos objetivos 1000 y 3000x. Finalmente se tomaron fotografías y se midieron el micelio de cada uno de los tratamientos.



Figura 4. *T. versicolor* utilizado para la obtención de la micrografía.

6.4 Determinación cualitativa de la actividad lacasa de *Trametes versicolor* con la adición del compuesto DMHDA

Para conocer el efecto que tiene el compuesto DMHDA sobre la actividad enzimática de *T. versicolor* se evaluó la producción de lacasa en fermentación sólida con las siguientes concentraciones 150 μM y 300 μM (DMHDA) y un control (sin DMHDA) mediante la reacción del ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) en medio basal (LBM) con la siguiente composición (g/L): KH_2PO_4 1.0; $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01; extracto de levadura 0.01; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ 0.001 y MnSO_4 0.001. El medio LMB se complementó con 0.1 % de ABTS y 1.6 % de agar, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y se añadió asepticamente un mililitro de una solución acuosa de glucosa al 20 % p/v esterilizada por separado a cada 100 ml de medio. Posteriormente, el medio se transfirió a cajas de Petri y se inoculó un propágulo de 5 mm de *T. versicolor*, después se incubaron las cajas Petri a 28 °C durante ocho días (Pointing, 1999; Xu y Yang, 2010). Se calculó el índice de potencia (IP) utilizando la siguiente ecuación (Ec. 1), se midió el diámetro de la colonia (Figura 5) de *T. versicolor* y el diámetro del halo de oxidación del ABTS (Chan et al., 2016). Para este experimento se realizaron ocho replicas para cada tratamiento.

$$\text{IP} = \frac{\text{Diámetro del halo de oxidación}}{\text{Diámetro de crecimiento del micelio}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

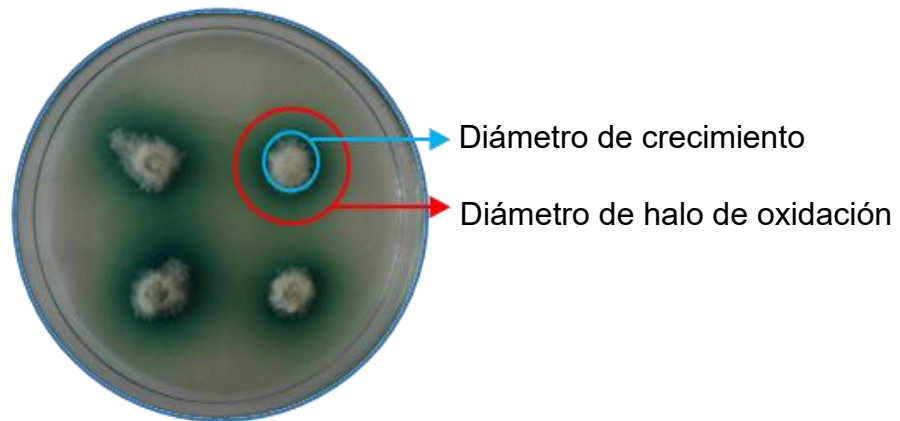


Figura 5. Actividad enzimática de *T. versicolor* mediante la reacción ABTS.

6.5 Determinación cualitativa de la actividad celulolítica de *Trametes versicolor* con la adición del compuesto DMHDA

Para conocer el efecto que tiene la DMHDA sobre la actividad enzimática de *T. versicolor* se evaluó la producción de enzimas celulolíticas (endoglucanasa y β -glucosidasa) en fermentación sólida con DMHDA 150 μ M y DMHDA 300 μ M y un control sin la adición de DMHDA. Para este experimento se utilizaron carboximetilcelulosa (CMC) al 1% como fuente de carbono 10g/L, NH_4Cl 1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L, CaCl_2 0.4g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, agar-agar 13g/L). Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente el medio se transfirió a cajas de Petri y se inoculó un propágulo de 5 mm de *T. versicolor*, después se incubaron las cajas Petri a 28 °C durante ocho días. Los halos de degradación fueron revelados con rojo congo al 0.1% y NaCl 0,1 M, se le agrego aproximadamente 3 mL de rojo congo y se dejaron actuar por 15 minutos en agitación y posteriormente se descartó el exceso y se le agrego 2mL NaCl 0.1 M por 15 minutos y se descartó nuevamente el exceso (**Pointing, 1999**). Finalmente se tomaron las medidas correspondientes del diámetro de la colonia de *T. versicolor* y el diámetro del halo de oxidación, con ambos valores se calculó (Ec. 1) el índice de potencia (IP) dividiendo el diámetro del halo de oxidación entre el diámetro de crecimiento del micelio (**Chan et al., 2016**). Para este experimento, se realizaron ocho replicas para cada tratamiento.

6.6 Crecimiento de *Trametes versicolor* en medio líquido polipeptona CAS con la adición del compuesto DMHDA

En este experimento se utilizaron matraz de Erlenmeyer de 50 ml de capacidad que contenían 30 ml del medio líquido polipeptona CAS, previamente esterilizados en una autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Los tratamientos quedaron de la siguiente manera: a) Tratamiento 1 (medio de cultivo), b) Tratamiento 2 (*T. versicolor* sin DMHDA), c) Tratamiento 3 (*T. versicolor* adicionado con 50 µM de DMHDA), d) Tratamiento 4 (*T. versicolor* adicionado con 150 µM de DMHDA), e) Tratamiento 5 (*T. versicolor* adicionado con 300 µM de DMHDA). A cada uno se le adicionó un disco de micelio de *T. versicolor* (8 días de crecimiento) de 5 mm de diámetro y se dejaron en agitación. Se llevaron a cabo experimentos de 8, 15, 30, 45 y 60 días y se mantuvieron en una incubadora microbiológica a 32°C; con 3 réplicas para cada tratamiento (Tabla 1).

Cada uno de los tratamientos se homogenizaron en una mezcladora vórtice, posteriormente se tomaron muestras de 200 µl de cada tratamiento con 6 réplicas y se analizaron en el espectrofotómetro para microplacas (Multiskan™ Go) a una longitud de onda 595 nm y se analizaron los datos de: 8, 15, 30, 45 y 60 días.

Tabla 1. *T. versicolor* crecidos en medio liquido polipeptona CAS

Experimentos	Revolución por minuto	Horas
8 días	130	192
15 días	130	360
30 días	130	720
45 días	130	1080
60 días	130	1440

6.7 Pérdida de masa de la madera de *Pinus* sp. tratada con la mezcla DMHDA-aceite de linaza expuesta a *Trametes versicolor*

6.7.1 Preparación de las probetas de *Pinus* sp.

Para el ensayo se utilizaron probetas dimensionadas (Figura 6). de acuerdo a los estándares AWPA 2003 (2.0 x 2.0 x 2.5 cm).

L



Figura 6. Probetas de *Pinus* sp.

6.7.2 Cultivo del hongo *Trametes versicolor*

Se utilizó hongo de la pudrición blanca *T. versicolor* proporcionada por el laboratorio de microbiología de la madera (FITECMA-UMSNH). Primero se inoculó en medio PDA donde se mantuvo a una temperatura de 28°C en una incubadora microbiológica durante 8 días.

6.7.3 Preparación del sustrato

El sustrato suelo se esterilizó 3 veces en autoclave (Aesa Modelo CV-300) a 120°C durante 30 minutos y se trasladó a una campana de flujo laminar donde se

depositaron en frascos de 320 ml con 100 g de sustrato, la cual se distribuyó de manera uniforme.

6.7.4 Bloques de alimentación de *Trametes versicolor*

Los bloques de alimentación se utilizaron madera de *Pinus* sp. (2.0 x 2.0 x 0.5 cm), se esterilizaron en autoclave (Aesa Modelo CV-300) a 120 °C durante 30 minutos y se trasladaron en la campana de flujo laminar, donde fueron colocadas dos piezas de madera (bloques de alimentación) en cada frasco (Figura 7) y se inoculo con *T. versicolor* a cada una de ellas. Finalmente se colocaron en una incubadora microbiológica a 28 °C (Felisa ®) y se mantuvieron durante 3 semanas hasta su uso (AWPA 2003).



Figura 7. Bloques de alimentación del hongo *T. versicolor*.

6.7.5 Montaje del ensayo Soil Block Test

Las probetas de *Pinus* sp. se le dio un tratamiento por inmersión simple durante 48 horas. Para diluir el aceite de linaza (50 %) se mezcló con trementina (aguarrás) y se utilizó la concentración de 450 µM de DMHDA. Los tratamientos quedaron de la siguiente manera: Tratamiento 1: Control (madera sin tratar); Tratamiento 2: (madera impregnada con ALC 100%); Tratamiento 3 (madera impregnada con

ALC al 50%), Tratamiento 4 (madera impregnada con ALC 100%-450 μM de DMHDA), Tratamiento 5 (madera impregnada con ALC 50%-450 μM de DMHDA), Tratamiento 6 (madera impregnada con ALDC 100%), Tratamiento 7 (madera impregnada con ALDC 50%), Tratamiento 8 (madera impregnada con ALDC 50%-450 μM de DMHDA), Tratamiento 9 (madera impregnada con ALDC 100%-450 μM de DMHDA) (Figura 8).



Figura 8. Probetas de *Pinus* sp. impregnadas durante 48 horas. a) DMHDA-aceite de linaza crudo; b) DMHDA-aceite de linaza doble cocido.

Después de ser tratadas las probetas de *Pinus* sp. (Figura 9) se calculó la absorción (Ec. 2) se determinó utilizando la fórmula (Ávila-Calderón *et al.*, 2012).

$$A = \frac{(P_2 - P_1)}{V} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

A= Absorción (kg/m^3)

P₁= Peso inicial de la probeta antes del tratamiento (kg)

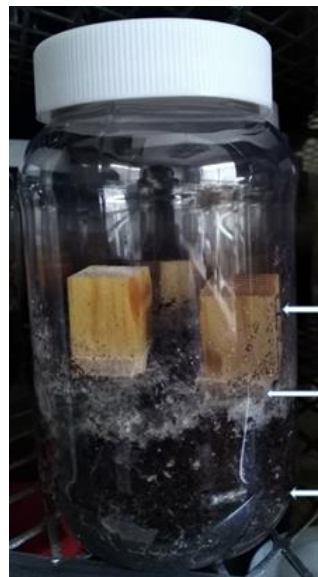
P₂= Peso final de la probeta después del tratamiento (kg)

V= Volumen de la probeta después del tratamiento (m³)



Figura 9. Probetas de *Pinus sp.* después de ser impregnadas.

Posteriormente se colocaron las probetas de *Pinus sp.* dos en cada frasco (Figura 10) teniendo 6 réplicas para cada tratamiento y finalmente se dejó en una incubadora microbiológica (Felisa ®) a 28 °C en oscuridad constante, durante 16 semanas (AWPA, 2003).



Probeta impregnada
Bloque de alimentación
Micelio de *Trametes versicolor*
Sustrato

Figura 10. Montaje de las probetas de *Pinus sp.*

6.7.6 Cálculo de la pérdida de masa

Una vez transcurrido este periodo de tiempo, el daño en las piezas de madera se calculó de acuerdo a la pérdida de masa (Ec. 3) e internalización del micelio de acuerdo a (**AWPA, 2003**).

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

W_1 = Masa acondicionada del bloque antes del ensayo

W_2 = Masa condicionada del bloque después de la prueba

6.7.7 Cortes anatómicos

Después de 4 meses de exposición de las probetas de *Pinus* sp. se realizaron cortes anatómicos en sentido transversal de cada uno de los tratamientos y se llevaron acabo de la siguiente manera: a) las probetas se cocieron; b) se realizaron los cortes de cada probeta ,c) se blanquearon con una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 7 minutos, d) se lavaron con agua destilada hasta eliminar por completo los residuos del blanqueador, e) se tiñeron con azul de astral por 12 horas para lograr un teñido uniforme, f) se lavaron con alcohol al 60 % para eliminar el exceso de tinte, g) posteriormente se deshidrataron en alcoholes graduales al 70, 80 y 96 %, por un tiempo de una hora, h) por último, se pusieron en alcohol absoluto por un tiempo de 5 minutos, posteriormente se pasaron a una solución de tolueno para aclararlos y pasar al montaje en portaobjetos; finalmente se observaron el 10 y 40x (**Guridi y García, 2000**).

6.7.8 Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en el experimento se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de Tukey $p \leq 0.05$ con el programa estadístico Stastica v7.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del compuesto DMHDA en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Trametes versicolor*

Los resultados obtenidos en el experimento de 8 días de crecimiento de *T. versicolor*, presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El control alcanzó un promedio 9.2 cm en comparación con el tratamiento de 50 μM (DMHDA) con 2.3 cm, con 0.87 cm la concentración de 150 μM y al adicionarle 450 μM inhibió crecimiento del organismo xilófago.

El experimento de 15 días se presentó diferencias estadísticas significativas en los tratamientos. El hongo *T. versicolor* (control) e igual que el experimento anterior alcanzo un promedio de 9.2 cm, seguida de 50 μM con 4.3 cm, 150 μM con promedio 1.65 cm y la adición DMHDA 450 μM presenta un efecto antifúngico.

A los 30 días el experimento se presentó diferencias estadísticas significativas, presentando un comportamiento similar que los ensayos anteriores, el tratamiento control se mantuvo con promedio de 9.2 cm y al aumentarle la concentración a 450 μM inhibió por completo el desarrollo micelial del hongo.

En cuanto al experimento de 45 días se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con y sin la adición del compuesto DMHDA. El tratamiento control se mantiene con promedio 9.2 cm y la concentración 50 μM de 7.65 cm. Al aumentarle la dosis a 150 μM alcanzo 5.95 cm, a una concentración 450 μM de DMHDA no se desarrolló el hongo.

Finalmente, el experimento de 60 días se presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los resultados son similares a los reportados anteriormente, el control con 9.2 cm y con 8 cm la concentración 50 μM y al triplicarle la dosis a 150 μM con 5 cm y la a concentración de 450 μM de DMHDA inhibió por completo el desarrollo de *T. versicolor* (Figura 11). A mayor concentración del compuesto

DMHDA mayor se vio reflejado el efecto en el diámetro de *T. versicolor* hasta llegar a inhibirlo por completo.

En la figura 12 muestra las imágenes del hongo crecidas en las diferentes concentraciones donde claramente se observa el efecto antifúngico del compuesto DMHDA. La concentración 450 μM de DMHDA inhibió el crecimiento de *T. versicolor*; al reinocular en medio PDA (100%) teniendo las mismas condiciones (28 °C en una incubadora) no se desarrolló después de 60 días (Figura 13).

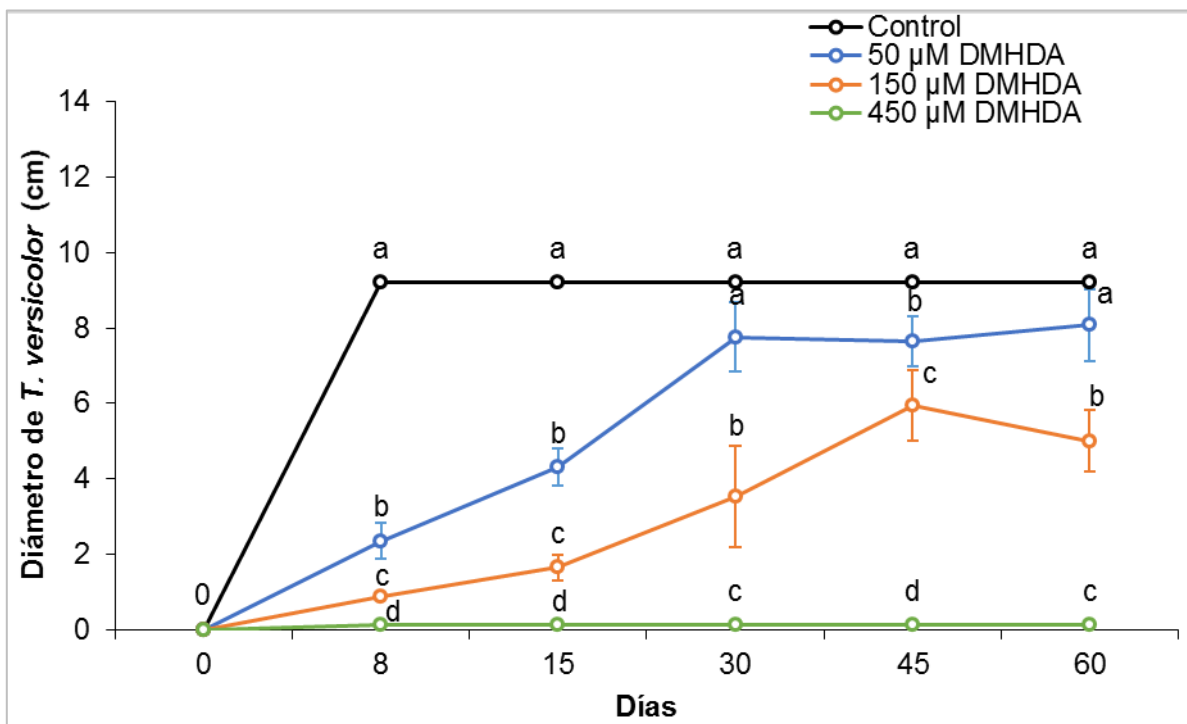


Figura 11. Diámetro de *T. versicolor* crecidos en las diferentes concentraciones de la DMHDA. Para este análisis se utilizaron datos de 8, 15, 30, 45 y 60 días (n=5).

Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey $p \leq 0.05$).

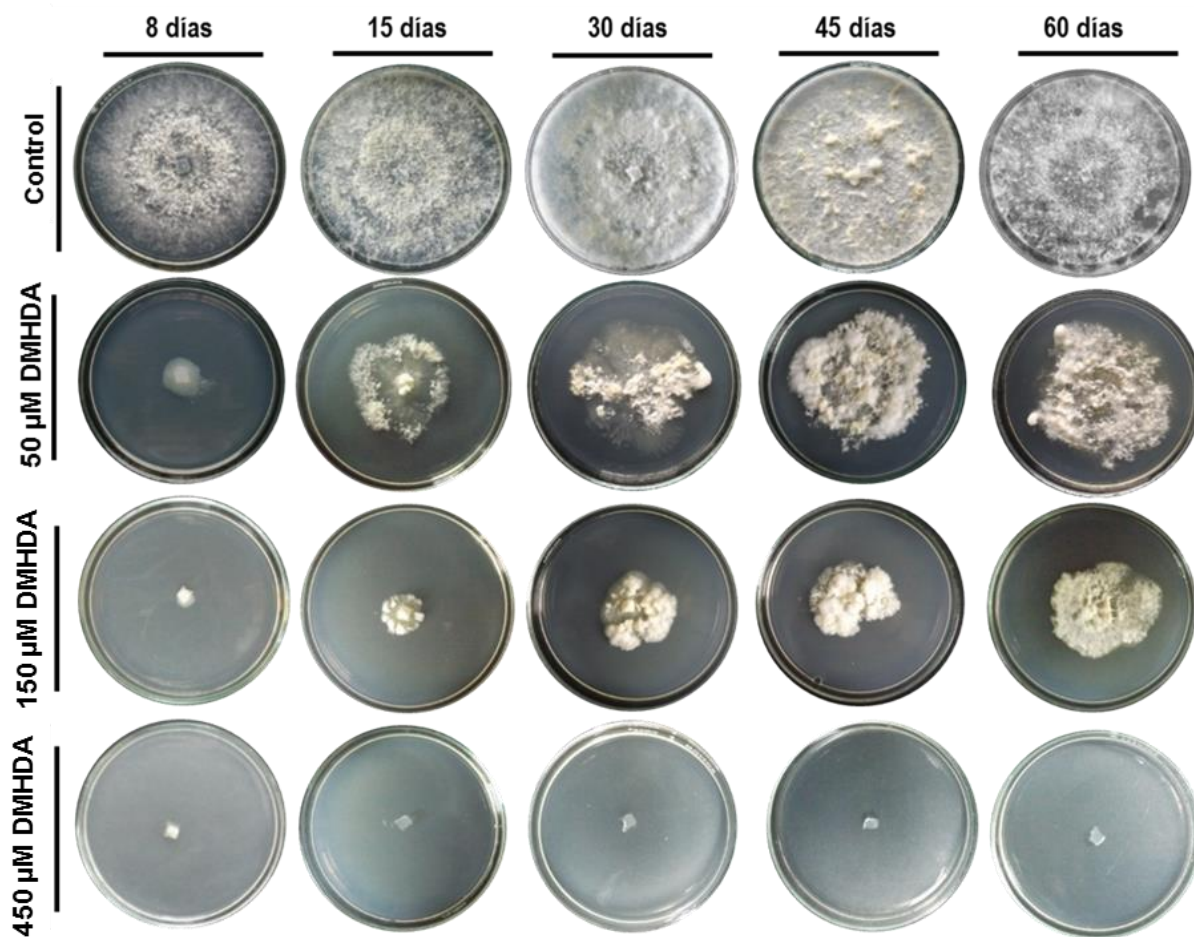


Figura 12. Imágenes representativas de *T. versicolor* de 8, 15, 30, 45 y 60 días; crecidos en las diferentes concentraciones del compuesto DMHDA.

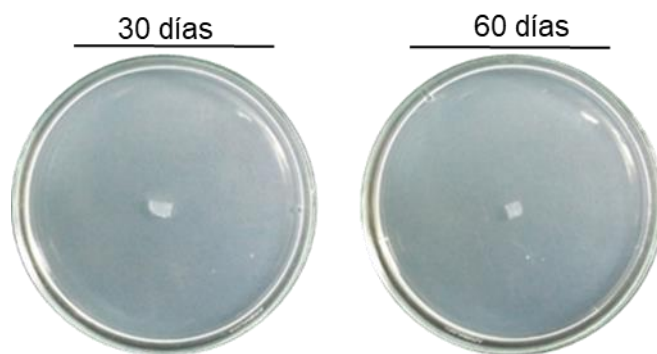


Figura 13. Reinoculo de *T. versicolor* crecidos en medio PDA (n=5).

7.2 Micrografía de *Trametes versicolor*

El análisis de micrografía electrónica de barrido reveló que el compuesto dimetilhexadecilamina afectó el crecimiento del hongo; reflejándose en la morfología y la densidad de *T. versicolor*. En la Figura 14 muestra deformaciones del micelio con 50 μM DMHDA y con 150 μM DMHDA se nota mayor el cambio morfológico en comparación con el control (sin DMHDA). En el objetivo 3000x es notorio el efecto del compuesto dimetilhexadecilamina en el desarrollo micelial del hongo xilófago.

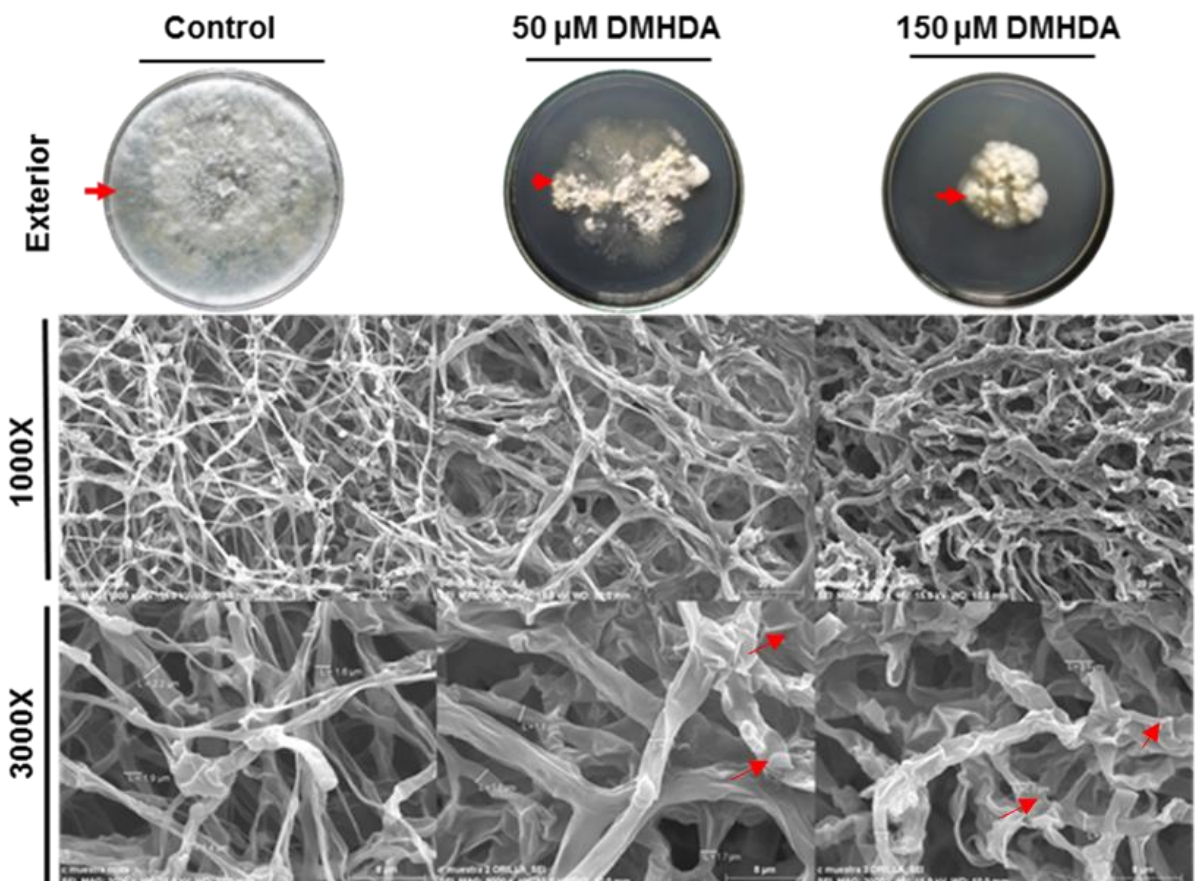


Figura 14. Micrografía de *T. versicolor* observadas en el microscopio electrónico de barrido: objetivos 1000x y 3000x (n=3). La muestra se tomó en el exterior (flecha roja).

La muestra tomada de *T. versicolor* en el centro de la caja Petri (flecha roja) la presencia del compuesto DMHDA en el medio de cultivo se pudo apreciar deformaciones en el micelio del organismo. La dosis 50 μM provocó engrosamiento en el micelio del hongo (flecha roja) al igual que la concentración de 150 μM DMHDA (Figura 15).

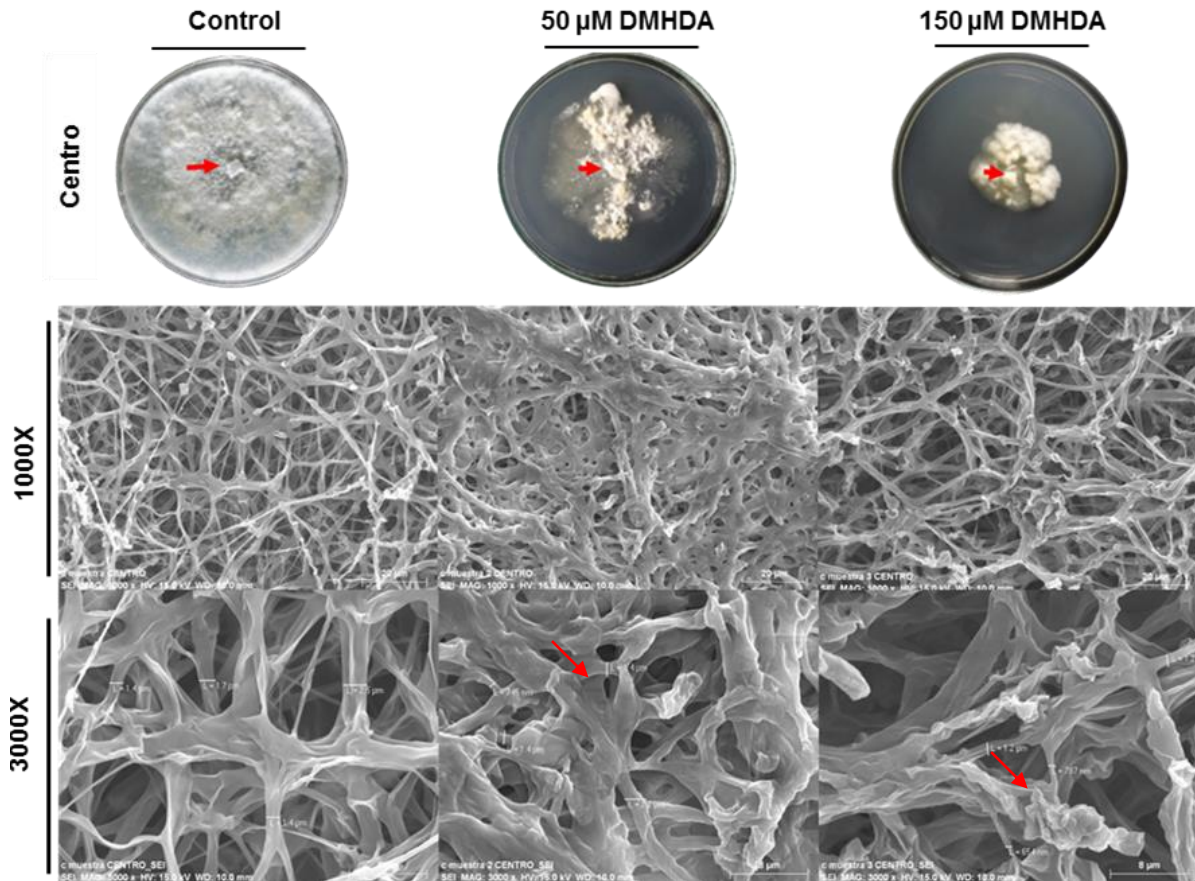


Figura 15. Micrografía de *T. versicolor* observadas en el microscopio electrónico de barrido: objetivos 1000x y 3000x (n=3). La muestra se tomó en el centro (flecha roja).

7.3 Densidad óptica de *Trametes versicolor* en medio líquido polipeptona CAS con la adición del compuesto DMHDA

Otra de las variables evaluadas en este trabajo, fue la densidad de *T. versicolor* con la adición DMHDA en diferentes concentraciones. En los experimentos de 8,

15, 30, 45 y 60 días. Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (control, 50 y 150 y 450 μM) la mayor densidad se obtuvo con los controles en relación a las diferentes concentraciones de DMHDA (Figura 16). En la figura 17 muestra imágenes representativas del crecimiento de *T. versicolor* en el medio líquido, donde el tratamiento control es mayor la densidad del micelio con forma irregular (flecha roja). En los tratamientos con DMHDA en los matraces se formaron sedimentos de color café (flecha azul) y no se desarrollaron los hongos.

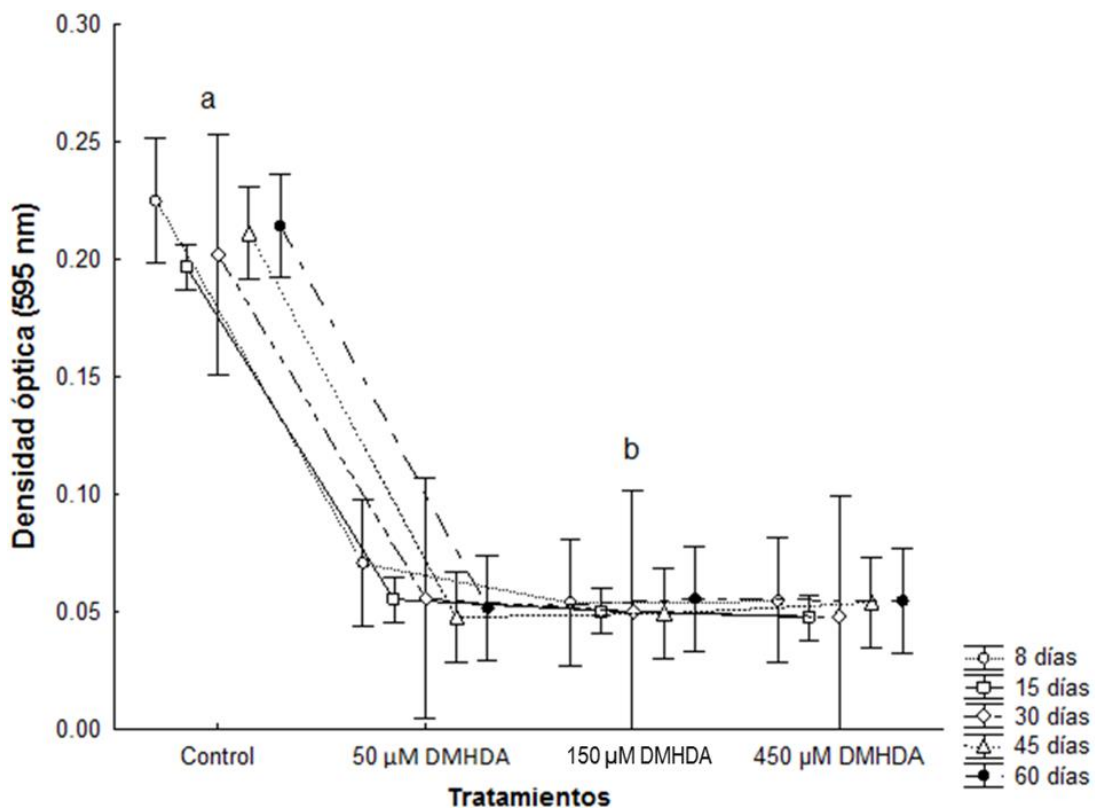
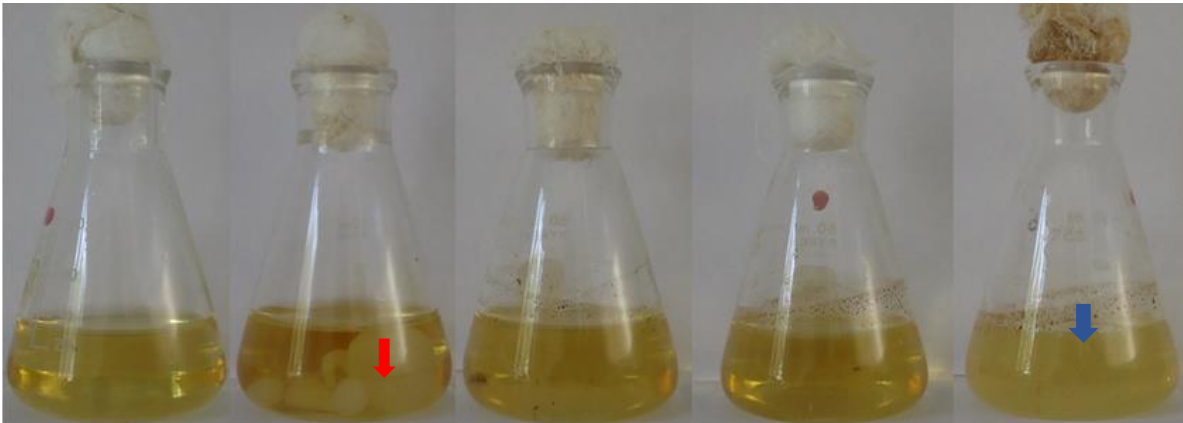


Figura 16. Densidad óptica de *T. versicolor* crecidos en las diferentes concentraciones de DMHDA (n=6). Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey $p \leq 0.05$).



Medio de cultivo Control 150 µM DMHDA 300 µM DMHDA 450 µM DMHDA
Figura 17. *Trametes versicolor* crecidas en medio polipeptona CAS, a los 60 días.

7.4 Determinación cualitativa de la actividad lacasa de *Trametes versicolor* con la adición de la DMHDA

En este ensayo la actividad enzimática cualitativa lacasa de *T. versicolor* se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos control, 150 µM y 300 µM de DMHDA. La mayor actividad de la enzima lacasa mostró el control en comparación con los tratamientos 50 y 150 µM de DMHDA. Al aumentar la concentración del compuesto DMHDA disminuye la actividad de la enzima (Figura 18). El halo verde corresponde a la oxidación de ABTS por la enzima lacasa producida por el hongo *T. versicolor* (Figura 19).

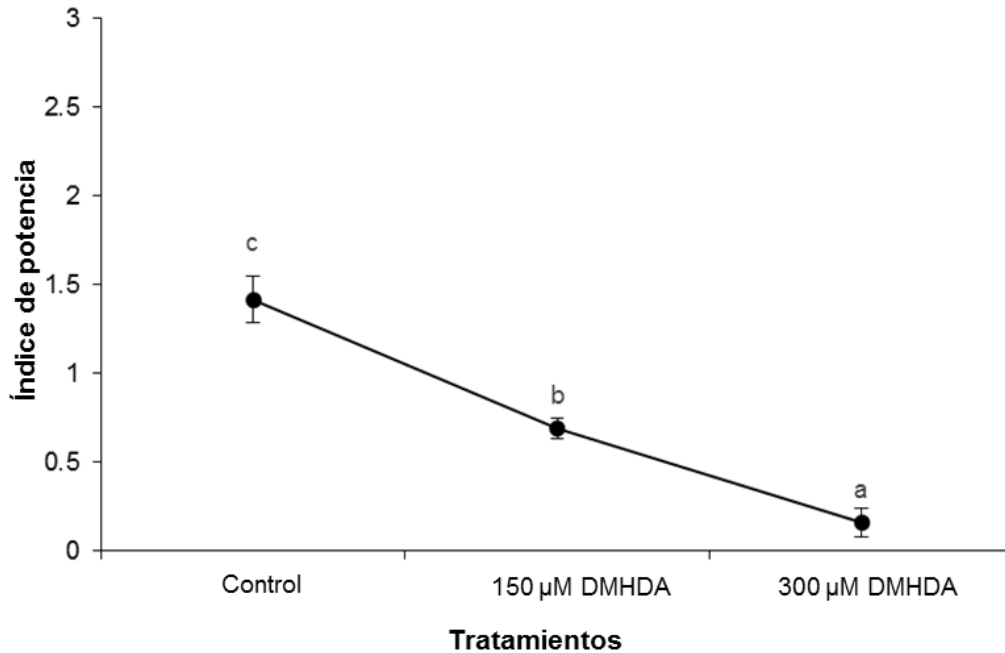


Figura 18. Índice de potencia de la actividad cualitativa lacasa en *T. versicolor* con la adición de las diferentes concentraciones de la DMHDA (150, 300 μ M) y el control sin la DMHDA (n=8). Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey $p \leq 0.05$).

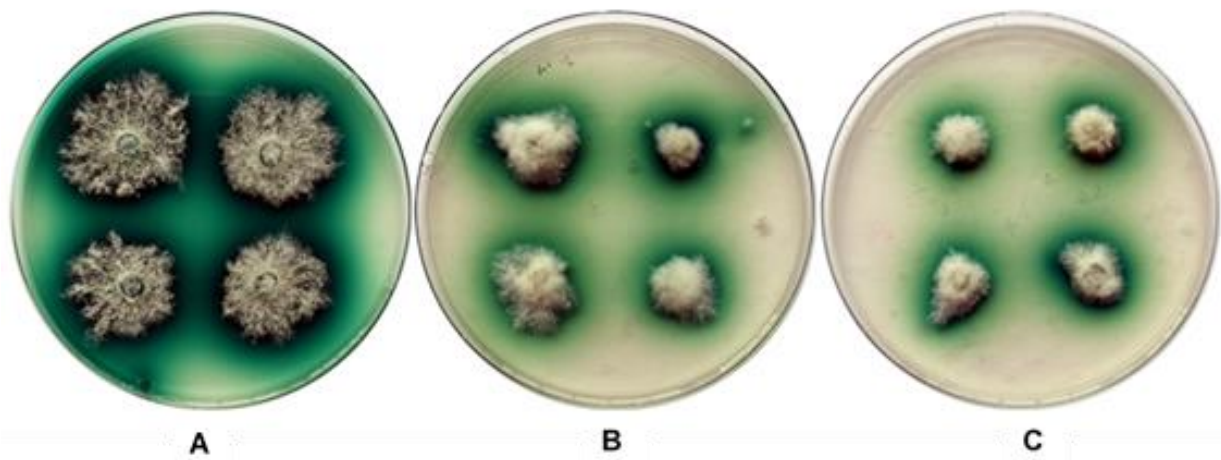


Figura 19. Actividad cualitativa de la lacasa de *T. versicolor*; A) control, B) 150 μ M DMHDA y C) 300 μ M DMHDA. El halo verde corresponde a la oxidación de ABTS por la enzima lacasa.

7.5 Determinación cualitativa de la actividad enzimática celulolítica de *Trametes versicolor* con la adición de la DMHDA

El experimento de la actividad enzimática celulolítica de *T. versicolor* presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos control, 150 y 300 μM DMHDA (Figura 20). La mayor actividad celulolítica se presentó en los tratamientos con adición del compuesto DMHDA en comparación con el tratamiento control. Al observar la figura 21 el hongo *T. versicolor* hay mayor actividad enzimática celulolítica viéndose reflejado en la disminución del tamaño de los halos del organismo xilófago.

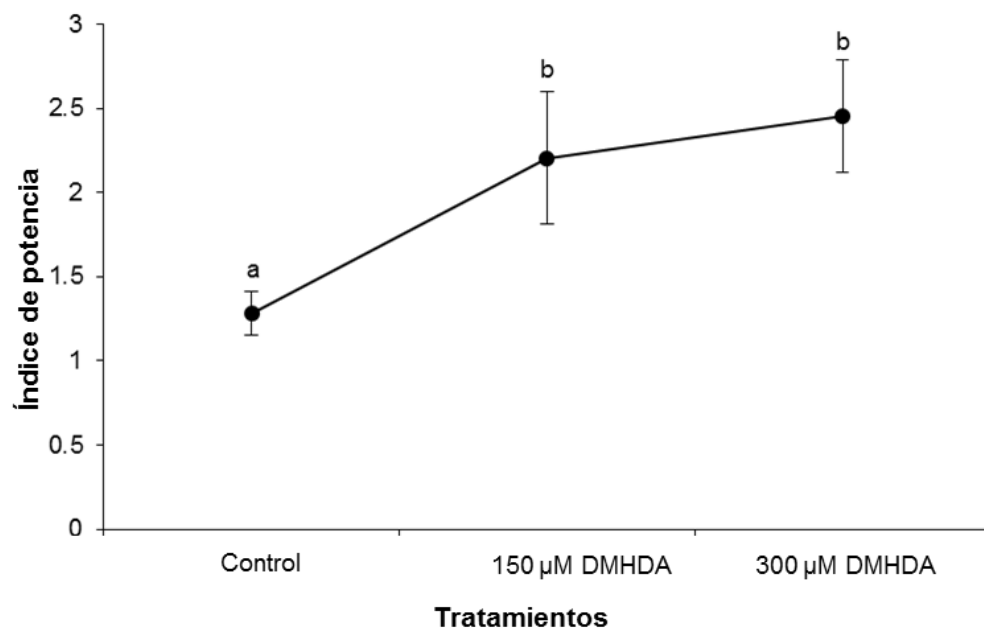


Figura 20. Índice de potencia de la actividad cualitativa celulolítica en *T. versicolor* con la adición de las diferentes concentraciones de la DMHDA (150, 300 μM) y el control sin la DMHDA (n=8). Letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey $p \leq 0.05$).

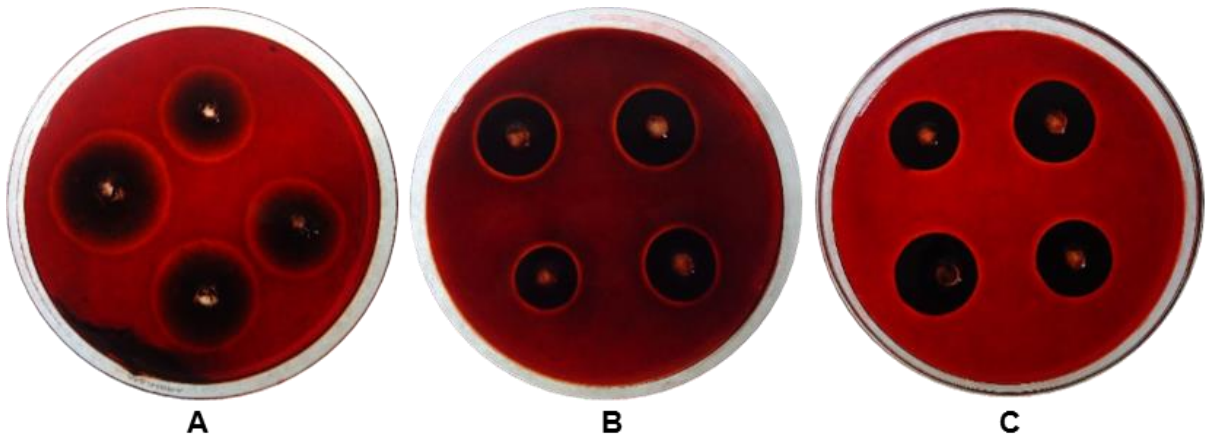


Figura 21. Actividad celulolítica de *T. versicolor* con la presencia del compuesto DMHDA; A) control, B) 150 μM DMHDA y C) 300 μM DMHDA.

7.6 Absorción de la mezcla DMHDA-aceite de linaza crudo

En la figura 22 se presentan los valores de absorción DMHDA-aceite de linaza crudo (ALC). Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos al diluir ALC al 50% presentó una absorción de 0.20 g/cm^3 y ALC 100% fue de 0.33 g/cm^3 , presentando mayor absorción en comparación con los demás tratamientos. La mezcla DMHDA-ALC 50% presentó menor absorción respecto al tratamiento ALC 100%.

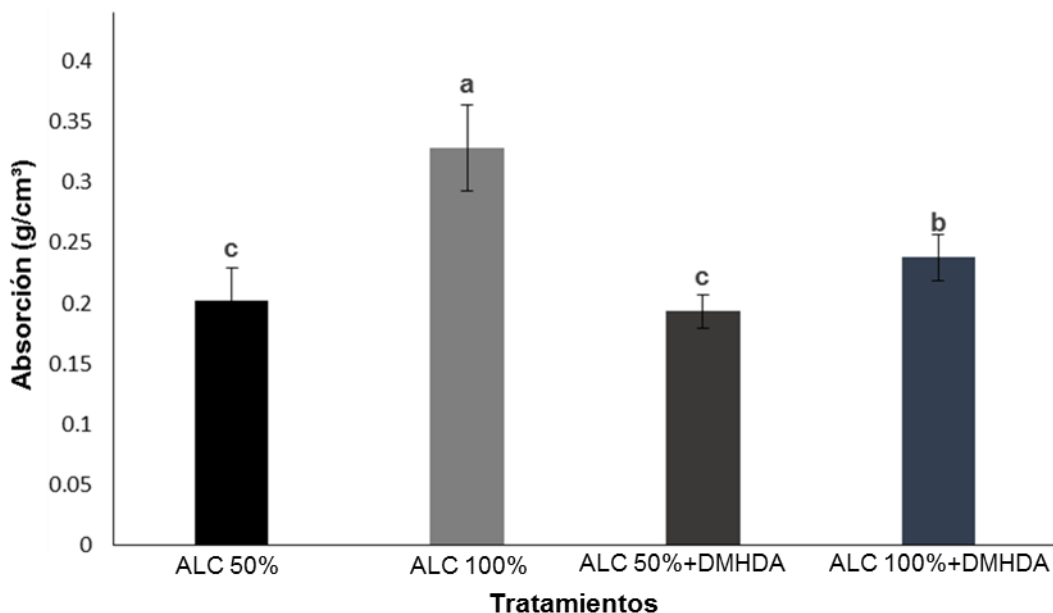


Figura 22. Absorción de la mezcla DMHDA-ALC aplicadas en las probetas de *Pinus* sp. (n=12). Tratamientos con la misma letra muestran que no se tienen diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$).

7.7 Absorción de la mezcla DMHDA-aceite de linaza doble cocido

La absorción de la DMHDA-aceite de linaza doble cocido (ALDC) si presentó diferencias estadísticas significativas. El ALDC 50% presenta valores absorción de 0.30 g/cm³ y el ALDC 100% obtiene un valor de 0.33 g/cm³. La mezcla DMHDA-ALDC al 50% presenta un promedio 0.31 g/cm³. En cuanto a la mezcla DMHDA-ALDC 100% presento valor absorción superior a los demás tratamientos de 0.334 g/cm³ (Figura 23).

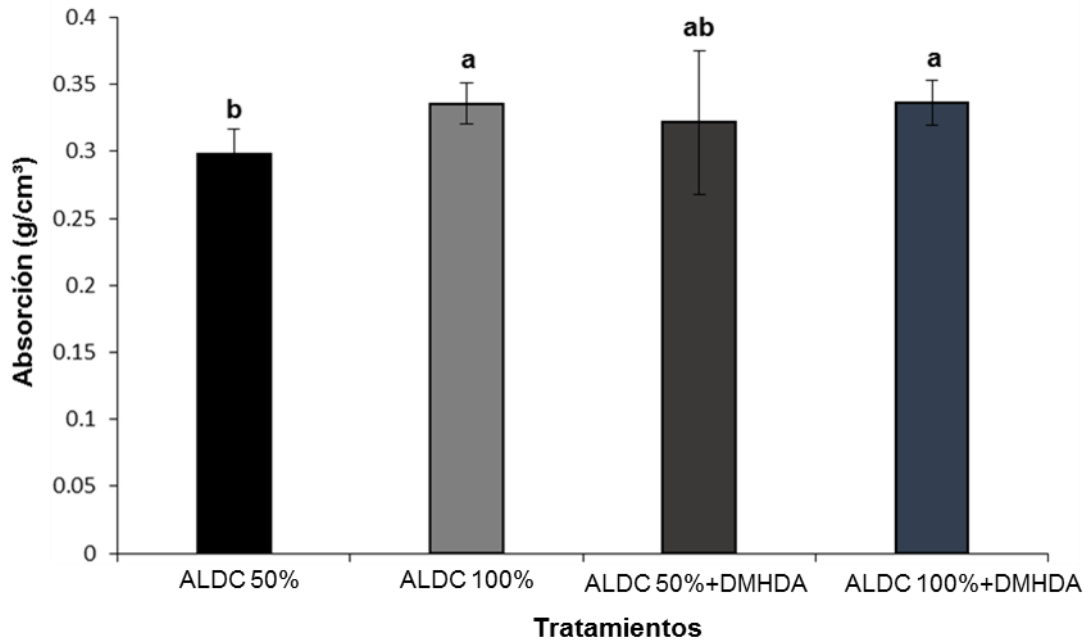


Figura 23. Absorción de la mezcla DMHDA-ALDC aplicadas en las probetas de *Pinus* sp. (n=12). Tratamientos con la misma letra muestran que no se tienen diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$).

7.8 Pérdida de masa de las probetas de *Pinus* sp. después de 4 meses de exposición en *Trametes versicolor*

Las características microscópicas de las probetas después de 4 meses de exposición en *T. versicolor*, el tratamiento control (sin hongo) no se detectó la presencia del organismo xilófago. En cuanto al control expuesto a *T. versicolor* (flecha roja) es notorio el daño que ocasiona el hongo destruyendo la pared celular de la madera (Figura 24).

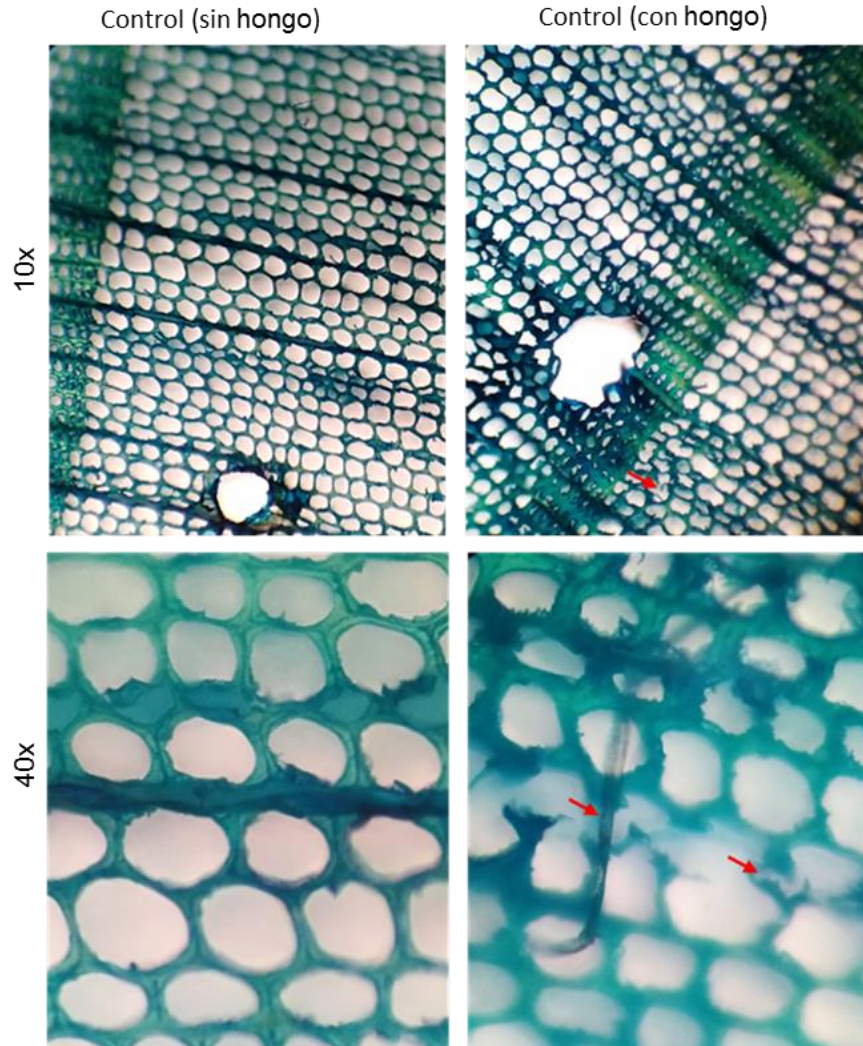


Figura 24. Probetas de *Pinus* sp. con y sin presencia de *T. versicolor* (flecha roja).

Como se muestra en la figura 25 la madera sin tratar expuesta a *T. versicolor*, mostró un porcentaje de pérdida de masa de 10.1 % presentando diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos: ALDC 100% y con DMHDA-ALDC 100% presento promedio de 6.25 % y 5.75 %. El ALCD 50% y DMHDA-ALCD 50% presento pérdida de masa de 6.56% y 6.11% respectivamente. En la figura 26 se puede observar la aplicación de DMHDA-ALDC no se desarrolló el hongo *T. versicolor* observándose tapones en la estructura celular (flecha roja).

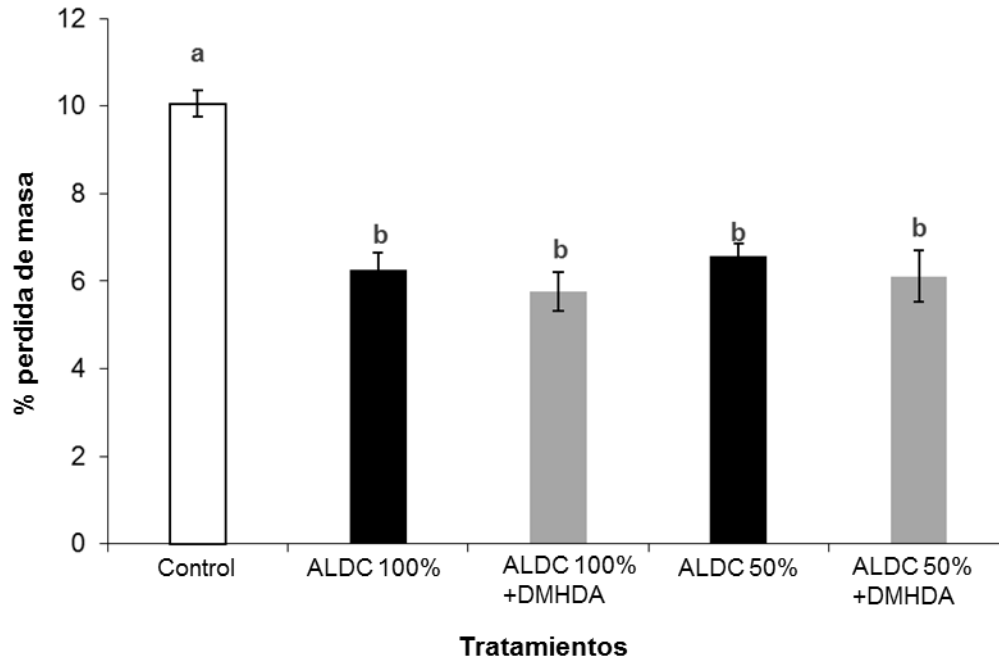


Figura 25. Pérdida de masa de las probetas de *Pinus* sp. impregnadas con la mezcla DMHDA-ALDC expuesta a *T. versicolor* (n=12). Tratamientos con la misma letra muestran que no se tienen diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$).

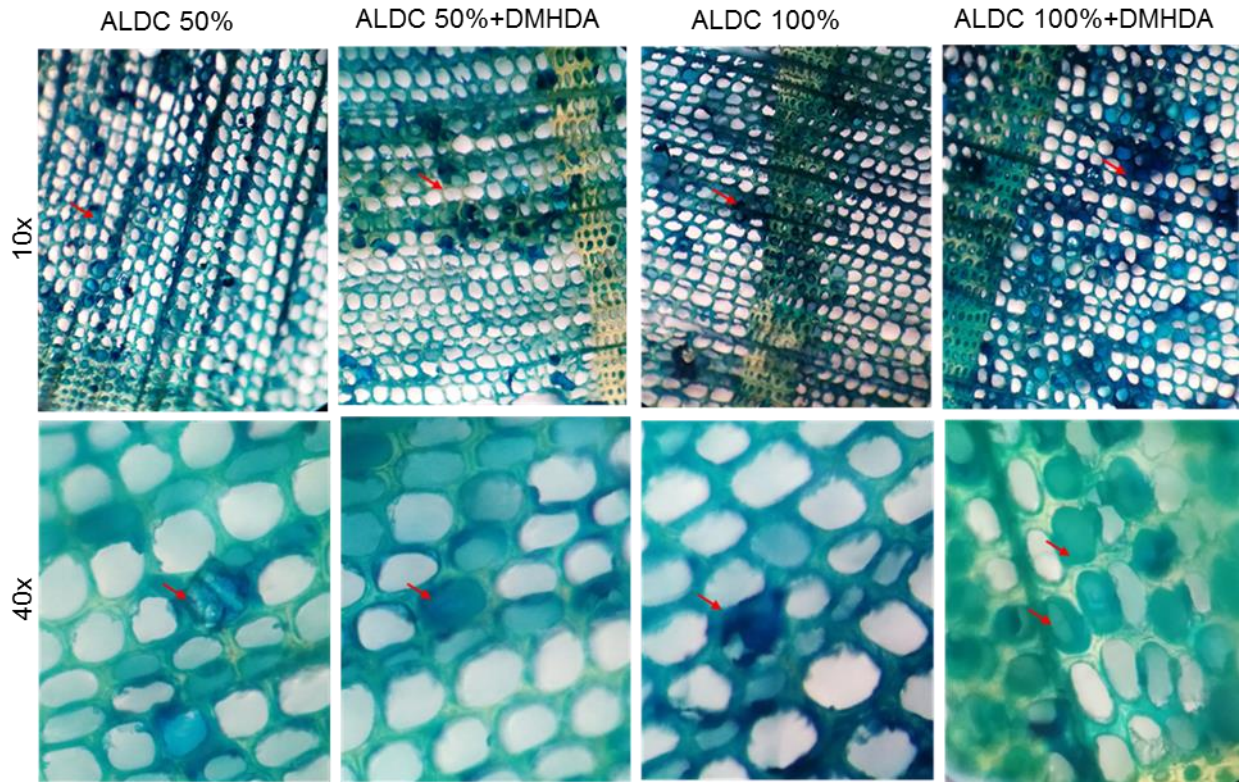


Figura 26. Cortes anatómicos de las probetas de *Pinus* sp. tratadas con el compuesto DMHDA-ALDC.

En la figura 27 no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El control mostró una pérdida de masa promedio de 10.05 % respecto a ALC 100% y DMHDA-ALC100% presento valores de 8.03 % y 7.83 % respectivamente. El ALC 50 % y DMHDA-ALC 50% presento valores de 7.83 % y 7.93 % después de 4 meses de exposición con el hongo *T. versicolor*. En la figura 28, nos muestra el desarrollo del micelio del organismo en la estructura celular (flecha roja) sin importar los diferentes tratamientos aplicados en las probetas de *Pinus* sp.

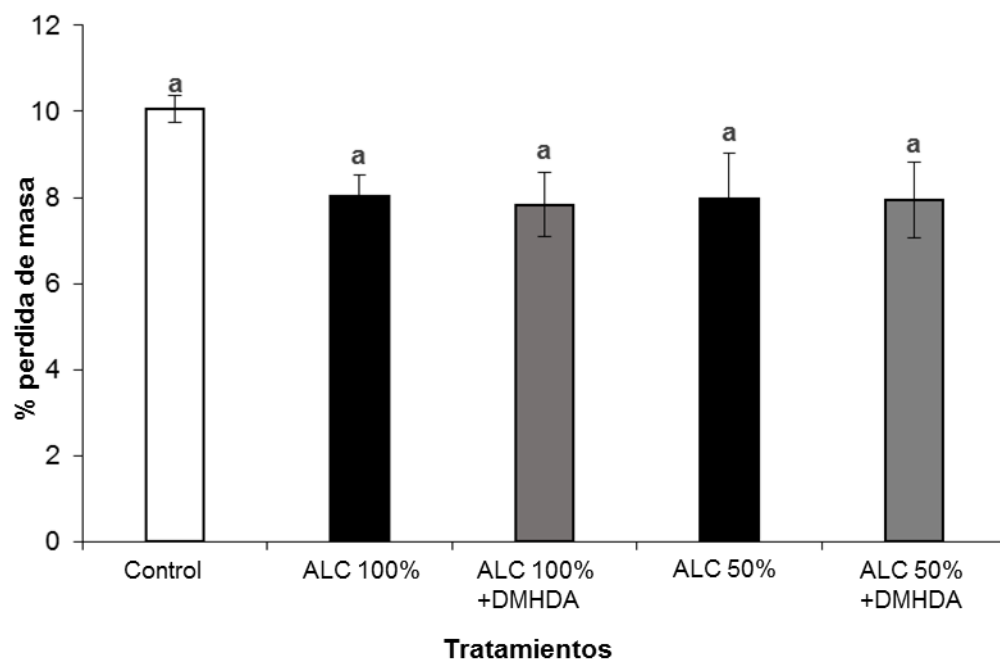


Figura 27. Pérdida de masa de las probetas de *Pinus* sp. impregnadas con la mezcla DMHDA-ALC expuesta a *T. versicolor*. Tratamientos con la misma letra muestran que no se tienen diferencia significativa, Tukey ($p \leq 0.05$).

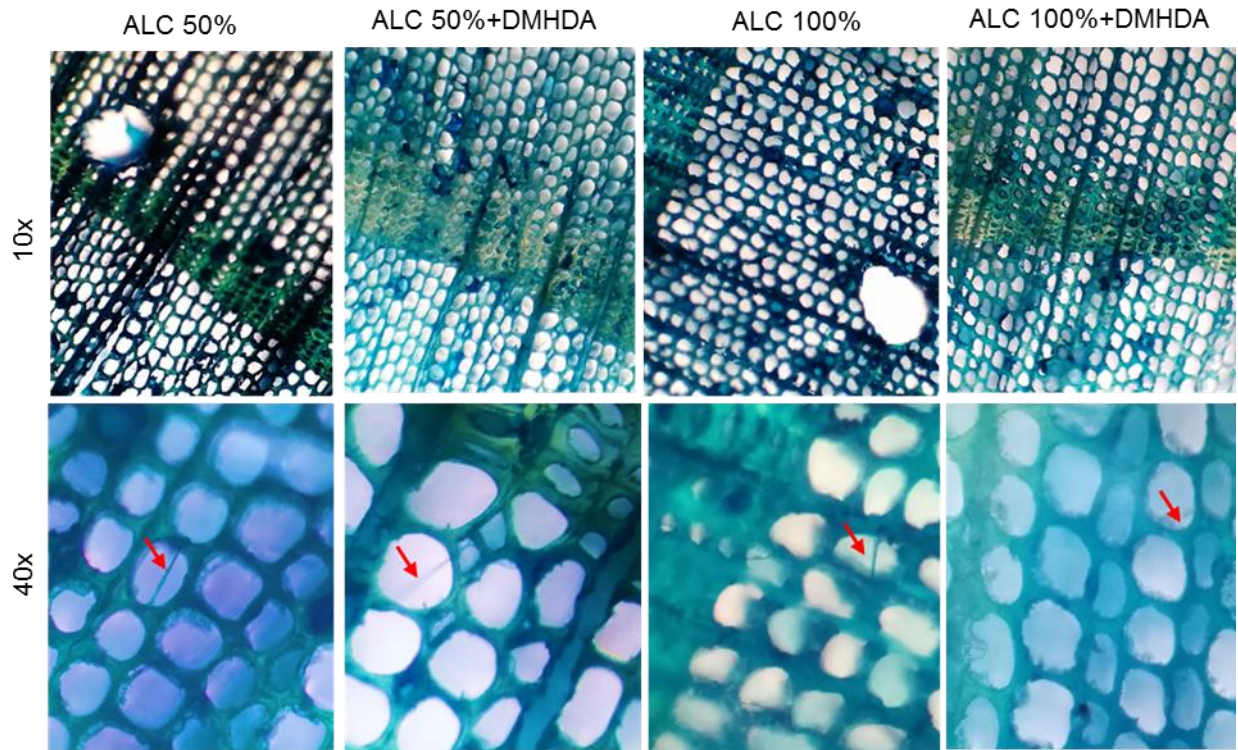


Figura 28. Cortes anatómicos de las probetas de *Pinus* sp. tratadas con el compuesto DMHDA-ALC.

8. DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados el hongo xilófago *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*) en sistemas de cajas Petri con papa dextrosa agar; concentraciones favorecen su desarrollo. En este trabajo, utilizando el medio PDA-disminuido (25 %), se intentó simular las condiciones naturales del desarrollo del hongo *T. versicolor*, a pesar de la baja cantidad de nutrientes disponibles en el medio de cultivo, se adaptó correctamente a las condiciones del medio. De acuerdo a **Manan et al., 2021**, mencionan que los hongos xilofagos especialmente los de pudrición blanca, tienen la facultad de desarrollarse en diferentes condiciones. La limitación de nutrientes y la competencia entre microorganismos, los hongos tienden a desarrollarse en su estructura micelial, abarca mayor superficie para la absorción de nutrientes y altera la composición química del sustrato (**Hatakka ,1994; Selbmann et al., 2013**). El hongo *T. versicolor* puede adaptarse en diferentes condiciones, la insuficiencia de nutrientes, es capaz de liberar enzimas lignolíticas, para la degradación de la lignina (**Civzele et al., 2023**). De acuerdo a **Levicoy y Morales 2023** nos mencionan; el hongo *T. versicolor* tiene la capacidad de desarrollarse en la madera de (acacia de madera negra) *Acacia melanoxylon* sin importar las condiciones; desarrollan su micelio y por lo consiguiente descomponen las estructuras químicas del material leñoso.

El compuesto DMHDA es un amino lípido de 16 átomos de carbono de longitud del grupo lipídico, a una concentración de 450 μ M inhibió el desarrollo del hongo, y el mecanismo por el cual este compuesto inhibe el crecimiento de algunos fitopatógenos, aún no se ha determinado del cómo actúa este compuesto sobre la membrana celular u otro organelo de *T. versicolor* o cualquier otro microorganismo. En un trabajo realizado por **Montejano-Ramírez et al., 2020** nos mencionan, el modo de acción del compuesto DMHDA contra los patógenos es mediante la vía ácido jasmónico (AJ). Existen trabajos con compuestos similares a la DMHDA sugieren que este podría ser el mecanismo de acción sobre la membrana celular fúngica (**Janusz et al., 2017**). Los compuestos orgánicos volátiles, su modo de acción contra los patógenos reprime el desarrollo, modifica

la morfología y daña la estructura celular principalmente el ADN (**Zhang et al., 2021**). No obstante, tomando como referencia biocompuestos de similar estructura química, el aislado de *Pseudomonas fluorescens* ZX emiten disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo; en condiciones *in vitro* reprime el crecimiento de *Penicillium italicum* sufriendo modificaciones en las hifas y estructura celular (**Wang et al., 2021**). Mediante un análisis de cromatografía de gases se identifico: 2,3 butanodiona emitida por la bacteria *Bacillus velezensis* con fuerte actividad fungistático contra el hongo *Alternaria iridialustralis* reprime la esporulación y modifica la estructura micelial (**Ling et al., 2022**). Los COV que produce *Bacillus amyloquefaciens* 2,3-butanodiona, acetoína, 5-metil-heptanona, 2-heptanona y 3-metilbutanol inhiben el desarrollo micelial de patógenos de importancia agrícola como son: *Bortritys cinirea*, *Alternaria brassicicola*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium longisporum* (**Asari et al., 2016**).

También, existen evidencias que los COV de origen bacteriano como la 2-nonanone y 2-undecanone inhiben el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*; modificando las hifas y alterando la estructura química del patógeno (**Giorgio et al., 2015**). De igual manera **Ayed** en **2021** nos menciona un aislado de *Streptomyces lydicus* emite COV entre los más destacados se encuentran: 3-carene 2,5-dione; geosmina, beta-cubebeno ,2-(1,1-dimetiletilo)-6-metilo, capaces de inhibir el desarrollo de fitopatógenos de importancia agrícola; alterando su estructura celular y daños en su morfología. Los aislado de *Bacillus methylotrophicus* y *Bacillus thuringiensis* emiten una gran variedad de COV de diferentes perfiles, al estar en exposición con los fitopatógenos comunes de cultivos agrícolas, reprimen el crecimiento micelial, modificando sus estructuras morfológicas (**He et al., 2020**).

Los cambios morfológicos de *T. versicolor* con 30 días de crecimiento vistos en las imágenes del MEB, indican un importante estrés fúngico y engrosamiento en las hifas provocados por el compuesto DMHDA (50 y 150 μ M). Los COV actúan de diferentes maneras pueden causar alteración en la estructura celular, la formación

de cavidades, destrucción de hifas, daño en el metabolismo, afectaciones en importantes vías metabólicas de los patógenos (**Almeida et al., 2023**). Los ácidos grasos aprílico y láurico tienen efecto fungistático en el hongo *Malassezia furfur*, alteran la morfología y sufren modificaciones en la membrana plasmática del patógeno (**Bhattacharyya et al., 2020**). De igual manera **Pohl et al., 2011**, nos mencionan, los ácidos grasos tienen efecto antifúngico en los hongos patógenos, actúan en la membrana plasmática y en las diferentes partes de la estructura celular de los microorganismos. Actualmente el mecanismo de acción de los COV sobre los fitopatógenos, es a través de cambios en la estructura celular (pared y membrana), rompimiento intracelular y a consecuencia se produce un estrés oxidativo (**Zhao et al., 2022**).

La adaptación vista en *T. versicolor* bajo condiciones de 50 μM (DMHDA) en un periodo de 60 días fue interesante, sin embargo, a 150 y 450 μM no logró adaptarse de igual forma. Los hongos de pudrición de la madera, a lo largo de la historia ha sabido adaptarse a diferentes sustratos, que pudiera estar relacionado con las enzimas oxidativas e hidrolíticas que utilizan para degradar los componentes químicos de la madera (**Morel et al., 2013**). El hongo *Aspergillus nidulans* mediante mecanismos de asimilación acoplada, es capaz de llevar a cabo la fermentación de amoníaco para tolerar baja presencia de oxígeno (**Takasaki et al., 2004**). Por las características fisicoquímicas del compuesto DMHDA (volatilidad a temperatura ambiente) y al corto periodo de exposición 60 días, el hongo *T. versicolor* pudo adaptarse a la condición mínima ensayada, además que, bajo condiciones experimentales similares se ha reportado el compuesto DMHDA en una concentración 50 μM tampoco presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Hypocrea* sp. y *Fusarium* sp. (**Orozco-Mosqueda et al., 2015**).

La actividad enzimática de *T. versicolor* disminuye con la adición del compuesto DMHDA en el medio basal LBM y en nuestros resultados del experimento *in vitro* fue evidente el efecto antifúngico; el modo de acción aún no se conoce, pero

podría estar actuando en la estructura celular (quitina) del hongo xilófago. La quitina es un polímero *N*-acetilglucosamina y su importante está en la estructura celular de los hongos, le proporciona rigidez, soporte; y desarrollo de la pared celular (**Goldman y Vicencio; 2012; Sánchez-Arreguin et al., 2022**). En cuanto a la actividad enzimática celulolítica (endo- β -glucanasa; exo- β -glucanasa; y β -glucosidasa) presento mayor actividad con la adición del compuesto, (solvente alcohol etílico) lo cual nos indica que el medio CMC-DMHDA favoreció el desarrollo del hongo *T. versicolor* esto podría estar relacionado a la actividad celulolítica en específico (**Agudelo et al., 2013**).

De los dos aceites utilizados la mayor absorción se presentó con el ALDC sin importar los diferentes tratamientos y se pudo apreciar en los cortes anatómicos pudo haber funcionado como tapones en la estructura celular de la madera. En un trabajo realizado por **Perdoch et al., 2022** nos menciona, el aceite de linaza mezclada con viniltrimetoxisilano tratadas en la madera de dos especies de conífera, funciona como repelente contra el agua y mejoran la durabilidad contra el hongo *Coniophora puteana*. El aceite de linaza mezclada con bioaceite impregnadas en la madera reduce la absorción del agua y aumenta la resistencia del material contra los hongos pudrición café y blanca (**Temiz et al., 2013**). Concuerta lo mencionado por **Schneider 1980** que el aceite de linaza desplaza las moléculas de agua, absorbe menos cantidad; utiliza enlaces de hidrogeno presente en el material. Hay evidencia, el aceite de linaza impregnadas en la madera *Cupressus sempervirens* L. y *Acer campestre* L.; tratadas térmicamente se vuelve un material impermeable y mejoran las propiedades acústicas (**Kaya, 2023**).

Como se señaló con anterioridad, las concentraciones aplicadas de DMHDA en el trabajo (150 y 450 μ M), mostraron inhibir significativamente el crecimiento del hongo, al grado de reprimirlo en su totalidad (450 μ M). La curva de crecimiento dosis respuesta mostrada, indicó que la inhibición del hongo comenzó con DMHDA 50 μ M y aumentaba de acuerdo a la concentración del compuesto.

Empero, trasladar este resultado al sistema “Soil-Block Test” concentraciones inferiores a 450 μM no fueron efectivas para inhibir el crecimiento fúngico. Es decir, bajo esta estrategia experimental, la concentración de 450 μM mezclada con aceite de linaza crudo y doble cocido, al tratar las piezas de madera (*Pinus* sp) y después de 16 semanas de exposición en *T. versicolor* se obtuvo una menor pérdida de masa en comparación con el tratamiento control. Estudios realizados en donde se utilizan probetas de madera tratadas con aceite de linaza se ha visto que funcionan eficazmente como repelente de agua, ya que, al mantener el material libre de humedad se limita el establecimiento microbiano. Diferentes tratamientos basados en impregnación o aplicación de sustancias repelentes al agua como aceites, resinas, ceras o recubrimientos, tratamientos que protegen la luminaria celular pero no cambian sustancialmente las propiedades de la pared celular son de amplia distribución comercial y uso. En un trabajo realizado por **Tran-Ly et al., 2022** nos mencionan, la madera tratada con los aceites de origen vegetal impide que absorba el agua, forma una película y no permite el desarrollo del moho *Chaetomium globosum*. El aceite de tung y linaza tratadas en la madera, dificulta la absorción del agua y por lo tanto limita el desarrollo de los hongos de pudrición (**Humar y Lesar, 2013**), por la mezcla utilizada aceite de linaza - DMHDA es muy probable que la acción vista en el tratamiento se allá conseguido en sinergia, ya que fue claro el efecto inhibitorio de la DMHDA *in vitro*, limitando en desarrollo fúngico por dos mecanismos distintos.

Se sabe que una exposición directa de solventes orgánicos sobre los microorganismos puede inhibir su crecimiento, y como se explicó con anterioridad, el solvente utilizado para la dilución del DMHDA en aceite de linaza crudo y doble cocido fue la trementina. Es importante mencionar que no inhibió el crecimiento de *Trametes versicolor*, debido a que bajo las condiciones experimentales ensayadas se volatilizó. En un estudio realizado por **Ahmed et al., 2017**, utilizando brea de pino para tratar maderas de álamo y abedul; no presentaron variaciones en las propiedades físico-químicas del material, después de estar expuesto a los hongos *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium*. Cabe mencionar que en nuestro experimento

se utilizó como solvente la trementina y se tiene conocimiento que tiene un potencial para que sea utilizado en la preservación de la madera especialmente contra insectos xilófagos (**Ayebare, 2022**).

9. CONCLUSIÓN

El compuesto dimetilhexadecilamina en el sistema de cajas de Petri inhibió el crecimiento de *Trametes versicolor*.

La dimetilhexadecilamina como preservante no tuvo la misma eficiencia que la vista en condiciones *in vitro*, pero se pudo apreciar que la mezcla DMHDA-aceite de linaza doble cocido mostró menor pérdida de masa después de 4 meses de exposición de las probetas de *Pinus* sp.

10. RECOMENDACIONES

El aceite de linaza sería recomendable ser ensayado con diferentes solventes, antes de mezclarla con el compuesto DMHDA y de esa forma, sean impregnadas con madera de dimensiones mayores.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2002. Reseña Toxicológica de la creosota de madera, creosota de alquitrán de hulla y alquitrán de hulla. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Ahmed, S. A., Morén, T., Sehlstedt-Persson, M., & Blom, Å. (2017). Effect of oil impregnation on water repellency, dimensional stability and mold susceptibility of thermally modified European aspen and downy birch wood. *Journal of Wood Science*, 63, 74-82.
- Ahmed, W., Dai, Z., Zhang, J., Li, S., Ahmed, A., Munir, S., & Zhao, Z. (2022). Plant-microbe interaction: mining the impact of native *Bacillus amyloliquefaciens* WS-10 on tobacco bacterial wilt disease and rhizosphere microbial communities. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01471-22.
- AWPA. (2003) American Wood Preservers' Association Standard E10-01. "Standard method of testing wood preservatives by laboratory soil-block culture." *American Wood Preservers' Association Book of Standards*; 419-29.
- Agudelo, J. E., Merchán, Z. T. D., Zapata, N. J. G., y Muñoz, O. Y. M. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108-117.
- Ayebare, S. (2022). The effects of Cupressus sempervirens oil and pine resin oil (turpentine) on subterranean termites (Doctoral dissertation, Makerere University).
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M., y de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the

smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, 951130.

-Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., y Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), fiw070.

-Ávila-Calderón, L. E. A., Herrera-Ferreyra, M. A., y Raya-González, D. (2012). Preservación de la Madera en México. *Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.

-Ayed, A., Kalai-Grami, L., Ben Slimene, I., Chaouachi, M., Mankai, H., Karkouch, I., y Limam, F. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain S97 against *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 31(12), 1330-1348.

-Bari, E., Taghiyari, H. R., Schmidt, O., Ghorbani, A., & Aghababaei, H. (2015). Effects of nano-clay on biological resistance of wood-plastic composite against five wood-deteriorating fungi. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 17(1), 205-212.

-Bhattacharyya, A., Sinha, M., Singh, H., Patel, R. S., Ghosh, S., Sardana, K., & Sengupta, S. (2020). Mechanistic insight into the antifungal effects of a fatty acid derivative against drug-resistant fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2116.

-Benítez, V., Franco, J., Camargo, Á., Raimonda, P., Mantero, C., & Ibáñez, C. M. (2021). Influence of initial wood moisture on decay process by two brown-rot fungi. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 23.

-Blanchette, R. A., Held, B. W., Jurgens, J. A., McNew, D. L., Harrington, T. C., Duncan, S. M., y Farrell, R. L. (2004). Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antártica. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1328-1335.

-Bobadilla, E. A., Suirezs, T. M., Pereyra, O., Weber, E., Silva, F., y Stehr, A. M. (2007). Durabilidad de la madera del *Pinus taeda* L. impregnado con arseniato de cobre cromatado, frente a hongos xilófagos, Misiones, Argentina. *Floresta*, 37(1).

-Boonstra, M. J., Van Acker, J., Kegel, E., y Stevens, M. (2007). Optimisation of a two-stage heat treatment process: durability aspects. *Wood Science and Technology*, 41(1), 31-57.

-Boonstra, M. (2008). A two-stage thermal modification of wood (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).

-Brito, F. M. S., Paes, J. B., da Silva Oliveira, J. T., Arantes, M. D. C., & Dudecki, L. (2020). Chemical characterization and biological resistance of thermally treated bamboo. *Construction and Building Materials*, 262, 120033.

-Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, December 15). *lignin*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/lignin>

-Carrillo, P.A., Garza, O, F., Gonzalez R.H., Foroughbakhch.R., y Bustamante. G, V., (2014). *Tecnologías para la preservación de la madera y evaluación de la durabilidad*. Editorial: Universidad Autónoma de Nuevo León (pp. 122-140)

-Chávez-Moctezuma, M. P., Martínez-Cámara, R., Hernández-Salmerón, J., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., & Valencia-Cantero, E. (2022). Comparative genomic and functional analysis of *Arthrobacter* sp. UMCV2 reveals the presence

of luxR-related genes inducible by the biocompound N, N-dimethylhexadecylamine. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1040932.

-Candelier, K., Thevenon, M. F., Petrissans, A., Dumarcay, S., Gerardin, P & Petrissans, M. (2016). Control of wood thermal treatment and its effects on decay resistance: a review. *Annals of Forest Science*, 73(3), 571-583.

-Chan, C. W., Heredia Abarca, G. P., y Rodríguez Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(3), 339-351.

-Civzele, A., Stipniece-Jekimova, A. A., y Mezule, L. (2023). Fungal Ligninolytic Enzymes and Their Application in Biomass Lignin Pretreatment. *Journal of Fungi*, 9(7), 780.

-Córdoba M, K. A., y Ríos H, A. (2012). Biotechnological applications and potential uses of the mushroom *Trametes versicolor*. *Vitae*, 19(1), 70-76.

-De Fuentes, R. B. V. (1998). Técnicas para la preservación de maderas. Documento técnico, Chemonics International USAID/Bolivia.

-Encinas, O., y Mora, N. (2003). Patrones de degradación de las maderas de Pino caribe, Curarire y Drago por *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. *Revista forestal venezolana*, 47(1), 1-14.

-EPA; (agencia de protección ambiental de los estados unidos). Chromated Arsenicals. Actualizada el 31 de enero 2003. [Chromated Arsenicals \(CCA\) | US EPA](#)

-Erfani Jazi, M., Narayanan, G., Aghabozorgi, F., Farajidizaji, B., Aghaei, A., Kamyabi, M. A., & Mlsna, T. E. (2019). Structure, chemistry and physicochemistry of lignin for material functionalization. *SN Applied Sciences*, 1, 1-19.

-Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouزيد, R. (2022). Volatile organic compounds from *Bacillus mojavensis* I4 promote plant growth and inhibit phytopathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101887.

-García-Ortiz, V. R., Benítez-Rocha, G., Martínez-Pacheco, M., & Velázquez-Becerra, C. (2018). Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 56-78.

-García-Ortiz, V., Hernández-Soberano, C., Martínez-Pacheco, M., Ambriz-Parra, E., y Velázquez Becerra, C. (2020). Efecto protector en madera de extractos metabólicos provenientes de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal contra hongos de pudrición. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 164-165.

-Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., & Guan, W. (2018). Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Frontiers in microbiology*, 9, 456.

-Garrido, M. (2015). Agentes de degradación de la madera y tratamientos de prevención. *Publicaciones didácticas*.

-Goldman, D. L., & Vicencio, A. G. (2012). The chitin connection. *MBio*, 3(2), 10-1128.

-Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P., & Iacobellis, N. S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in microbiology*, 6, 1056.

-Guridi, G.L.I., y García M.T. (2000). Estudio anatómico de la madera de aguacate criollo (*Persea americana* Mill) Ciencia y Tecnología de la Madera Época 2 (5):3-20p.

-Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS microbiology reviews*, 13(2-3), 125-135.

-Habtemariam, S. (2020). *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. *Biomedicines*, 8(5), 135.

-He, C. N., Ye, W. Q., Zhu, Y. Y., & Zhou, W. W. (2020). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules*, 25(15), 3360.

-Hernández-Soberano, C., &Valencia-Cantero, E.(2021). *Dimethylhexadecylamine*, a bacterial volatile compound, regulates achene germination, *in vitro* growth, and defense priming in *Fragaria x ananassa*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 1-9.

-Hernández-Soberano, C., López-Bucio, J., & Valencia-Cantero, E. (2023). The Bacterial Volatile Organic Compound N, *N-Dimethylhexadecylamine* Induces Long-Lasting Developmental and Immune Responses throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 12(7), 1540.

-Humar, M., y Lesar, B. (2013). Efficacy of linseed-and tung-oil-treated wood against wood-decay fungi and water uptake. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85, 223-227.

-Huang, L. Z., Ma, M. G., Ji, X. X., Choi, S. E., & Si, C. (2021). Recent developments and applications of hemicellulose from wheat straw: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 690773.

-Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 41(6), 941-962.

-Kaya, A. I. (2023). Combined Effects of Linseed Oil and Heat Treatment on the Properties of Cypress and Maple Wood Part 1: Water Absorption, Mechanical Properties, and Sound Absorption Capacity. *BioResources*, 18(2).

-Korany, S. M., El-Hendawy, H. H., Soliman, E. R., y Elsaba, Y. M. (2023). Antagonistic Activity of *Bacillus atrophaeus* (MZ741525) against Some Phytopathogenic Microorganisms. *Egyptian Journal of Botany*, 63(2), 361-376.

-Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., y Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte chemie international edition*, 44(22), 3358-3393.

-Levicoy, V., y Morales, R. (2023). *In vitro* biodegradation of *Trametes versicolor* and *Schizophyllum commune* as potential biocontrols for *Acacia melanoxylon* in Chile. *Revista Bosque*, 44(1), 47-53.

-Li, T., Chen, C., Brozena, A. H., Zhu, J. Y., Xu, L., Driemeier, C., y Hu, L. (2021). Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. *Nature*, 590(7844), 47-56.

-Lo Cantore, P., Giorgio, A., y Lacobellis, N. S. (2015). Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Frontiers in microbiology*, 6, 1082.

-Ling, L., Luo, H., Yang, C., Wang, Y., Cheng, W., Pang, M., & Jiang, K. (2022). Volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* L1 as a potential biocontrol agent against postharvest diseases of wolfberry. *Frontiers in Microbiology*, 13, 987844.

-Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., y Hofrichter, M. (2011). Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood-and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS microbiology ecology*, 78(1), 91-102.

-Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Fen, F., Mirjat. A, A., Wang, W., Jabar, A., Naveed, M., Li, H.J., y Zhang, Q. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. *Chemosphere*, 296, 133948.

-Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., & Río Andrade, J. C. D. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.

-Mamman, A. S., Lee, J. M., Kim, Y. C., Hwang, I. T., Park, N. J., Hwang, Y. K., y Hwang, J. S. (2008). Furfural: Hemicellulose/xyloseederived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 2(5), 438-454.

-Manan, S., Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Atta, O. M., & Yang, G. (2021). Synthesis and applications of fungal mycelium-based advanced functional materials. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(1), 1-10.

-Martín, J. A., y López, R. (2023). Biological Deterioration and Natural Durability of Wood in Europe. *Forests*, 14(2), 283.

-Maroof, S., Moghimi, H., Ghobad-Nejhad, M., y Taheri, R. A. (2022). The potential of white and soft-rot fungi for biodegradation of multi-walled carbon nanotubes

(MWCNTs): Characterization and enzyme analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-23.

-Martínez-Pacheco, M. M., Reynoso, W. E. G., León, J. C. D., González, D. R., García, A. F., Rojas, A. M., & Becerra, C. V. (2022). Pinewood protection against sapstain using citrus essential oils. *Revista Árvore*, 46, e4616.

-Morales, I. C., y Pazos, C. B. (1998). Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques*, 4(2), 21-37.

-Morais, S.; Fonseca, H.M.A.C.; Oliveira, S.M.R.; Oliveira, H.; Gupta, V.K.; Sharma, B.; de Lourdes Pereira, M. (2021). Environmental and Health Hazards of Chromated Copper Arsenate-Treated Wood: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 5518. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115518>

-Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.P., y Gelhaye, E. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microbial Biotechnology*, 6:248-63.

-Mora, N., Encinas, O., Molina, Y., y Vielma, J. (2006). Durabilidad de maderas tratadas con CCA y CCB en suelos de Judibana y San Juan de Lagunillas, estado Mérida, Venezuela. *Revista forestal latinoamericana*, 21(39), 17-37.

-Montejano-Ramírez, V., García-Pineda, E., & Valencia-Cantero, E. (2020). Bacterial compound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine modulates expression of iron deficiency and defense response genes in *Medicago truncatula* independently of the jasmonic acid pathway. *Plants*, 9(5), 624.

-Ni, H., Kong, W. L., Zhang, Y., & Wu, X. Q. (2022). Effects of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* ST-TJ4 against *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 8(7), 697.

- Orozco-Mosqueda, M. del C., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-pacheco, M., y Velázquez-Becerra, C., (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 219-228.
- Patel, A., Patel, V., Patel, H., Trivedi, U., y Patel, K. (2020). White rot fungi: nature's scavenger. *Microbial Bioremediation & Biodegradation*, 267-307.
- Pointing, S.B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*, 2:17-33.
- Perdoch, W., Depczyńska, E., Tomkowiak, K., Furgał, M., Kurczak, M., & Mazela, B. (2022). The Impact of Vinylotrimethoxysilane-modified Linseed Oil on Selected Properties of Impregnated Wood. *Forests*, 13(8), 1265.
- Pohl, C. H., Kock, J. L., & Thibane, V. S. (2011). Antifungal free fatty acids: a review. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 3, 61-71.
- Presley, G. N., y Schilling, J. S. (2017). Distinct growth and secretome strategies for two taxonomically divergent brown rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, 83(7).
- Ramage, M. H., Burridge, H., Busse-Wicher, M., Fereday, G., Reynolds, T., Shah, D. U., & Scherman, O. (2017). The wood from the trees: The use of timber in construction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 333-359.
- Rao, J., Lv, Z., Chen, G., y Peng, F. (2023). Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. *Progress in Polymer Science*, 101675.

-Rojas Badía, M. M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., y Lugo Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 00-00.

-Rodríguez-Couto S. 2017–Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere* 8(3) 456–466, Doi 10.5943/mycosphere/8/3/7

-Sánchez-Arreguin, J. A., Ortiz-Castellanos, M. L., Robledo-Briones, A. M., León-Ramírez, C. G., Martínez-Soto, D., & Ruiz-Herrera, J. (2022). Chitosan is necessary for the structure of the cell wall, and full virulence of *Ustilago maydis*. *Journal of Fungi*, 8(8), 813.

-Salazar, B., Ortiz, A., Keswani, C., Minkina, T., Mandzhieva, S., Pratap Singh, S., & Sansinenea, E. (2023). *Bacillus* spp. as bio-factories for antifungal secondary metabolites: Innovation beyond whole organism formulations. *Microbial Ecology*, 86(1), 1-24.

-Souza, S. F. D., Paes, J. B., Arantes, M. D. C., Silva, L. F. D., & Dudecki, L. (2020). Efficiency of Andiroba, Copaiba and Jatropa Oils to Improve the Resistance of *Pinus elliottii* Wood to Wood-Decay Fungi. *Revista Árvore*, 44.

-Suota, M. J., Kochevka, D. M., Moura, M. G., Pirich, C. L., Matos, M., Magalhães, W. E., & Ramos, L. P. (2021). Lignin functionalization strategies and the potential applications of its derivatives—A review. *BioResources*, 16(3), 6471.

-Schneider, M. H. (1980). Hygroscopicity of wood impregnated with linseed oil. *Wood Science and Technology*, 14(2), 107-114.

-Schwarze, F. W. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal biology reviews*, 21(4), 133-170.

-Selbmann, L., Egidi, E., Isola, D., Onofri, S., Zucconi, L., de Hoog, G. S., y Lantieri, A. (2013). Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(1), 237-246.

-Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T., y Takaya, N. (2004). Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12414-12420.

-Temiz, A., Kose, G., Panov, D., Terziev, N., Alma, M. H., Palanti, S., & Akbas, S. (2013). Effect of bio-oil and epoxidized linseed oil on physical, mechanical, and biological properties of treated wood. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(3), 1562-1569.

-Tran-Ly, A. N., Heeb, M., Kalac, T., y Schwarze, F. W. (2022). Antimicrobial effect of fungal melanin in combination with plant oils for the treatment of wood. *Frontiers in Materials*, 9, 915607.

-Thota, S., Begum, R., Kaur, G., Bagam, P., Dorsey, W., y Batra, S. (2022). Pentachlorophenol mediated regulation of DAMPs and inflammation: *In vitro* study. *Toxicology in Vitro*, 83, 105378.

-Thybring, E. E., Fredriksson, M., Zelinka, S. L., & Glass, S. V. (2022). Water in wood: A review of current understanding and knowledge gaps. *Forests*, 13(12), 2051.

-Tovar-Herrera, O. E., Martha-Paz, A. M., Pérez-LLano, Y., Aranda, E., Tacoronte-Morales, J. E., Pedroso-Cabrera, M. T., & Batista-García, R. A. (2018). *Schizophyllum commune*: An unexploited source for lignocellulose degrading enzymes. *MicrobiologyOpen*, 7(3), e00637.

-Valcorte, G., Santini, E. J., Talgatti, M., de Oliveira, L. H., & da Silveira, A. G. (2020). Antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark natural extract subjected to xylophagous fungi. *Scientia Agraria Paranaensis*, 302-306.

-Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., y Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant and soil*, 339(1-2), 329-340.

-Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C., & Valencia-Cantero, E. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma*, 250(6), 1251-1262.

-Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Pizano, G. S., & Valencia-Cantero, E. (2010). Actividad inhibitoria del compuesto volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre fitopatógenos.

-Vega-Ceja, J. E., Jiménez-Amezcu, R. M., Anzaldo-Hernández, J., Silva-Guzmán, J. A., Torres-Rendón, J. G., Lomelí-Ramírez, M. G., & García-Enriquez, S. (2022). Antifungal Activity of *Datura stramonium* L. Extractives against Xylophagous Fungi. *Forests*, 13(8), 1222.

-Vázquez-Chimalhua, E., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., y Ruiz-Herrera, L. F. (2021). N, N-dimethyl-hexadecylamine modulates Arabidopsis root growth through modifying the balance between stem cell niche and jasmonic acid-dependent gene expression. *Gene Expression Patterns*, 41, 119201.

-Vidholdová, Z., Kačík, F., Reinprecht, L., Kučerová, V., y Luptáková, J. (2022). Changes in chemical structure of thermally modified spruce wood due to decaying fungi. *Journal of fungi*, 8(7), 739.

-Wang, Z., Zhong, T., Chen, K., Du, M., Chen, G., Chen, X., y Kan, J. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX and potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. *Food Control*, 120, 107499

-Won, K. R., Kim, T. H., Hwang, K. K., Chong, S. H., Hong, N. E., y Byeon, H. S. (2012). Effect of heat treatment on the bending strength and hardness of wood. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 40(5), 303-310.

-Xu, C., Mo., Zhang, L., y K. Zhang, (2004) Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology Biochemistry*. 36:1997-2004.

-Xu, J., y Yang, Q. (2010). Isolation and characterization of rice straw degrading *Streptomyces griseorubens* C-5. *Biodegradation*, 21(1), 107-116.

-Zhang, H., Du, H., & Xu, Y. (2021). Volatile organic compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(9), e02992-20.

-Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 922450.

-Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P. y K.Q. Zhang (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2371-2379.