



**Universidad Nacional
de San Martín**

Escuela de Ciencia y Tecnología

**Prospección de metabolitos bioactivos en *Cadophora malorum* por activación de
agrupamiento de genes silentes inducida por estrés**

Trabajo de tesis de Licenciatura en Biotecnología

Alumna: Clara Griselda Fascetto Cassero

Directora: Dra. Ma. Martha Martorell

Co-director: Dr. Lucas Ruberto

Lugar de trabajo: Instituto Antártico Argentino / Instituto Nanotecnología (UBA-CONICET)

AGRADECIMIENTOS

Gracias infinitas a mis jefes de tesina (Martha y Lucas) por darme la oportunidad de participar de un proyecto donde aprendí y crecí.

A mi familia (Mi mama, Lara y Bruma) por su apoyo incondicional durante este largo camino.

Gracias a mis amigos de toda la vida.

INDICE	
INDICE	3
LISTADO DE ABREVIATURAS:	3
RESUMEN	4
ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE ESTA TESINA:.....	6
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Resistencia a los antimicrobianos	7
1.2 Compuestos bioactivos	8
1.2.2 Estrategias para estimular la expresión de genes silentes	17
1.3 Modelo de estudio: <i>Cadophora malorum</i>	22
2 HIPÓTESIS:.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo general del proyecto.....	28
3.2 Objetivos específicos de este trabajo de tesis.....	28
4 MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Microorganismos y medio de cultivo.....	29
4.2 Obtención de cultivos	30
4.2.1 Condiciones de cultivo	30
4.3 Cuantificación por peso seco.	32
4.4 Obtención de extractos orgánicos.	32
4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	33
4.5.1 Evaluación de la actividad antifúngica.....	33
4.5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	34
4.5.3 Análisis estadístico.....	34
4.6 Análisis de los extractos mediante HPLC-MS.	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1: Actividad antifúngica de los extractos de <i>C. malorum</i>	36
5.2: Actividad antibacteriana de los extractos de <i>C. malorum</i>	46
5.4: Análisis cromatográfico de los extractos orgánicos de <i>C. malorum</i> por HPLC.....	61
6 DISCUSIÓN	67
7 CONCLUSIONES	72
8 PERSPECTIVAS A FUTURO	73
9 BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTADO DE ABREVIATURAS:

ATB Antibióticos

MS Metabolitos secundarios

PKS Policétido sintasa

CGB Grupos de genes biosintéticos

NRPS Sintetasa peptídica no ribosómica

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa

NRP Metabolitos secundarios no ribosómicos

AT Dominio acil transferasa

KS Dominio ceto sintasa

ACP Dominio proteína portadora de acilos

IPP Difosfato de isopentenilo

ITS Espaciador transcrito interno

PDC Caldo papa dextrosa

PDA Agar papa dextrosa

RESUMEN

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos (ATB) es un problema de relevancia mundial. El uso indiscriminado de antibióticos influye severamente ya que afecta la salud, aumenta la morbimortalidad y prolonga los tiempos de internación hospitalaria, lo cual provoca altos costos sanitarios. Resulta entonces un interesante desafío la búsqueda de nuevas herramientas y estrategias para enfrentar esta resistencia creciente. En ese contexto, el uso de microorganismos adaptados a ecosistemas extremos, como la Antártida, como fuente de nuevos compuestos antimicrobianos se encuentra actualmente poco explorado y sería una de las estrategias a considerar.

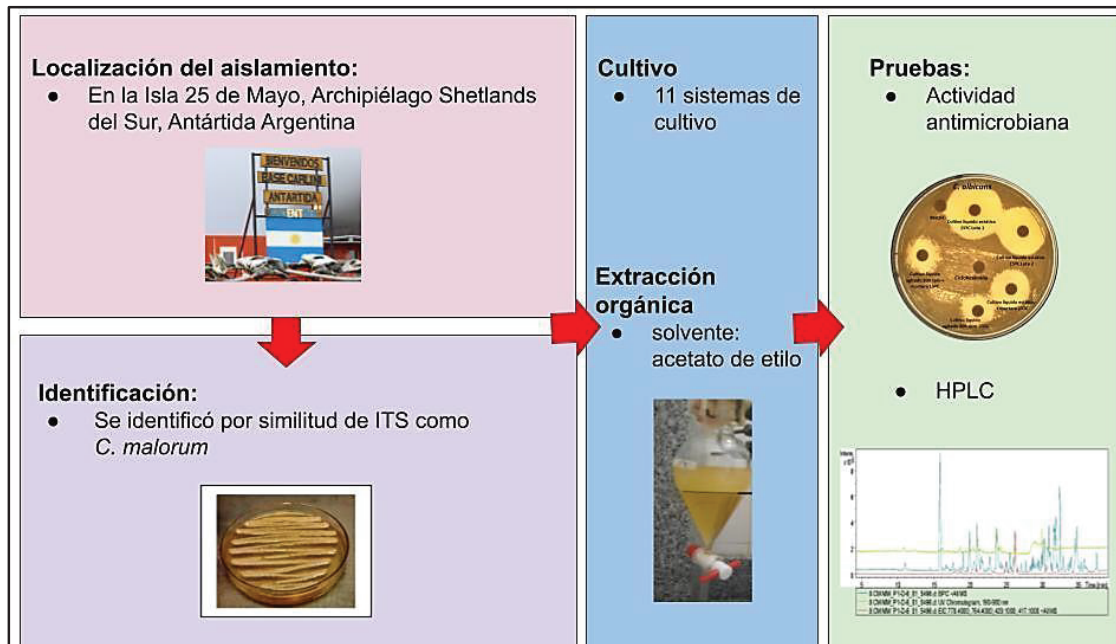
En este trabajo de tesis se utilizó como modelo de estudio el hongo filamentoso *Cadophora malorum*, un microorganismo psicrófilo aislado de la Antártida. Para ello se sometió a *C. malorum* a distintos tipos de estrés. Se trabajó en diferentes condiciones de cultivo: sistema sólido, líquido (estático y agitado) y en sustrato inerte (espuma de poliuretano). Se modificó la temperatura de incubación (5, 15 y 25°C) y se sometió al micelio a un daño mecánico para evaluar qué efecto fisiológico podría generar.

Se realizaron extractos orgánicos de los cultivos en medio agarizado, sustrato sólido y sobrenadantes líquidos. Se optimizó la extracción de los cultivos agarizados evaluando diferentes estrategias (extracción acuosa, liofilización y extracción directa), siendo el método más eficiente la extracción directa.

A los extractos obtenidos se les evaluó la actividad antifúngica y antibacteriana. Algunos de los extractos presentaron actividad antifúngica marcada contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *A. lentulus* y actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, y *Bacillus subtilis*.

Finalmente, se analizaron los extractos orgánicos de *C. malorum* mediante HPLC-MS observándose variaciones significativas en los perfiles en diferentes condiciones de cultivo.

ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO DE ESTA TESINA:



1 INTRODUCCIÓN

1.1 Resistencia a los antimicrobianos

En la última década la resistencia a los antimicrobianos cobró relevancia por ser una amenaza para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo agroeconómico (Figura 1) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021). La principal causa ha sido, y es, el uso indiscriminado y excesivo de antibióticos. En el caso particular de los antifúngicos vigentes actualmente se ha demostrado la aparición de resistencia y toxicidad de los mismos en pacientes frágiles e inmunodeprimidos (Perfect, 2017). Estos reportes refuerzan la necesidad y prioridad que debe asignarse la búsqueda de nuevos agentes con actividad antimicótica para solucionar esta situación.

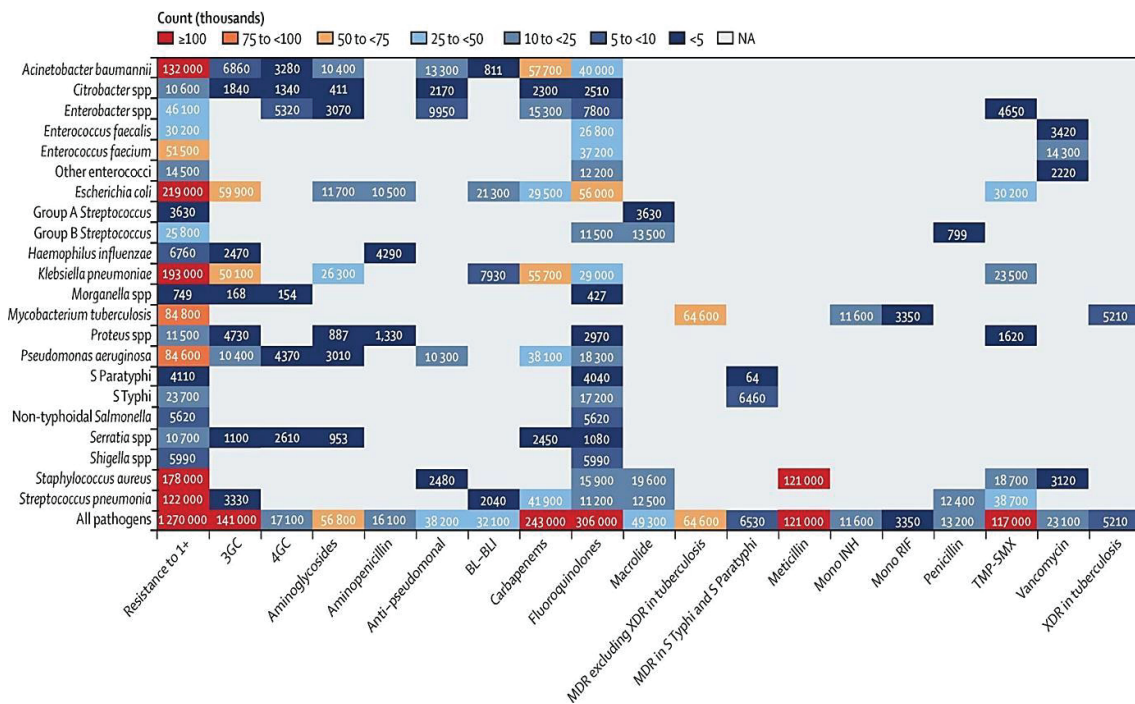


Figura 1: Recuento de muertes atribuibles en el mundo por resistencia bacteriana a los antimicrobianos (año 2019). Cefalosporina de tercera generación (3GC), cefalosporina de cuarta generación (4GC), BL-BLI = β -lactámicos, Mono INH = monorresistencia a la isoniazida, Mono RIF = monorresistencia a rifampicina, resistencia a 1+ = resistencia a uno o más fármacos. *S Paratyphi* = *Salmonella enterica* serotipo *paratyphi*, *S Typhi* = *Salmonella enterica* serotipo *Typhi*. TMP-SMX = trimetoprima-sulfametoxazol, XDR = resistencia extensa a los medicamentos. Figura adaptada (Murray y col., 2022)

1.2 Compuestos bioactivos

Los metabolitos secundarios (MS) microbianos se caracterizan por ser moléculas heterogéneas de bajo peso molecular relativo y que se producen de manera independiente a la formación de biomasa usualmente al final de la fase de crecimiento. Actualmente los MS son considerados como un grupo de moléculas que constituyen una fuente principal para el descubrimiento y el desarrollo de fármacos novedosos (Pan y col., 2019).

Algunas de estas moléculas representan ventajas competitivas para los microorganismos productores al presentar actividad antifúngica y/o antimicrobiana que facilitan la supervivencia de los mismos en su entorno natural (Yan y col., 2018).

En el caso específico de los hongos, la expresión de los MS predomina en miembros de la clase de *Peizomycotina* dentro de los *Ascomycota* (Figura 2) y varias clases de *Basidiomycota* (por ejemplo, *Agaricomycetes* y *Exobasidiomycetes*), así como por especies levaduriformes como *Kluyveromyces lactis* (Keller, 2019). Los metabolitos secundarios pueden ser secretados al medio de cultivo ejemplo los ATB β -lactámicos (penicilina y cefalosporina) (Martín y col., 2010).

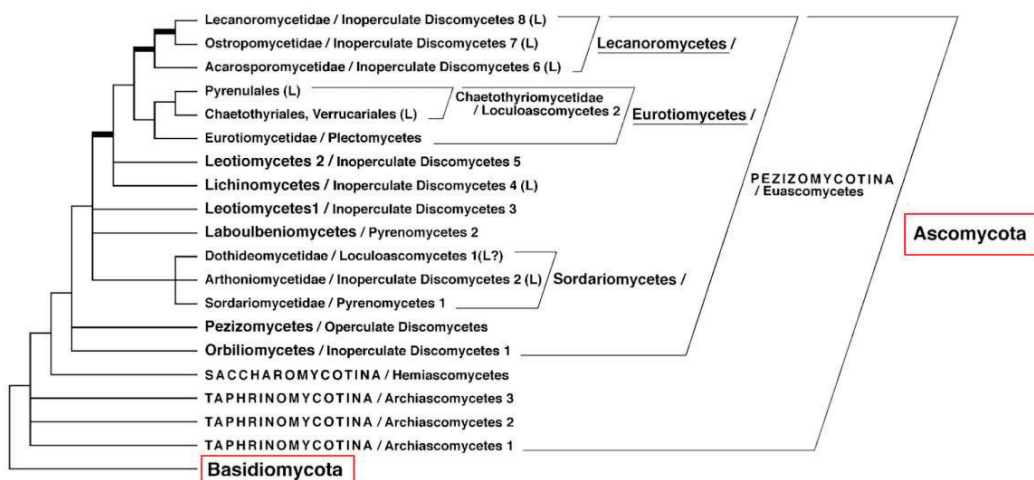


Figura 2: Árbol filogenético de la división *Ascomycota* en donde se puede observar en forma general las relaciones filogenéticas establecidas. Figura adaptada (Lutzoni y col., 2004)

La bioprospección de cepas fúngicas con potencial biotecnológico para la industria farmacéutica se ha expandido a regiones con condiciones ambientales extremas incluyendo las polares, tanto Antártida como el Ártico (De Pascale y col., 2012).

Estas regiones combinan características extremas al ser ambientes fríos, secos, sometidos a alta radiación UV y oligotróficos, esto ofrece oportunidades únicas para el descubrimiento de microorganismos extremófilos adaptados a esas condiciones (Gonçalves y col., 2012). Lo anteriormente expresado impactan a nivel celular, molecular y fenotípico. La composición lipídica de la membrana se ve modificada por esta condición ambiental ya que su fluidez es mayor a baja temperatura al aumentar el porcentaje de ácidos grasos mono o poliinsaturados a expensas de los ácidos grasos saturados. Las enzimas son otro ejemplo a destacar ya que para poder mantener su capacidad catalítica a temperaturas en torno a los 0°C deben sufrir cambios estructurales (De Pascale y col., 2012; Zucconi y col., 2020). A nivel termodinámico se reduce entre un 10-60 veces la velocidad de las reacciones biocatalíticas debido a las temperaturas tan bajas por lo tanto las enzimas psicrófilas son más flexibles perdiendo estabilidad conformacional y esto permite la continuidad en los procesos metabólicos (De Pascale y col., 2012).

En consecuencia, estos microorganismos pueden producir una amplia gama de MS novedosos además de expresar enzimas activas a temperaturas muy bajas. Un ejemplo de esto es el hongo *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. Este microorganismo es conocido por ser un hongo patógeno psicrófilo, el cual crece de forma ubicua en la Antártida. Mediante la utilización del método de redes neuronales se descubrió un nuevo policétido bioactivo denominado pseudohenone A que posee actividad antibacteriana (Shi y col., 2021). Se han encontrado otros metabolitos con diferentes actividades (terpenoides, policétidos, alcaloides, poliacetilenos con actividades antivirales, antibacterianas, antifúngicas, antitumorales, herbicidas y antiprotozoarias). Estos desempeñan un papel fundamental entre las

interacciones inter e intra especies lo cual ha proporcionado ventajas competitivas contra sus depredadores (Zucconi y col., 2020). A continuación se ejemplifica a través de Tablas 1, 2 y 3 lo anteriormente expuesto.

Microorganismo	Aislamiento	Target		
<i>Aspergillus sydowii</i>	Isla 25 de Mayo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE) y <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>S. epidermidis</i> (ATCC 040188), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		
<i>Penicillium</i> sp.		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
<i>Geomyces</i> sp.		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (CGMCC 1.1692), <i>Escherichia coli</i> (CGMCC 1.2340)		
<i>Aspergillus sydowii</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE) y <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), <i>S. epidermidis</i> (ATCC 040188), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		
Hongo anamórfico	Isla Decepción	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		
<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051)		
<i>Kabatiella zeae</i>		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051), <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)		
<i>Mucor</i> sp.		<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051)		
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		
<i>Geomyces</i> sp.	Bahía Yankee	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051), <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Aspergillus sydowii</i>		Monte Ellsworth	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600)	
<i>Penicillium allii-sativi</i>			Isla 25 de Mayo	<i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Penicillium b.</i>				<i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i>
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Oidiodendron truncatum</i>	Isla 25 de Mayo	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Escherichia coli</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Escherichia coli</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Penicillium oxalicum</i>		<i>Escherichia coli</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>P. solitum</i> (sub. <i>P. crustosum</i>)		<i>Escherichia coli</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>		
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.		<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Purpureocillium lilacinum</i>		<i>Escherichia coli</i>		
<i>Pyricularia</i> sp.				

Tabla 1: Microorganismos con actividad antibacteriana reportados en la Antártida y evaluados a 37°C. Tabla adaptada (Zucconi y col.,2020).

Microorganismo	Aislamiento	Target
<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	<i>Isla 25 de Mayo</i>	Virus de la influenza H1N1 y H3N2
<i>Penicillium allii-sativi</i>	<i>Monte Ellsworth</i>	Virus del Dengue 2
<i>P. brevicompactum</i>		
<i>P. chrysogenum</i>		

Tabla 2: Microorganismos con actividad antiviral reportados en la Antártida y evaluados a 37°C. Tabla adaptada (Zucconi y col., 2020)

Microorganismo	Aislamiento	Temperatura	Target		
<i>Candida sake</i>	<i>Isla 25 de Mayo</i>	0 °C; 25 °C	Patógenos post-cosecha de la manzana durante almacenamiento en cámara fría: <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , and <i>A. arborescens</i>		
<i>Geomyces</i> sp.		28 °C	<i>A. fumigatus</i> (ATCC 10894)		
<i>Penicillium nalgiovense</i>	<i>Isla Paulete</i>	37 °C	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)		
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Monte Ellsworth</i>	25 °C	<i>C. sphaerospermum</i> (CCT 1740)		
<i>Penicillium allii-sativi</i>					
<i>P. brevicompactum</i>					
<i>P. chrysogenum</i>					
<i>P. Rubens</i>	<i>Isla 25 de Mayo</i>	37 °C	<i>C. albicans</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>					
<i>A. terreus</i>					
<i>Beauveria bassiana</i>			<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>		
<i>Fusarium avenaceum</i>			<i>P. brasiliensis</i>		
<i>Leucosporidium scottii</i>			1 °C; 25 °C	<i>P. expansum</i> and <i>Botrytis cinerea</i>	
<i>Oidiodendron truncatum</i>			37 °C	<i>Candida albicans</i>	
<i>Penicillium chrysogenum</i>					
<i>P. citrinum</i>					
<i>P. oxalicum</i>					
<i>P. solitum</i> (sub. <i>P. crustosum</i>)					
<i>Penicillium</i> sp.					<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Peniophora</i> sp.					
<i>Pestalotiopsis microspora</i>					
<i>Phanerochaete</i> sp.					
<i>Pseudeurotium</i> sp.					
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.					
<i>Purpureocillium lilacinum</i>					
<i>Schizophyllum commune</i>					
<i>Simplicillium lamellicola</i>					
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>					
<i>Trichosporon asteroides</i>					

Tabla 3: Microorganismos con actividad antifúngica reportados en la Antártida. Tabla adaptada (Zucconi y col., 2020)

Existen reportes que basados en el análisis bioinformático (análisis masivo de datos) de genomas secuenciados, transcriptómica, proteómica y metabolómica, afirman que muchas vías biosintéticas encargadas de la síntesis de metabolitos secundarios en hongos se encuentran agrupadas en *clusters* de genes de aproximadamente 10.000 bases aunque hay excepciones (Brakhage, 2013). Por ejemplo el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* produce dos compuestos de origen natural, meroterpenoides (austinol y dehidroaustinol) que requiere de dos *clusters* de genes ubicados en cromosomas diferentes (Hsien-Chun y col., 2012). Un grupo de 4 genes que incluye el gen *ausA* (policétido sintasa) y el segundo de 10 genes que incluye *ausN* (preniltrasnferasa).

Las enzimas encargadas de la producción de estas moléculas bioactivas de gran relevancia se encuentran codificadas en estos *clusters* los cuales se denominan grupos de genes biosintéticos (CGB) (Figura 3). Los CGB en muchos casos se encuentran silenciados (no se expresan) en condiciones normales de cultivo (Pfannenstiel y Keller, 2019) y esto se debe a la ausencia de estímulos particulares como ser: fuentes de nutrientes, señales ambientales, compuestos de señalización u otros desencadenantes desconocidos (Hertweck, 2009). Por lo tanto existe una gran cantidad de productos naturales sin explorar.

Los metabolitos secundarios fúngicos más abundantes y con mayor diversidad estructural son los policétidos. Estos derivan de la polimerización de unidades de ácido carboxílico de cadena corta (por ejemplo: acetato, malonato) y esta reacción es catalizada por las enzimas PKS (policétido sintasa de aproximadamente 1–10 MDa , figura 4B). Estas enzimas son las encargadas de la estructura principal de estos bioactivos. En Ascomycota y Basidiomycota prevalece la PKS I. La estructura se genera mediante la reacción de condensación de Claisen (en presencia de una base fuerte dos ésteres o un éster reacciona y da una β -cetoéster o una β -dicetona) (Bills y Gloer, 2016).

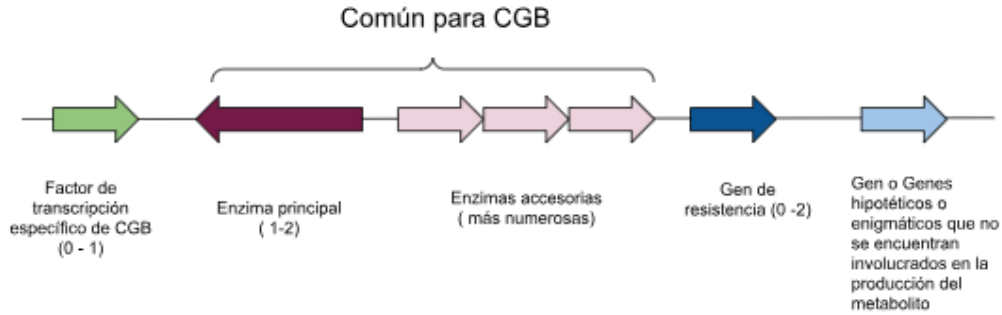


Figura 3: Esquema general del agrupamiento de genes *CGB*. Figura adaptada (Keller, 2019). Cada *CGB* está compuesto por una o dos enzimas principales (policétidos sintasas PKS), sintetasa peptídica no ribosómica (NRPS), terpeno ciclasas o dimetilalil triptófano sintasas). Estas definen la estructura base y la naturaleza del compuesto bioactivo el cual luego será alterado por enzimas accesorias (rosa). Algunos *CGB* poseen además genes que codifican resistencia frente a la toxicidad del metabolito (azul), factor de transcripción específico para el *CGB* (verde) y/o genes hipotéticos que no se encuentran involucradas en la producción del metabolito.

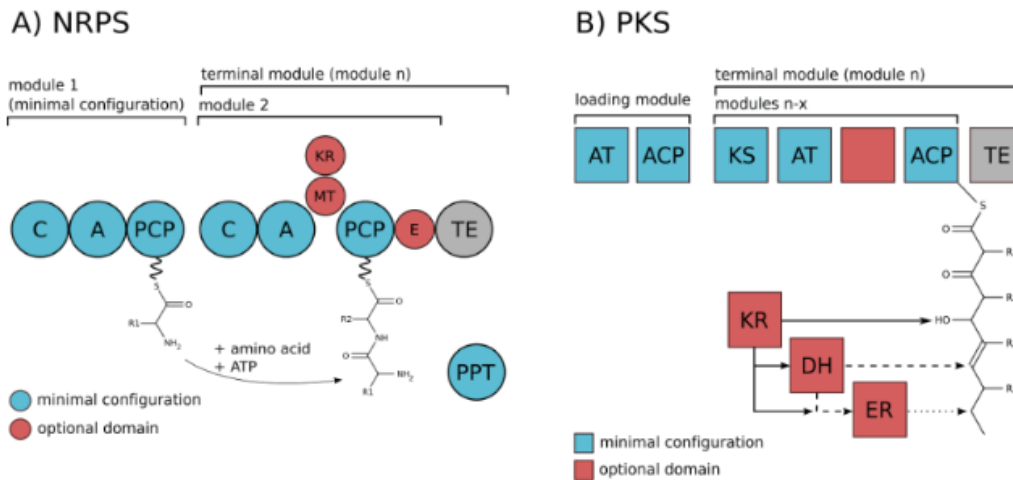


Figura 4: Estructura del dominio de la enzima NRPS (A) y de PKS (B). Estas dos enzimas constan de varios dominios catalíticos que funcionan de manera coordinada. Los diferentes tipos de PKS poseen un conjunto de dominios conservados (aciltransferasa (AT), cetositasas (KS) y la proteína transportadora de acilo (ACP)) además de ellos, en la modificación de la cadena policética pueden incorporarse otros dominios como cetoreductasa (KR), deshidrogenasa (DH) y/o enolreductasa (ER), que reducirían la cadena en formación. Las NRPS poseen un módulo básico que incluye una adenilación (A) y un dominio transportador de péptidos (PCP) y un dominio de condensación (C). Figura adaptada (Kehr y col., 2011).

Los metabolitos secundarios no ribosómicos (NRP) derivados de las enzimas NRPS (figura 4A) muestran una gran diversidad química ya que utilizan aminoácidos que forman parte de proteínas en su configuración D o L y otros compuestos como ácidos grasos, ácidos carboxílicos entre otros generando estructuras tanto lineales como cíclicas. La penicilina, cefalosporina y ciclosporina son ejemplos de la diversidad de estos metabolitos (Guzmán-Chávez y col., 2018; Soukup y col., 2016)

También se han observado la presencia de péptidos híbridos por la acción conjunta de las enzimas PKS y NRPS aunque sean codificados por genes independientes participan de la misma vía de señalización por ejemplo ocratoxina A (micotoxina neurotóxica) en *Aspergillus* y *Penicillium sp* (Ávalos Cordero y Limón Mirón, 2021).

Los terpenos son metabolitos secundarios y derivan de unidades de isopreno (2-metil-1,3butadieno, un hidrocarburo de 5 carbonos). El intermediario es el difosfato de isopentenilo (IPP), el cual puede sintetizarse por dos rutas: la del mevalonato y la ruta de la desoxixilulosa 5-fosfato (DXP). En el caso de los hongos no se han encontrado evidencia de la presencia de los genes DXP siendo la ruta mevalonato la central (Lange y col.,2000). Estos 4 principales metabolitos secundarios se encuentran esquematizados en la figura 5.

Como se ha mencionado anteriormente estos metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento ni para la supervivencia de los hongos pero si lo son para interactuar con otros organismos en un mismo nicho ej: virulencia, defensa, detección de quórum, protección, adquisición de nutrientes y promoción del crecimiento (Figura 6) (Rokas y col., 2020).

Un típico CGB estudiado ha sido la vía de síntesis de la esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans* donde se observó cómo variaba la actividad transcripcional y epigenética frente a una estímulo (Figura 7).

Lo anteriormente citado refuerza la idea referida a que las variaciones ambientales impactan en el metabolismo del microorganismo de interés, induciendo la expresión de genes que resultan en la síntesis de MSs. Por ello se han utilizado varias estrategias para inducir la expresión de genes silentes en condiciones estándar de laboratorio (Bode y col., 2002)

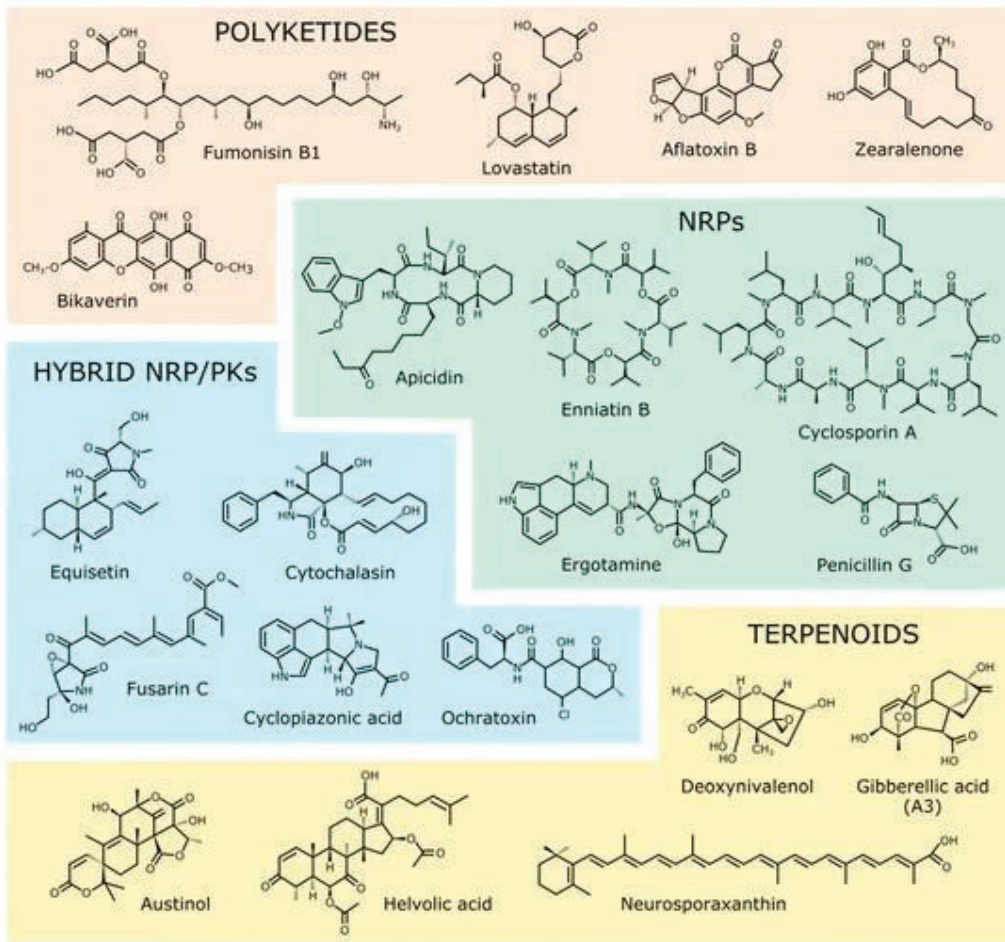


Figura 5: Representación de las 4 familias de metabolitos secundarios presentes en los hongos. Figura adaptada (Ávalos Cordero y Limón Mirón, 2021).

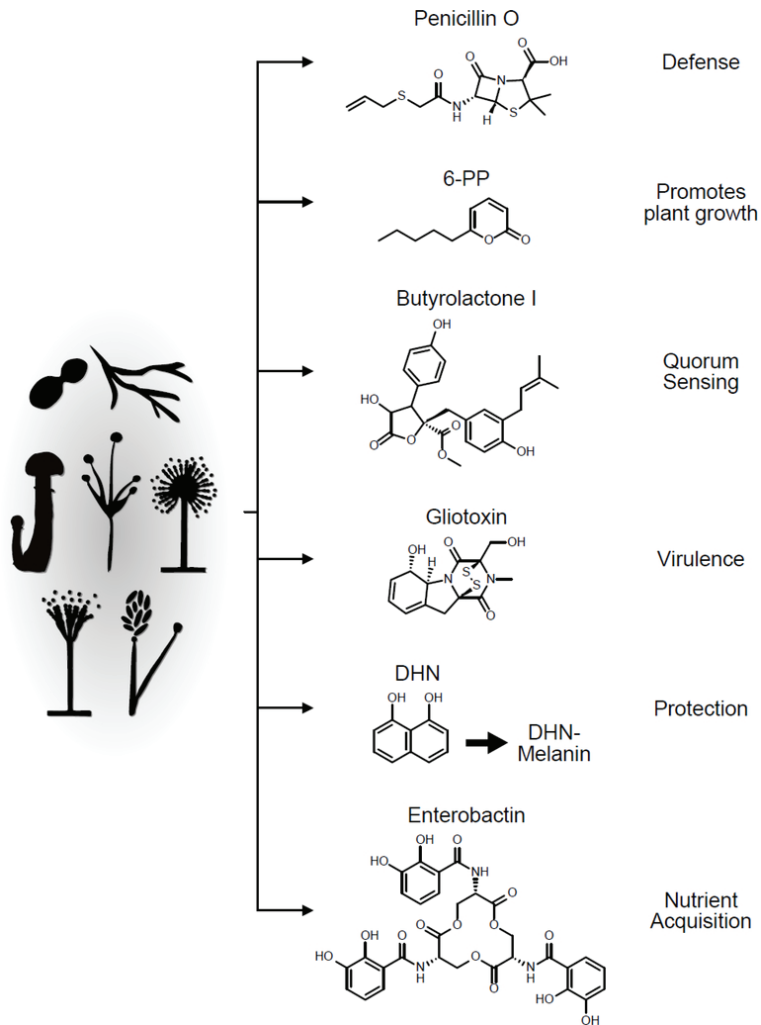


Figura 6: La penicilina es un antibiótico contra bacterias betalactámicos que hoy en día se utiliza contra bacterias gram positivas (estreptococos y estafilococos) y gram negativas (gonococos y meningococos). Gliotoxina es un factor de virulencia que facilita la invasión del hongo en el huésped (García-Vidal y Carratalà , 2012). DHN-Melanin absorbe UV como la melanina protegiendo de este modo del daño por luz UV (Singla y col.,2021). El 6-pp (6-pentil- 2H -piran-2-ona) promueve el crecimiento de las plantas induciendo la formación de raíces laterales (Garnica-Vergara y col., 2016). La butirolactona I es una molécula de detección de quórum (Shi y col., 2022) y la enterobactina es una molécula de captación de hierro que ayuda a la adquisición de nutrientes. Figura adaptada (Rokas y col., 2020)

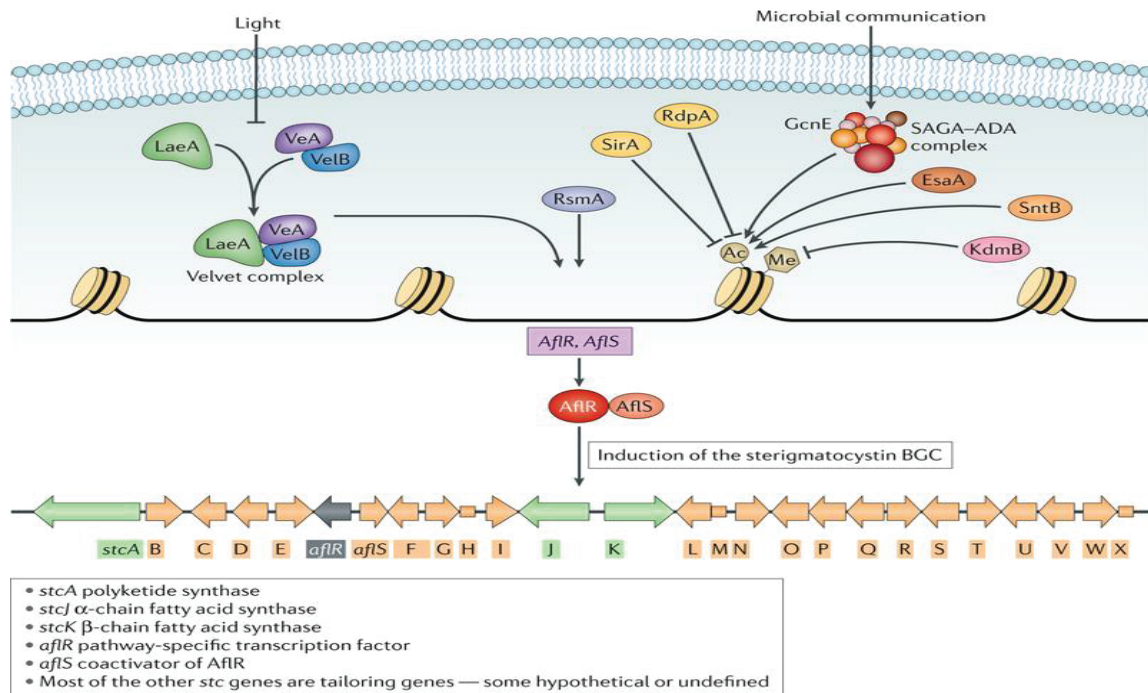


Figura 7: Regulación de *clusters* de esterigmatocistina de *Aspergillus nidulans*. En ausencia de luz blanca y en presencia de interacción con otro microorganismo como una bacteria gatilla la inducción de esterigmatocistina. El gen *AflR* codifica una proteína de 47KDa *AflR* que contiene un dominio de unión al ADN. Se asocia con otra proteína denominada *AflS* induciendo la expresión de esterigmatocistina. Estas proteínas se encuentran reguladas epigenéticamente (histona 3 desmetilación e histona 4 acetilación). Figura adaptada (Keller, 2019).

1.2.2 Estrategias para estimular la expresión de genes silentes

La expresión de *clusters* de genes silentes puede desencadenarse experimentalmente a través de diferentes estrategias:

-Exponer a los hongos a diferentes niveles de parámetros de cultivo como ser pH, temperatura, suministro de oxígeno, actividad agua, luz, etc.

Estos cambios pueden provocar un impacto significativo en la producción de metabolitos secundarios, lo cual se puede observar *in vivo* por la capacidad de adaptación de cada microorganismos a diferentes condiciones ambientales influyendo en su transcriptoma, proteoma y metaboloma (Bode y col., 2002). Esto se puso en evidencia al analizar el perfil de metabolitos secundarios producidos por *Atradiidymella* sp. (HND 10), *Pseudogymnoascus* sp.

(AK 102) y *Penicillium flavigenum* (HND 11) al ser sometidos a diferentes temperaturas de incubación (4, 10 y 15°C). Se comparó con un cromatograma estándar y se observó un aumento en la concentración de compuestos de *Atradiidymella* sp. a 4°C a diferencia de *Pseudogymnoascus* sp. (AK 102), y *Penicillium flavigenum* (HND 11) donde se observó mayor concentración a 15°C mientras que a 10°C hubo una reducción en todas las cepas (Yogabaanu y col., 2017).

Al variar la actividad agua (aw) se observó un impacto en el perfil de metabolitos secundarios, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* expresa diferencialmente 4628 genes cuando se cultiva en sustrato sólido (baja actividad aw) en comparación con cultivo sumergido (alta aw) (Wang y col., 2010).

Otro parámetro importante a considerar es la concentración de oxígeno, la cual afecta las reacciones bioquímicas y activa diferentes agrupamientos de genes provocando la expresión de diferentes metabolitos secundarios. Por ejemplo: al realizar la fermentación de *Aspergillus ochraceus* (DSM-7428) en un biorreactor del tipo *air-lift loop* se observó la baja producción de aspinonene y aumento de aspirona a diferencia de un sistema agitado ya que el primero aumenta la concentración de oxígeno disuelto en comparación al segundo (Pan y col., 2019; Fruchser y col., 1995).

-Variar los sistemas de cultivo.

El cultivo de los hongos de interés puede realizarse utilizando diferentes estrategias: líquido estático, agitado (o sumergido) o sólido (sustrato o soporte). El líquido agitado, a diferencia del estático y del sólido, proporciona una adecuada mezcla, transferencia de calor, incrementando también los niveles de oxígeno disuelto. Como aspecto negativo debe considerarse que genera una fuerza de cizallamiento (*shear stress*) que puede generar daño en la estructura celular desencadenando incluso cambios morfológicos en algunos casos

(Ibrahim y col., 2015). Por ejemplo, al comparar los cromatogramas de una fermentación sólida y otra líquida de los extractos crudos de una cepa de *Aspergillus fumigatus* LN-4 se observó una diferencia significativa entre los perfiles de metabolitos secundarios (Zhang y col., 2013). En el caso de *Aspergillus terreus* G15 (un hongo de origen marino) la condición ambiental ideal para la producción de lovastatina 3 y 4 (que poseen actividad antifúngica) fue el cultivo sólido a diferencia del líquido agitado lo cual se constató al analizar el perfil de expresión de metabolitos secundarios (Adpressa y Loesgen, 2016). Un último ejemplo es el aislamiento de diversos hongos de la zona costera marina del Mar Báltico, los cuales se cultivaron en sistema estático y agitado. Dichas condiciones influyeron en el metabolismo y se evidenció un comportamiento diferencial en el cromatograma. Uno de los efectos fue la baja producción de biomasa por parte de *Phoma macrostoma* en el sistema estático a diferencia del agitado (Pertersen y col., 2019).

-El estrés biológico (co-cultivo).

En la naturaleza los microorganismos coexisten con otros, y esta coexistencia incluye múltiples interacciones, entre las que se destacan la competencia por espacio y recursos. El co-cultivo microbiano (cultivo mixto o fermentación mixta) se caracteriza por cultivar la cepa fúngica con otra cepa fúngica o bacteriana dentro de un mismo matraz, placa de petri o bioreactor permitiendo que esta interacción desencadena la expresión de un determinado CBG (Sanitá Lima y col.,2022). Este busca emular esa competencia, que a la vez puede considerarse un estrés biológico. El objetivo es generar estrés biológico y así activar la biosíntesis de metabolitos secundarios codificados en genes que se mantienen silentes en condiciones normales de cultivo (Marmann y col., 2014). Por ejemplo, el hongo endófito *Aspergillus australfricanus* al ser co-cultivado con *Bacillus subtilis* o *Streptomyces lividans*

produce un aumento en varios tipos de ésteres (Figura 8) a diferencia de una fermentación clásica axénica (Ebrahim y col., 2016).

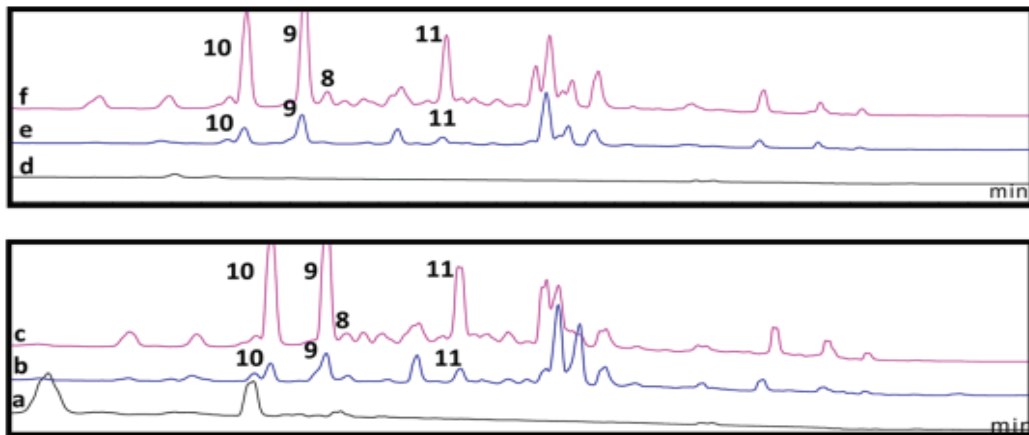


Figura 8: Cromatografía HPLC de los extractos crudos (Detección UV:235). A- control *Bacillus subtilis*, b-control de *Aspergillus australfricanus*, c- cocultivo de *A. australfricanus* con *B. subtilis*, d-control *Streptomyces lividans*, e-control de *A. australfricanus* en diferente cultivo que en b y f-cocultivo de *A. australfricanus* y *S. lividans*. Se observó gran diferencia entre los perfiles cromatográficos de los controles (fermentación anexica) versus la fermentación mixta (co-cultivo). Hubo un aumento en la producción de esteroides (9-11) en la fermentación mixta. Figura adaptada (Ebrahim y col., 2016).

-Estrés mecánico.

Los daños mecánicos y las condiciones ambientales adversas impactan en el crecimiento, reproducción y desarrollo de los hongos filamentosos. Debido a que los hongos en el ambiente natural se encuentran fijos y no pueden trasladarse por sí mismos, son vulnerables a los daños mecánicos producidos por depredadores. Este daño representa un estrés. Ante estas lesiones forman, por ejemplo, estructuras reproductivas (Figura 9 A). Un comportamiento de este tipo se observó en *Aspergillus flavus*, *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. virens* y *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii* que expresan estructuras de reproducción asexual (conidios) y así evita la pérdida excesiva de citoplasma y la muerte celular pero en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* no se ha observado este comportamiento (Hernandez-Oñate y Herrera-Estrella, 2015). Esto no es solo importante por el hecho de comprender los mecanismos que regulan los daños mecánicos, la regeneración y

diferenciación celular sino que además muestra las variaciones en los perfiles metabólicos ante un estímulo externo.

La vía de señalización se encuentra esquematizada en la figura 9B, y se activa la vía MAPK tanto en las plantas, animales como en los hongos pero la reparación del daño es diferente en los 3 reinos.

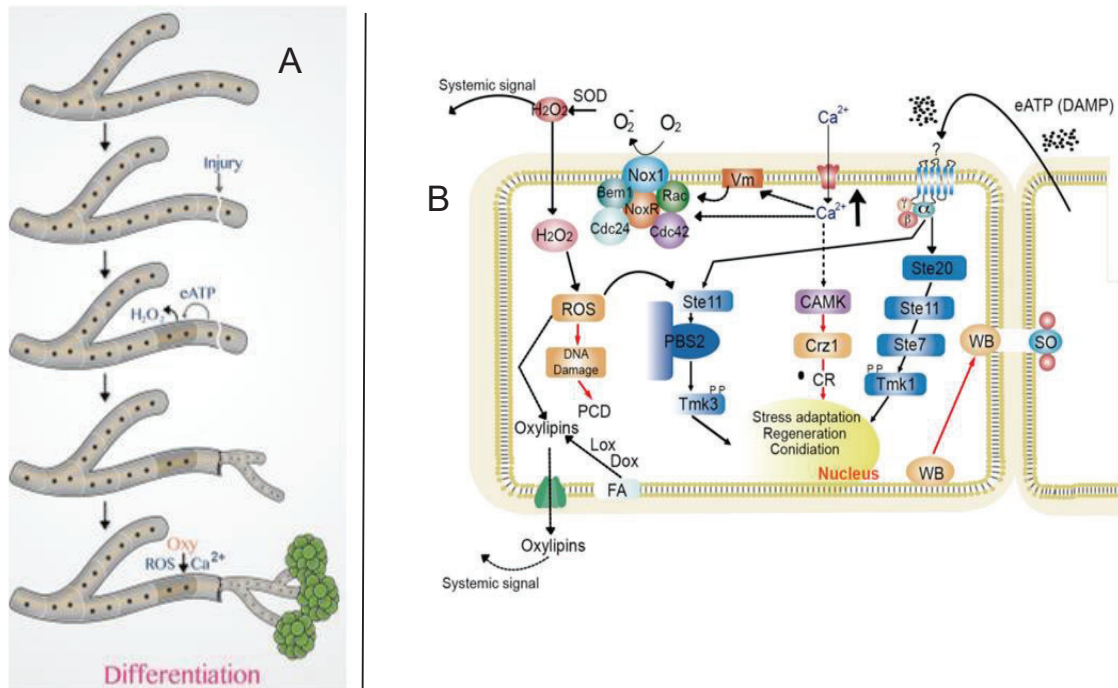


Figura 9: A-Esquema de la respuesta celular ante un daño mecánico infringido. Se demostró que las hifas dañadas se sellaban debido a la formación de cuerpos *Woronin* en el poro septal adyacente a la célula dañada, evitando así la pérdida excesiva de contenido citoplasmático y la muerte celular. Posteriormente se formaban una o varias hifas a partir de ella. Figura adaptada (Hernandez-Oñate y Herrera-Estrella, 2015) B- La respuesta de *Trichoderma atroviride* ante un daño provoca 1) la liberación de DAMPs, eATP (trifosfato de adenosina extracelular) y Calcio (Ca²⁺). 2) hipotéticamente el eATP es reconocido por un receptor G (subunidad α , β y γ). 3) El reconocimiento de eATP más el cambio intracelular de los niveles de calcio provocan la activación de NOX 1 (complejo NADPH oxidasa 1) que regula producción de ROS . 4) Se activa la vía de señalización MAPK (TMK1 Y TMK3) en respuesta al daño ya que la producción de ROS dependiente de Nox 1 activa a TMK3 y el eATP activa a TMK1. 5) La síntesis de Oxilipina se induce tras el daño que podría impactar en la diferenciación celular. Abreviaciones: Dox (dioxigenasas, oxida al sustrato), Lox (lipoxigenasa es oxidoreductasa principalmente se encuentra en plantas), FA (ácido graso), SOD (superóxido dismutasa), Vm (potencial de membrana), WB (cuerpo de Woronin), PCD muerte celular programada, CAMK cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina, Crz1 factor de transcripción sensible a calcineurina, CR respuesta al calcio. Las flechas sólidas indican datos apoyados por pruebas experimentales en *Trichoderma*, las flechas discontinuas indican datos apoyados experimentalmente en otros sistemas fúngicos, y las flechas punteadas indican pasos completamente hipotéticos. Las flechas negras indican los mecanismos moleculares compartidos por las plantas-animales-hongos y las flechas flechas rojas, los eventos específicos de los hongos. Figura adaptada (Hernandez-Oñate y Herrera-Estrella, 2015)

1.3 Modelo de estudio: *Cadophora malorum*

En 1927 Lagerberg introdujo el género *Cadophora*, que actualmente incluye a 22 especies. El género *Cadophora* pertenece a la división de *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes* y orden *Helotiales*, al cual pertenece *C. malorum*. El género *Cadophora* posee afinidad filogenética con otros linajes helotiales como *Leptodontidium*, *Acephala* y *Phialocephala* y una mayor distancia con *Hyaloscyphaceae* los cuales forman micorrizas (Maciá-Vicente y col., 2020). Se ha aislado de suelos, lagos de agua dulce, cabañas de madera y de algunos troncos. Las especies saprofitas dentro de este taxón (*C. malorum*, *C. luteo-olivacea*, etc) principalmente se encuentran en regiones polares y como patógenos o endófitos en diferentes plantas en todo el mundo (Zhang y col., 2022).

Las especies del género *Cadophora* se clasifican como endófitos septados oscuros (DSE) los cuales se caracterizan por colonizar raíces de plantas sanas y pueden promover el crecimiento de las plantas sin causar ningún efecto negativo. Son potencialmente importantes como promotores del crecimiento de las plantas o como agentes de control biológico. Aumentan la absorción de nitrógeno y de fósforo, desempeñan un papel clave en la protección de las plantas contra el estrés abiótico (p. ej., sequía, salinidad y contaminación) y biótico (por ejemplo patógenos de plantas) (Berthelot y col., 2019; Jumpponen y col., 2001; Zhu y col., 2021).

Dentro de este género se encuentran también patógenos de plantas como *Cadophora gregata* que causa la podredumbre marrón del tallo de las chauchas (Day y col., 2012). Las plantas leñosas perennes son susceptibles a formar una relación simbiótica con hongos como con los hongos ectomicorrícicos que a diferencia de las micorrizas no penetran las paredes celulares del huésped, forman una red de hifas alrededor de la raíz ayudando a absorber nutrientes, agua y minerales a cambio de obtener su fuente de alimentación, en este tipo de interacción un ejemplo es *C. finlandia* (Azaiez y col., 2018).

La primera especie identificada de este género fue *Cadophora fastigiata* la cual fue reasignada como *Phialophora fastigiata* y con ella se determinó en 1927 el estándar morfológico, el cual consta de conidióforos que se encuentran coronado por una sola fiálida (célula conidiógena) con distinto collarines hialianos (conidios). La caracterización morfológica es vagamente informativa debido a la variación en las dimensiones de los conidios, hifas, conidióforos y células conidiógenas lo cual impacta negativamente a la hora de establecer un límite filogenético (Travadon y col., 2015). *Cadophora antarctica* (Figura 10) es un ejemplo de esto ya que difiere de todas las especies conocidas del género dado que forma conidióforos similares al taxón *Cladosporium* (Crous y col., 2017).

La manera de categorizar las especies es mediante la secuenciación del ADN ribosomal 28S (ADNr) y/o de ITS (separadores internos transcritos) ubicados entre el ADNr 28S y 5.8S (Figura 11). Mediante la secuenciación de ADNr se demostró que *Cadophora fastigiata*, *C. melinii* y *C. malorum* se agrupan con las *Dermateaceae* de los *Helotiales* (Harrington y col., 2003).

En este trabajo el modelo de estudio fue *Cadophora malorum*. Mary Nest Kidd y Albert Beaumont en 1924 (McColloch,1994) lo aislaron por primera vez de un manzano de Gran Bretaña que sufría pudrición blanca y fue descrito como "*Sporotrichum malorum*". En la actualidad se confirma si un aislamiento corresponde a *C. malorum* analizando la similitud de ITS contra la base de datos almacenada en GenBank.



Figura 10: En la figura A se observa *C. antarctica* aislada en Antártida y en la figura B *Cladosporium aerium* (CBS 143356). Se puede apreciar la similitud morfológica en los conidióforos, siendo conidios ovoides dispuestos en largas cadenas en ambos casos. La figura A adaptada (Crous y col., 2017) y la Figura B (Bensch y col., 2018).

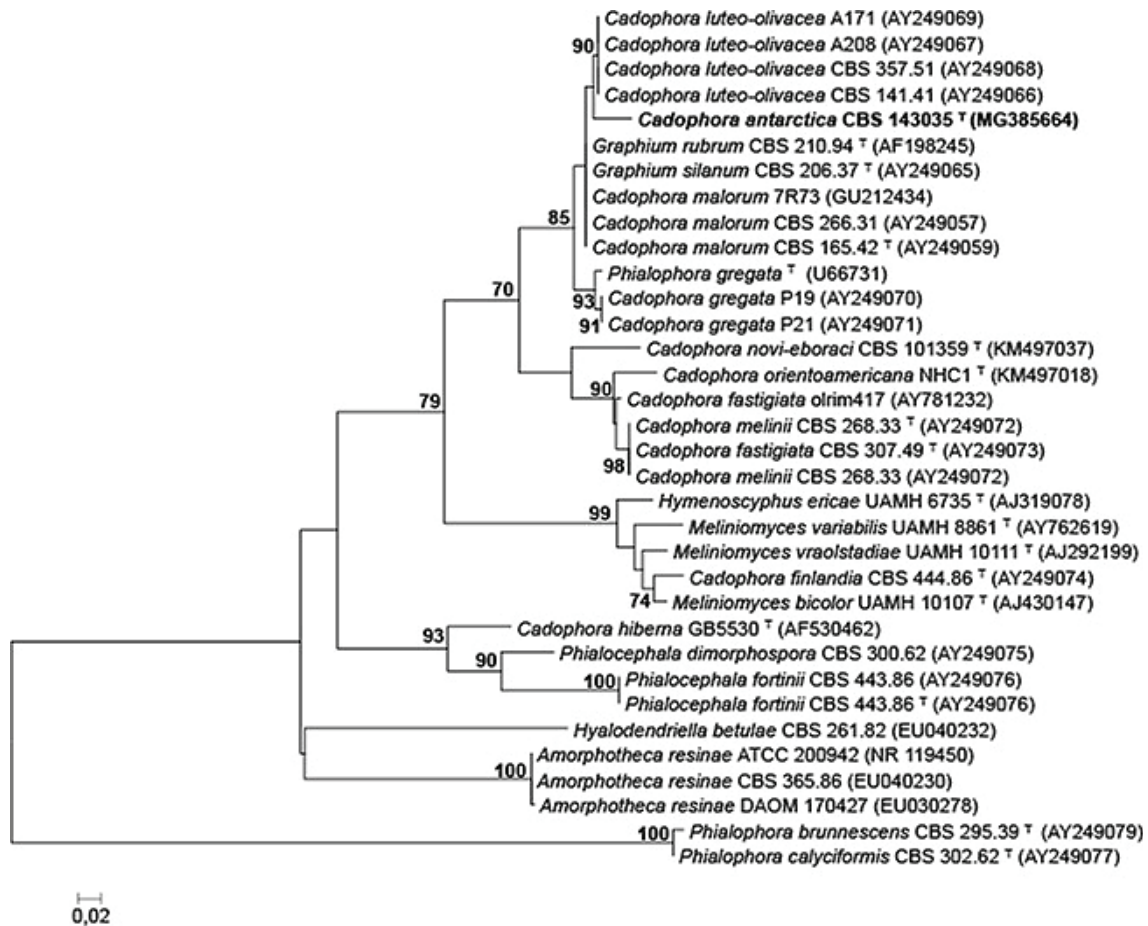


Figura 11: Árbol filogenético de mayor verosimilitud en donde se estimó el pasado evolutivo basado en comparaciones moleculares. Las cepas actuales se encuentran en los nodos externos del árbol mientras que en los nodos internos se encuentran las secuencias ancestrales. Este árbol se construyó a partir de alineamientos múltiples de secuencias de ADN ITS. Figura Adaptada (Crous y col., 2017)

En el año 2016 se realizó un proyecto de secuenciación a *C. malorum* Mo12 aislada del Atlántico donde se reveló su potencial biotecnológico. Se informó que el 47,08% del genoma es rico en GC y el 0,76% representa secuencias repetitivas. De los genes encargados de la biosíntesis de metabolitos secundario se encontraron 6 policéticos sintasas tipo I (PKS), 5 péptidos sintasas no ribosomales (NRPS), y dos híbridas (PKS/NRPS) más dos genes de terpeno sintasa. Los metabolitos secundarios obtenidos de PKS y NRPS poseen una gran complejidad y diversidad estructural y suelen estar codificados en agrupamientos de genes. Posee 230 genes que codifican enzimas activas relacionadas con el metabolismo de

carbohidratos (CAZymes) en conjunto con 101 glucósido hidrolasas, 74 glicosiltransferasas, 1 polisacárido liasa, 10 carbohidrato esterasa, 29 módulos de unión a carbohidratos y 15 actividades auxiliares. Se destaca una reducción en los genes que codifican enzimas encargadas de degradar la pared celular vegetal. Esto último refuerza la idea del alejamiento filogenético que presenta este género con las micorrizas (Rédou y col., 2016).

En estos últimos años se realizaron investigaciones *in vitro* donde se destacó el comportamiento antifúngico de *Cadophora malorum* frente a otros hongos y la generación de dos metabolitos de los cuales se conoce su estructura (Donalle y col., 2022). Estos son dos cicloheptapéptidos (Cadophorina A y B) (Figura 12) de los cuales se cree deriva su actividad antifúngica. Además, estas moléculas presentan afinidad de unión a metales, lo cual representa una característica con diversas aplicaciones biotecnológicas.

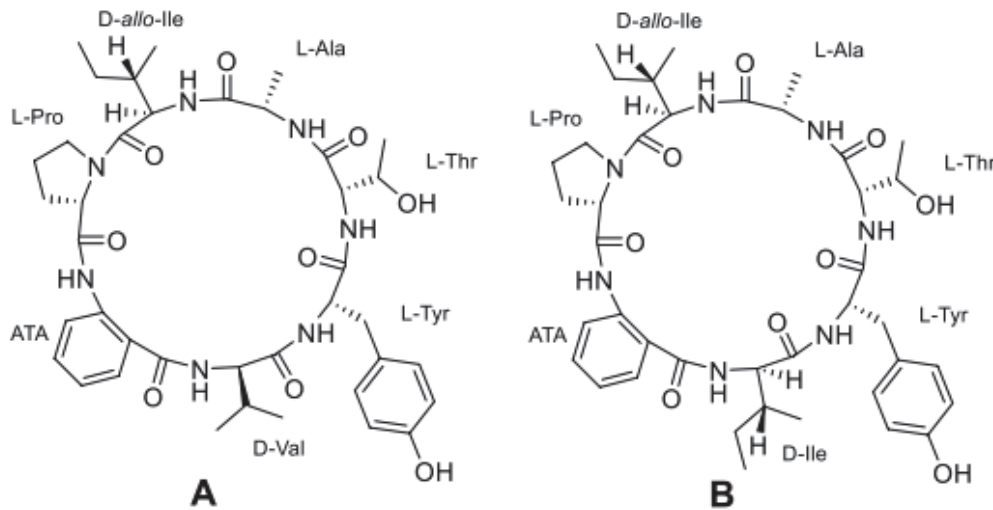


Figura 12: Cadophorinas A y B aisladas de *Cadophora malorum* . Figura adaptada (Donalle y col., 2022).

2 HIPÓTESIS:

Hongos filamentosos provenientes de regiones con condiciones extremas cuentan con adaptaciones fisiológicas y genéticas que resultan en vías metabólicas capaces de producir moléculas novedosas con actividad antimicrobiana, en particular aquellas cuya estructura base sea una cadena peptídica, cuya vía de síntesis se encuentra codificadas en agrupamientos de genes que son silentes en condiciones normales de cultivo y cuya expresión puede ser desencadenada por exposición a distintos tipos de estrés.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general del proyecto.

Desarrollar y utilizar una plataforma para la búsqueda de péptidos antimicrobianos en *C. malorum* estimulando la síntesis de moléculas cuyas vías estén total o parcialmente codificadas en agrupamientos de genes silentes, utilizando estrés (físico-químico, fisiológico y biológico).

3.2 Objetivos específicos de este trabajo de tesis.

- 1- Realizar cultivos de *C. malorum* aplicando distintas condiciones y estrategias..
- 2- Realizar cultivos *C. malorum* y someterlos a daño mecánico.
- 3- Construir una colección de extractos a partir de los objetivos 1 y 2.
- 4- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos seleccionados mediante pruebas estándar de actividad antimicótica y antibacteriana.
- 5- Analizar preliminarmente los extractos utilizando HPLC-MS a fin de identificar presencia de patrones novedosos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos y medio de cultivo

Se trabajó con un aislamiento de *C. malorum* obtenido de suelo en Península Potter, Isla 25 de Mayo, Archipiélago Shetlands del Sur, Antártida Argentina (Figura 13). El aislamiento forma parte del cepario del Instituto Antártico Argentino. Para activarlo se realizó un repique en medio PDA a partir de una muestra conservada en glicerol 40% a -80°C y se cultivó a 15°C . Los repiques se realizaron cada 15 días para mantener el aislamiento activo.

Se utilizó como medio de cultivo caldo papa dextrosa (PDC) (en g/L: 1 L de agua de cocción de 200 g de papa, glucosa 20 g) y agar papa dextrosa (PDA) agregando agar (20 g/L) al caldo. El valor de pH se ajustó a 5,6 en todos los medios.

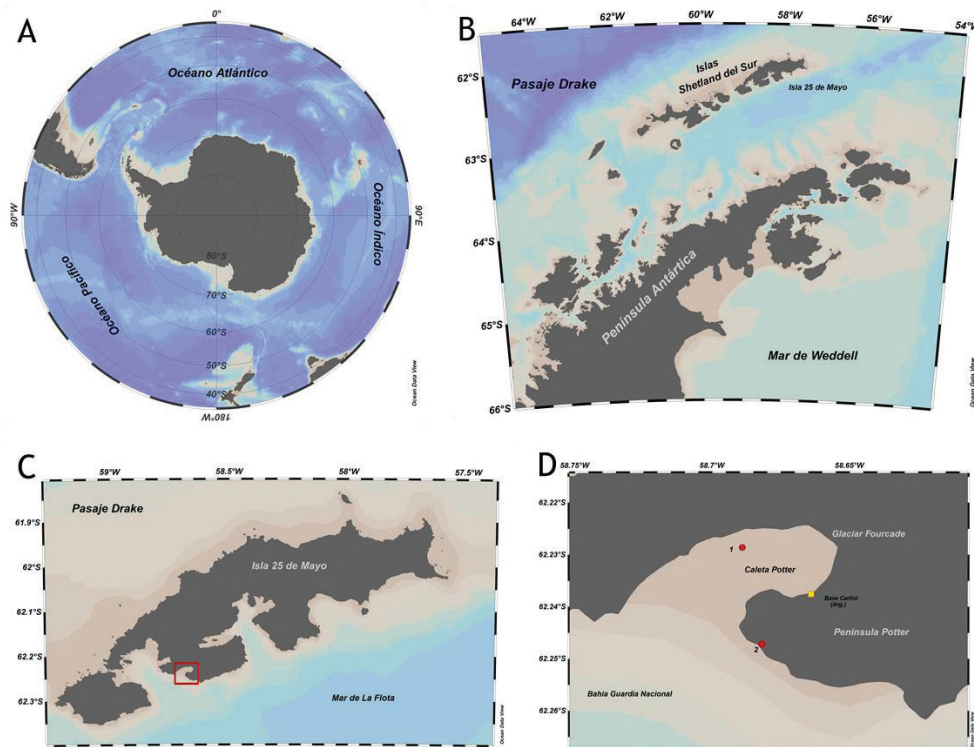


Figura 13: Ubicación geográfica del sitio de aislamiento de *C. malorum*, en Isla 25 de Mayo, Archipiélago Shetlands del Sur, Antártida.

4.2 Obtención de cultivos

Para todos los cultivos se inoculó con una suspensión de conidios de *C. malorum* estandarizado a escala McFarland de 0,5. Para obtener los conidios se sembraron placas de PDA con un pre-inóculo de *C. malorum* de 7 días, las placas se incubaron a 15°C por 14 días. Finalizada la incubación, se agregó a cada placa 5 mL de solución fisiológica estéril, se raspó el micelio con un ansa para favorecer el desprendimiento de los conidios y se recuperó la suspensión de conidios en condiciones de esterilidad, la misma se llevó a 0,5 de McFarland con el agregado de más solución fisiológica.

En todos los casos se inoculó con 100 µl de suspensión de conidios cada 50 mL de cultivo y se incubó durante 28 días en las condiciones a evaluar.

4.2.1 Condiciones de cultivo

Se evaluó el efecto de la aireación, agitación, temperatura de incubación y daño mecánico al micelio. A continuación se enumeran los once sistemas de cultivo que se desarrollaron para facilitar el análisis de los resultados.

En medio PDC (líquido):

- 1) Sistema líquido estático a 5°C
- 2) Sistema líquido estático a 15°C
- 3) Sistema líquido estático a 25°C
- 4) Sistema líquido agitado a 15°C y 200 rpm
- 5) Sistema en soporte inerte de espuma de poliuretano a 15°C
- 6) Sistema líquido estático a 15°C con daño mecánico al micelio
- 7) Sistema líquido agitado a 15°C y 200 rpm con daño mecánico al micelio

En medio PDA (sólido)

- 8) Sistema sólido a 5°C

- 9) Sistema sólido a 15°C
- 10) Sistema sólido a 25°C
- 11) Sistema sólido a 15°C con daño mecánico al micelio

Para el soporte sólido inerte (sistema estático) se utilizó espuma de poliuretano la cual se cortó en cubos de aproximadamente 1 ($\pm 0,5$) cm de lado. Este material fue tratado con solución de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, luego se lavó con agua destilada y se sumergió en etanol al 70%. Transcurrido 30 minutos se volvió a lavar con agua destilada y se secó en estufa durante 48 hs. Se generó el sistema de cultivo sobre soporte sólido utilizando como recipiente un frasco de vidrio con 0,8 gramos de cubos del poliuretano tratado y se utilizó como tapón un filtro de gasa-algodón-gasa que permitió el intercambio gaseoso, todo el sistema se autoclavó por 15 min a 121°C. En flujo laminar se incorporó a cada frasco 50 mL de medio PDC estéril y 100 μ l de la suspensión inóculo. Se contó con un control abiótico del medio sin suspensión de conidios y se pesó todos los días para analizar y compensar la pérdida de agua por evaporación.

En los sistemas líquido estático y sólido se trabajó en placas de Petri de 90 mm con 50 mL de cultivo. Para el sistema sólido la siembra se realizó con espátula de Drigalski. En el sistema líquido agitado se trabajó en Erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de cultivo. A mitad del cultivo, para evaluar el efecto del estrés por daño mecánico al micelio, que simulará un posible daño por predadores, en el caso del medio sólido se realizaron cortes con un bisturí estéril y en el caso de cultivos líquidos, se generó una disrupción de la biomasa con la ayuda de un pilón y un mortero estéril. Luego de realizar el daño mecánico a los cultivos estos se incubaron nuevamente en las condiciones específicas de cada sistema hasta finalizar el tiempo de cultivo (28 días).

4.3 Cuantificación por peso seco.

La biomasa presente en los sistemas líquidos estáticos a 5°C, 15°C y 25°C se separó del sobrenadante mediante centrifugación en tubos falcon de 50 mL por 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante se conservó a -20°C para su posterior análisis. La biomasa se lavó 2 veces con H₂O destilada, se depositó en canastas de aluminio previamente pesadas (Po), las muestras fueron secadas a 85°C hasta peso constante. El peso seco se expresó como gramos de biomasa producidos por litro de medio de cultivo (g/L).

4.4 Obtención de extractos orgánicos.

En una primera etapa se optimizó la extracción a partir de cultivos sólidos, para esto se evaluaron diferentes estrategias:

1. Extracción acuosa: se agregó el mismo volumen de H₂O destilada (50 g) que sustrato a extraer, se homogeneizó en procesadora y se incubó en agitación a 15°C *overnight* (*o.n.*). Luego de este periodo se recuperó la fase líquida y esta se sometió al proceso de extracción orgánica.
2. Liofilización del cultivo sólido: el sustrato (50 g) se sometió a un proceso de liofilización. Luego el material liofilizado procedió al proceso de extracción orgánica.
3. Extracción directa: 50 g del sustrato sólido se disgregó y se sometió a extracción con acetato de etilo directamente.

El material proveniente de los cultivos sólidos y líquidos se sometió a un proceso de extracción con acetato de etilo. Para esto a 50 g de cultivo (ya sea líquido o lo obtenido a partir de las estrategias de extracción de los cultivos sólidos) se le agregó 30 mL de Acetato de etilo, esto se agitó vigorosamente por 2 minutos y se dejó *o.n.*, transcurrido este periodo se separó y conservó la fase orgánica a -20°C y la fase acuosa se sometió dos veces más al proceso de extracción. El volumen final de cada extracción (aproximadamente 90 mL) se

secó en vacío en un equipo Rotavap a 40°C y finalmente se resuspendió en 2 ml de metanol. Se utilizó este solvente no solo por su gran capacidad para resuspender metabolitos de diversa polaridad sino por ser el solvente que se utilizaría para las corridas de HPLC-MS.

4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Los extractos se evaluaron contra hongos y bacterias de importancia clínica y epidemiológica. Para esto se utilizó el método de difusión en placa de Kirby-Bauer por ser confiable y estándar (Nassar y col., 2019) permitió predecir la eficiencia antifúngica y/o antibacteriana de los mismos.

4.5.1 Evaluación de la actividad antifúngica.

Las hongos y levaduras utilizadas como microorganismos blanco fueron: *Candida albicans*, *Candida haemulonii*, *Trichosporon* sp., *Aspergillus fumigatus* (S), *A. fumigatus* (R), *A. lentulus* y *Rhizopus* sp.. Los mismos fueron gentilmente cedidos por IMPaM (Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, UBA-CONICET).

La prueba de sensibilidad a los extractos de *C. malorum* se llevó a cabo utilizando el método de difusión por placa de Kirby-Bauer. Los cultivos fúngicos se repicaron en medio PDA a 30°C por 48 horas, a partir de estos cultivos se realizaron suspensiones de conidios y/o biomasa y se estandarizaron a una escala de McFarland de 0,5. Un volumen de 100 µl de la suspensión fúngica a evaluar se sembró en placas de medio PDA y se dispersó uniformemente mediante espátula de Drigalsky. Se colocaron los discos de ensayo de antibióticos Whatman® con una pinza estéril en el agar inoculado.

Se agregó a cada disco 20 µl del extracto de *C. malorum* a evaluar y como control positivo cicloheximida (20 µl concentración 10 mg/ml) y como control negativo metanol (20 ul). Las

placas se incubaron a 30°C durante 48 horas y se midió el diámetro de los halos de inhibición obtenidos. Se trabajó por triplicado para cada extracto a evaluar.

4.5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.

Las cepas bacterianas utilizadas como microorganismo blanco fueron *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas putida* ATCC 17484 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Estas cepas forman parte del cepario del grupo Microbiología del IAA y se mantienen conservadas en glicerol a -80°. Los aislamientos congelados se activaron por repiques en medio agar nutritivo antes de la prueba.

La prueba de sensibilidad a los extractos de *C. malorum* se llevó a cabo utilizando nuevamente el método de difusión por placa de Kirby-Bauer. Los cultivos bacterianos se ajustaron a una densidad óptica equivalente a 0,5 de la escala de McFarland y por tratarse de suspensiones bacterianas también se midió la DO que estuvo en valores entre 0,10 - 0,15. Se realizó el mismo procedimiento descrito en 4.5.1, pero en este caso como control positivo se utilizó Ampicilina (20 µl concentración 0,1 mg/ml), En este caso las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se midió el diámetro del halo de inhibición. Nuevamente, se trabajó por triplicado con cada extracto a analizar.

4.5.3 Análisis estadístico.

La información se procesó por el *Minitab 19 Statistical Software*. Los datos se sometieron a una prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguidos de la prueba de comparación de medias muestrales de Turkey. Los gráficos fueron realizados con el programa *GraphPad Prism*.

4.6 Análisis de los extractos mediante HPLC-MS.

Las corridas de HPLC-MS se realizaron en UMyMFOR (Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica-CONICET-UBA) mediante HPLC-ESI-Q-TOF usando los equipos RRLC Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) acoplado a un espectrómetro de masas con fuente ESI Bruker micrOTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Se utilizó la columna Luna C18 Phenomenex, 3 m, 2.0 x 100 mm y en modo gradiente según las siguientes condiciones: 10% B (1 min), 10-75% B (1-25 min), 100% B (26-44 min); ácido fórmico 0.1% (A); metanol (B), flujo 0.3 mL/min.

Las muestras analizadas por HPLC fueron 11:

- M1: cultivo líquido estático 15°C
- M2: cultivo líquido agitado 15°C
- M3: cultivo en soporte inerte a 15°C
- M4: cultivo líquido estático a 15°C sometido a daño mecánico
- M5: cultivo líquido agitado a 15°C con daño mecánico
- M6: cultivo sólido a 15°C con daño mecánico
- M7: cultivo líquido estático a 5°C
- M8: cultivo líquido estático a 25°C,
- M9: cultivo sólido a 5°C
- M10: cultivo sólido a 15°C
- M11: cultivo sólido a 25°C

5 RESULTADOS

5.1: Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum*

A partir de los cultivos de *C. malorum* en las 11 condiciones evaluadas, se obtuvieron extractos orgánicos que se probaron contra microorganismos de relevancia clínica. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al enfrentar los extractos orgánicos de *C. malorum* frente a diferentes hongos y levaduras de importancia clínica y epidemiológica.

Los extractos mostraron actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. haemulonii*, *Trichosporon sp.*, *A. fumigatus* (S), *A. fumigatus* (R) y *A. lentulus*. En el caso de *C. albicans* se observó la presencia de halos de inhibición semejantes o mayores a los obtenidos con cicloheximida.

Se realizó una cuantificación por peso seco de los cultivos estáticos incubados a 5°C, 15°C y 25°C. De esto se obtuvo:

- $(2,2 \pm 0,4)$ g/l de biomasa en la condición de líquido estático incubado a 5°C
- $(5,9 \pm 0,5)$ g/l de biomasa en la condición de líquido estático incubado a 15°C
- $(6,3 \pm 0,3)$ g/l de biomasa en la condición de líquido estático incubado a 25°C

Por el análisis estadístico (*ANOVA*) no se observaron diferencias significativas en la formación de biomasa a 15°C y 25°C.

A partir de los resultados obtenidos por peso seco se realizó la normalización de la actividad antifúngica de los extractos orgánicos de *C. malorum* proveniente del sistema estático incubado a 5°C, 15°C y 25°C (Fig. 14). La mayor actividad se observó en el líquido estático a 5°C por gramo de biomasa.

Sistema de cultivo	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Trichosporon</i> sp.	<i>A. fumigatus (R)</i>	<i>A. fumigatus (S)</i>	<i>A. lentulus</i>	<i>Rhizopus</i> sp
Líquido estático a 15°C	1.03±0.08	2.23±0.08	1±0	1.32±0.09	1.32±0.15	1.11±0.12	-
Líquido agitado 15°C	0.98± 0.04	1.27±0.14	1.1±0.2	0.93±0.07	0.94±0.04	0.93±0.13	-
Cultivo líquido en soporte sólido a 15°C	1±0.06	1.62±0.03	0.95±0.05	0.98± 0.03	1.3±0.2	0.98±0.04	-
Cultivo sólido a 15°C	1.03±0.07	2.05±0.13	0.96±0.09	1.06±0.07	1.26 ±0.13	1.05±0.06	-
Extracción acuosa	0.98±0.03	1.8 ±0.14	0.73±0.04	0.98±0.11	0.93 ±0.04	0.83±0.05	-
Liofilizado	0.80±0.06	1.69±0.01	0.84±0.05	0.87±0.05	0.83±0.04	0.81±0.01	-
Líquido estático 15°C-daño mecánico	1.06±0.14	1.48±0.27	1.1±0.2	1.13±0.07	1.01±0.02	1.03±0.03	-
Líquido agitado 15°C - daño mecánico	1.1±0.1	1.40±0.14	1.25±0.25	1±0	0.98±0.03	0.99±0.02	-
Cultivo sólido a 15°C - daño mecánico	0.98±0.08	1.9±0.1	1.2± 0.3	1.02±0.03	1.00±0.06	0.93±0.03	-
Líquido estático 5°C	0.9±0.1	1.13±0.08	1.1± 0.3	0.94±0.05	0.97±0.04	0.88±0.06	-
Líquido estático 25°C	0.95±0.03	1.18±0.09	1.22±0.35	0.9± 0.1	1.06±0.24	0.89±0.13	-
Cultivo sólido 5°C	0.94±0.14	1.11±0.09	0.95±0.08	0.98± 0.03	1.05±0.08	0.98±0.03	-
Cultivo sólido 25°C	1.03±0.08	0.94±0.07	1.2±0.3	0.9±0.1	1.18±0.12	0.88±0.06	-
Cicloheximida (10 mg/ml) 20ul	1.98±0.11	1.08±0.04	2.6±0.5	3.1±0.4	2.95±0.70	3.1±0.5	1.4±0.2
Metanol	0.9±0	0.9±0.1	-	-	-	-	-

Tabla 4: Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de *C. malorum* frente a los microorganismos blancos. Los valores obtenidos son el promedio de la zona de inhibición (cm) con su desvío estándar correspondiente. Control positivo cicloheximida (20 µl, concentración 10 mg/ml) y como control negativo metanol (20 µl)

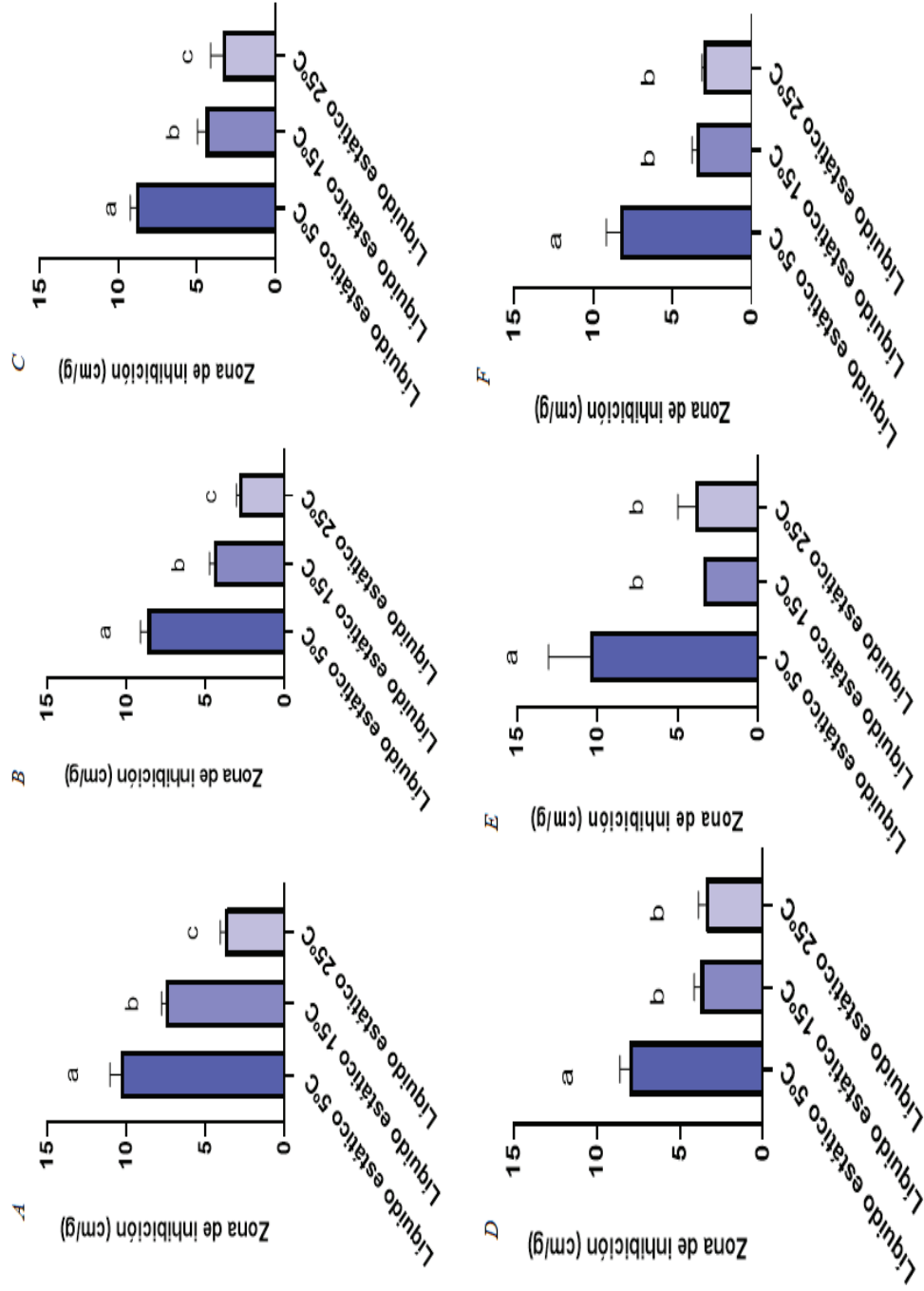


Figura 14: Normalización de la actividad antifúngica presente en los extractos de *C. malorum* contra **A-C**- *A. fumigatus* (**R**) **C-A**- *A. fumigatus* (**S**) **D-A**- *Trichosporon* sp. **F-C**- *haemulonii* de los sistemas líquido estático 5°C, 15°C y 25°C. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) por gramo de sustrato con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

Debido a la imposibilidad de realizar una normalización por peso seco en el resto de los cultivos, los datos se analizaron de manera cualitativamente, solo teniendo en cuenta el tamaño de los halos y que todos los extractos se obtuvieron a partir de la misma cantidad de cultivo inicial.

Al analizar el efecto del daño mecánico se observó que en la mayoría de los casos no aumentó la actividad antifúngica excepto en el extracto del líquido agitado con daño mecánico frente *A. fumigatus* y *C. haemulonii* donde sí se observó un ligero aumento (Figura 15 B-C y F).

Al evaluar el efecto de distintas temperaturas de cultivo sobre la actividad antifúngica de los extractos del líquido estático y sólido se observó que en la mayoría de los casos esta fue mayor para los extractos obtenidos del líquido estático y sólido a 15°C excepto en *C. haemulonii* y *Trichosporon* sp (Figura 16 F y E) . En el caso de *C. haemulonii* no se observó diferencia significativa en la actividad antifúngica en los extractos obtenidos del sistema sólido bajo las diferentes temperaturas de incubación mientras que contra *Trichosporon* sp. no se observaron diferencias significativas en ninguna de las condiciones probadas.

Por último se evaluó el efecto del sistema de cultivo (ya sea sumergido, sólido o en soporte inerte) sobre la actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum*. En la mayoría de los casos la actividad antifúngica presentó mayores valores en el líquido estático y sólido a 15°C. En el caso de *C. haemulonii* no se observó una diferencia significativa en la actividad presente en los extractos de *C. malorum* obtenidos del sistema líquido incubado a diferentes temperaturas (Figura 17F). Contra *Trichosporon* sp. no se observó una diferencia significativa al evaluar la actividad antifúngica del líquido estático a diferentes temperaturas de incubación. (Fig. 17 E).

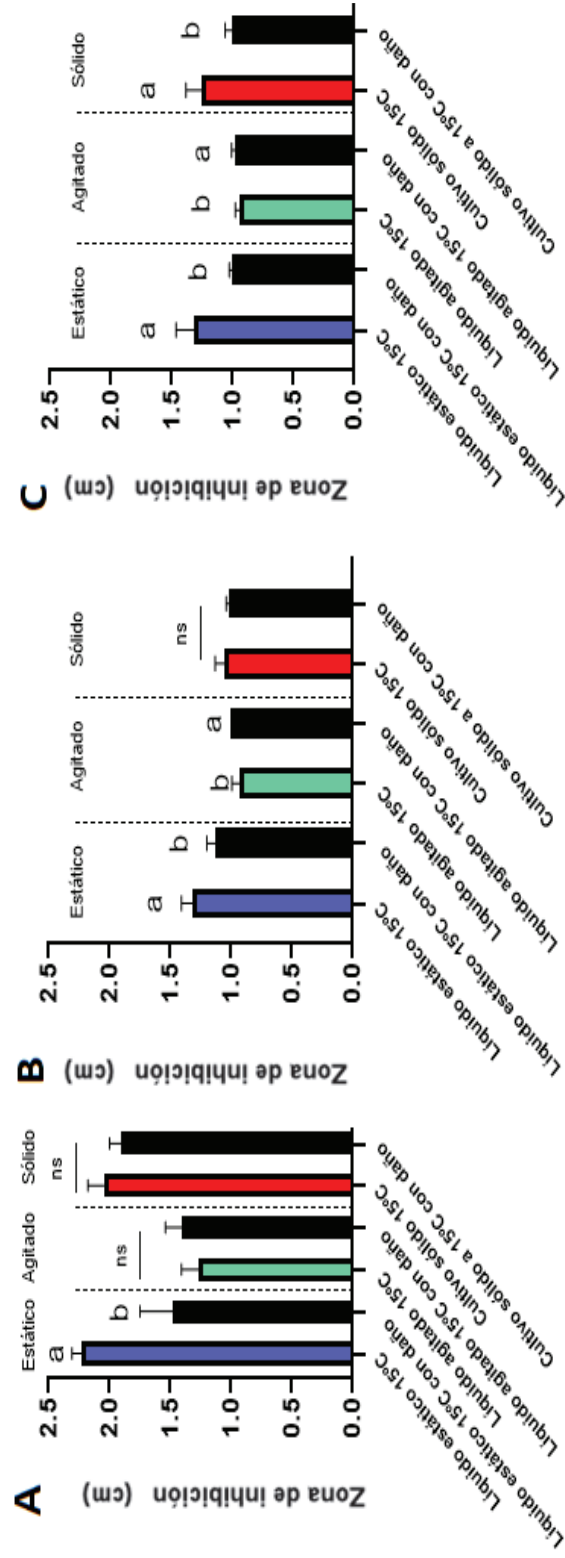


Figura 15. Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* con y sin daño mecánico contra *A. C. albicans* **B-** *A. fumigatus* (R) **C-** *A. fumigatus* (S). La estadística comparó la actividad antifúngica por separado de cada uno de los sistemas (estático, agitado y sólido) tanto con daño como sin daño. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar. Las diferentes letras representan diferencias significativas mientras que *ns* lo opuesto.

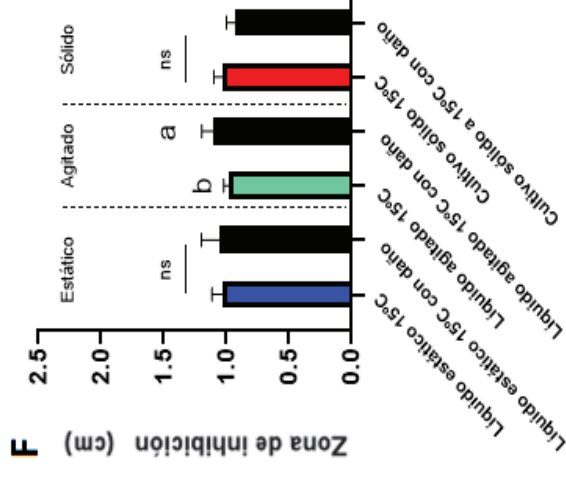
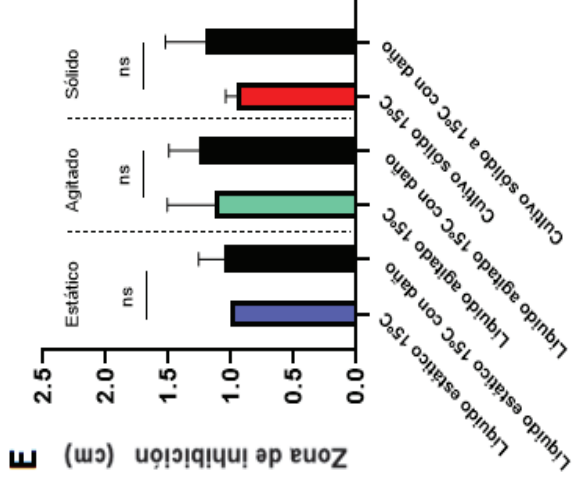
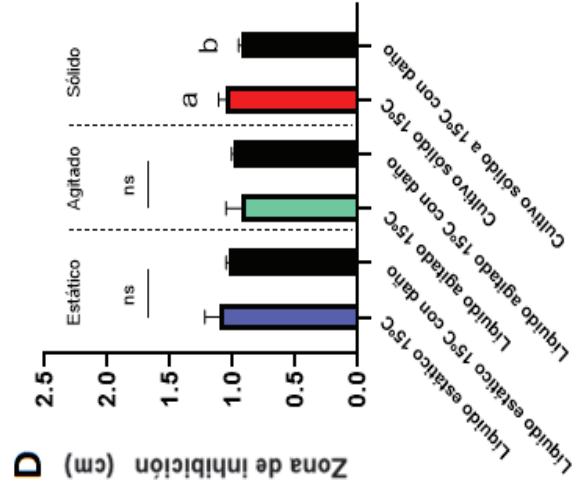


Figura 15 (continuación). Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* con y sin daño mecánico contra *D. A. lentulus* **E- Trichosporon sp.** **F-C. haemulonii**. La estadística comparó la actividad antifúngica por separado de cada uno de los sistemas (estático, agitado y sólido) tanto con daño como sin daño. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar. Las diferentes letras representan diferencias significativas mientras que *ns* lo opuesto.

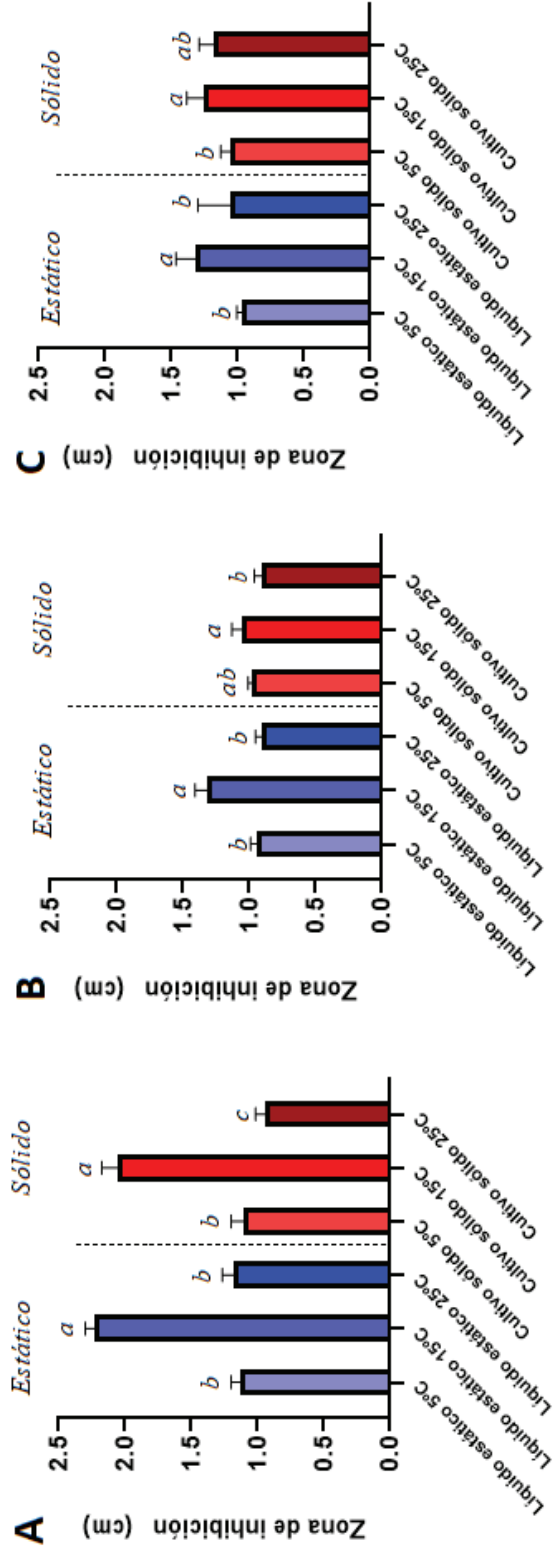


Figura 16. Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* sometidos a diferentes condiciones de temperatura contra **A- C. albicans B- A. fumigatus** (R) **C- A. fumigatus** (S). Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

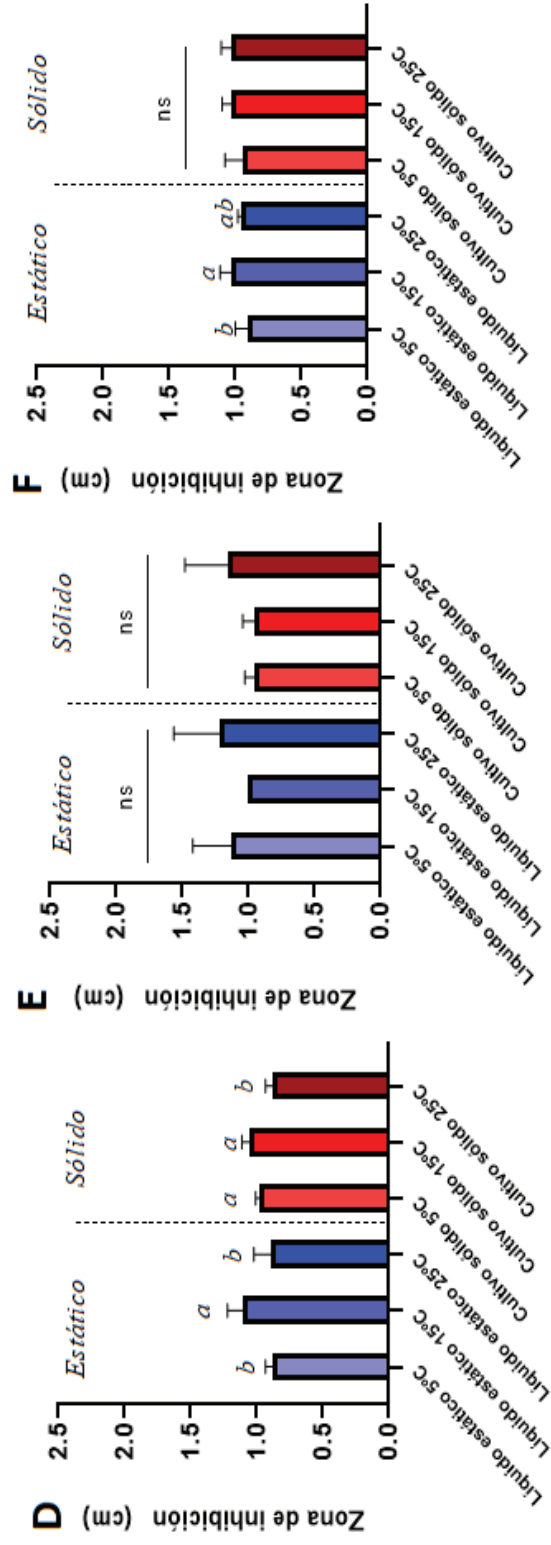


Figura 16 (continuación). Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* sometidos a diferentes condiciones de temperatura contra *D. A. lentulus* E-*Trichosporon* sp. F- *C. haemulonii*. . Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

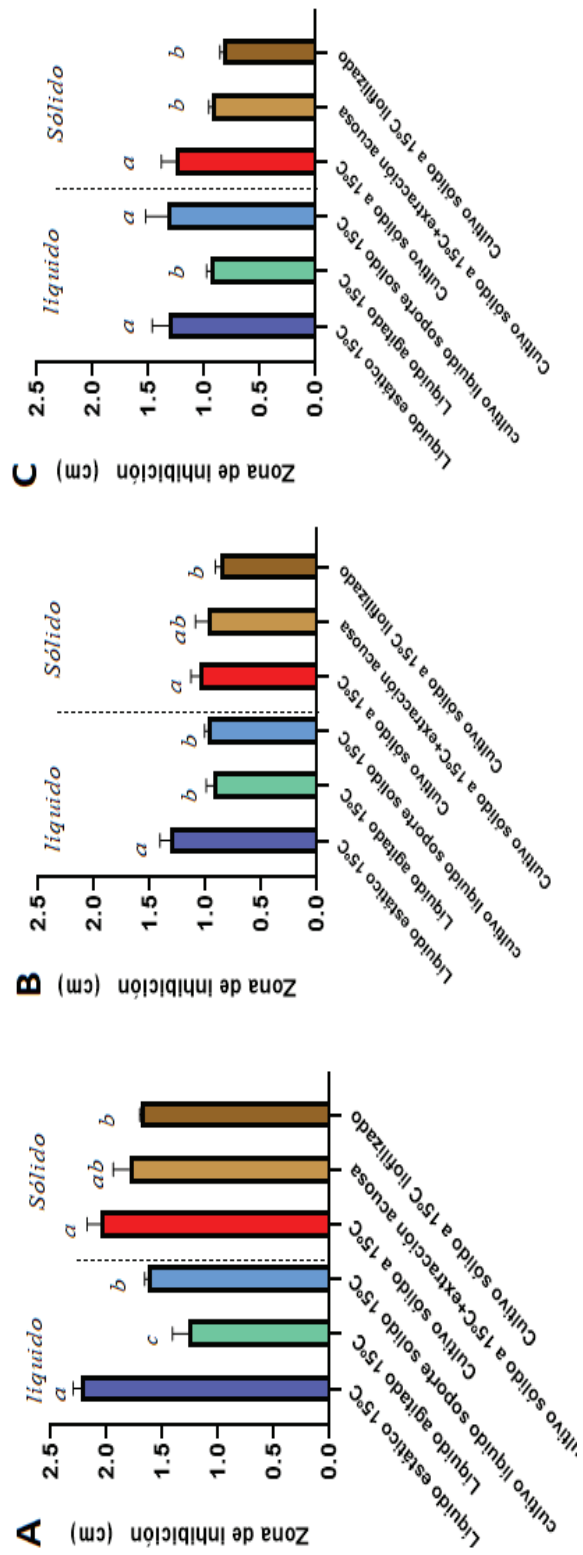


Figura 17. Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* bajo distintas condiciones de cultivo contra **A-** *C. albicans* **B-** *A. fumigatus* (**R**) **C-** *A. fumigatus* (**S**). Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

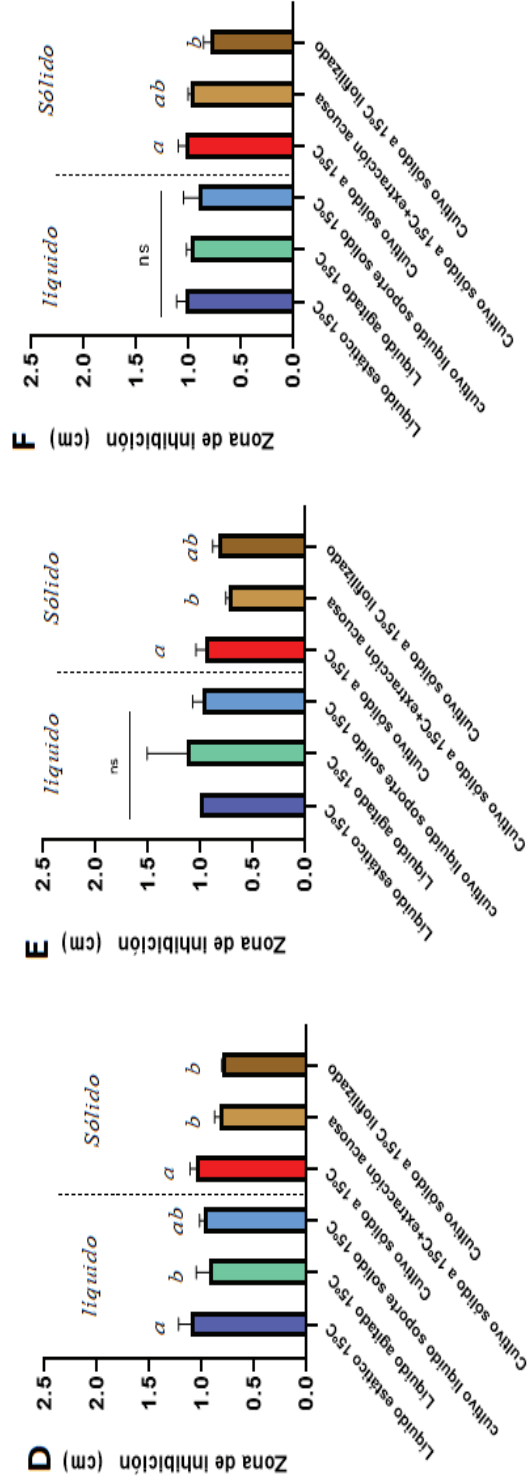


Figura 17 (continuación). Actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* bajo distintas condiciones de cultivo contra *D- A. lentulus E- Trichosporon* sp. *F- C. haemulonii*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (cm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

5.2: Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum*

Los extractos mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. putida* ATCC 17484 y *B. subtilis* ATCC 6633 (Tabla 5).

Se analizó la actividad antibacteriana de los extractos por gramo de sustrato y en los casos evaluados se observó una mayor actividad antibacteriana en el cultivo estático a 5°C (Fig 18).

Al igual que en el análisis anterior contra hongos y levaduras, debido a la dificultad de realizar una normalización por peso seco en el resto de los cultivos, los datos se analizaron de manera cualitativamente, solo teniendo en cuenta el tamaño de los halos y que todos los extractos se obtuvieron a partir de la misma cantidad de cultivo inicial.

Al analizar el efecto del daño mecánico se observó que en la mayoría de los casos esto no aumentó la actividad antibacteriana excepto en el extracto de líquido agitado con daño mecánico frente a *B. subtilis* ATCC 6633 (Fig. 19 A). Al evaluar el efecto de la variación de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los extractos del líquido estático a nivel cualitativo se observó que en la mayoría de los casos no había una diferencia significativa excepto contra e *S. aureus* ATCC 6538, en donde se evidenció una mayor actividad antibacteriana en extracto estático a 15°C (Fig. 20 H) . En el caso de los extractos del medio sólido la variación de temperatura impactó sobre la actividad antibacteriana en *S. aureus* ATCC 6538 (Fig. 20H), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Fig. 20G), *K. pneumoniae* (Fig, 20 D), *B. subtilis* ATCC 6633 (Fig.20 A) y *P. putida* ATCC 17484 (Fig. B). El extracto sólido a 15°C posee mayor actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* ATCC 9027, el extracto sólido a 25°C frente a *K. pneumoniae* y *B. subtilis* ATCC 6633 y el extracto sólido a 5°C frente a *P. putida* ATCC 17484.

Por último se evaluó cómo afectaba el sistema de cultivo (ya sea sumergido, sólido o en soporte inerte) en la actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* frente a los

diferentes microorganismos blancos. En la mayoría de los casos la actividad antibacteriana no presentó una variación significativa excepto en *S. aureus* ATCC 6538 (Fig. 21H), *P. putida* ATCC 17484 (Fig. 21B) y *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Fig. 21 G).

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. subtilis</i>
Líquido estático a 15°C	10,83±2,25	8,17±1,13	7,75±0,82	8±0,32	10±2,53	8,75±1,6	7,42±0,49	8,08±0,92
Líquido agitado 15°C	9,75±1,44	7,75±0,42	7,5±0,55	10,42±2,8	8,58±1,36	11,5±1,87	9,75±1,6	8,25±2,09
Cultivo líquido en soporte sólido a 15°C	8±0,95	8,17±1,37	8,5±1,73	9,25±1,37	8,33±1,25	8,75±1,41	9,17±2,04	7,5±0,84
Cultivo sólido a 15°C	10,17±0,41	10,42±1,5	8,08±1,86	9±1,38	10,58±3,5	8,83±2,14	7±0	9,5±1,05
Líquido estático 15°C-daño mecánico	9,5±0,63	8,17±0,68	8,83±1,33	8,58±2,46	10,33±1,37	7,75±0,61	8,5±1,18	8,42±1,69
Líquido agitado 15°C - daño mecánico	9,17±0,68	8,67±1,08	8,25±1,17	7,25±0,42	9,17±1,13	8±0,84	8±0,89	11,08±1,43
Cultivo sólido a 15°C - daño mecánico	8,67±2,04	8,08±0,86	6,67±0,26	8,58±1,39	7,58±0,92	7,67±1,21	7,33±0,52	8±1,97
Líquido estático 5°C	9,25±1,17	8,67±1,18	9,08±1,63	9,08±1,9	9,67±0,52	8,83±1,6	7,92±0,58	11,58±0,8
Líquido estático 25°C	8,08±0,66	7,42±0,66	10,42±2,73	9,25±1,17	8,92±0,8	8,17±1,17	8,25±1,17	9,7±0,41
Cultivo sólido 5°C	7±0,45	6,58±0,38	9,5±1,38	8,42±2,01	7,17±0,26	8,58±1,63	9,25±1,33	8,17±0,98
Cultivo sólido 25°C	8,45±1,5	10,42±0,49	10,33±1,72	8,92±0,74	10,83±2,14	8,75±1,41	8,25±1,17	10,83±0,98
Ampicilina	19,10±1,03	17,50±1,05	9,08±0,49	15,33±2,42	-	14,50±1,05	9,83±1,47	17,67±2,06
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5: Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *C. malorum* frente a los microorganismos blancos. Los valores obtenidos son el promedio de la zona de inhibición (mm) con su desvío estándar correspondiente. Control positivo Ampicilina (20 µl concentración 0,1 mg/ml) y negativo metanol (20 µl)

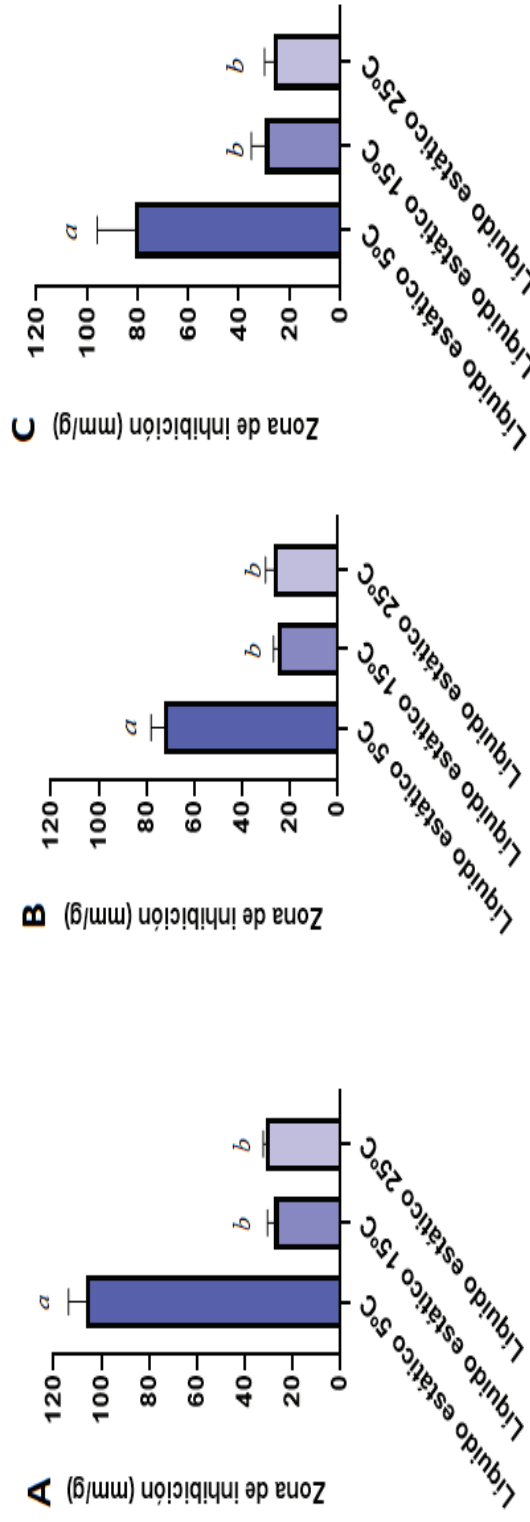


Figura 18: Normalización de la actividad antibacteriana presente en los extractos de *C. malorum* (obtenidos de los sistemas líquido estático 5°C, 15°C y 25°C.) contra **A-** *B. subtilis*, **B-** *P. putida*, **C-** *E. fecalis*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) por gramo de sustrato con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

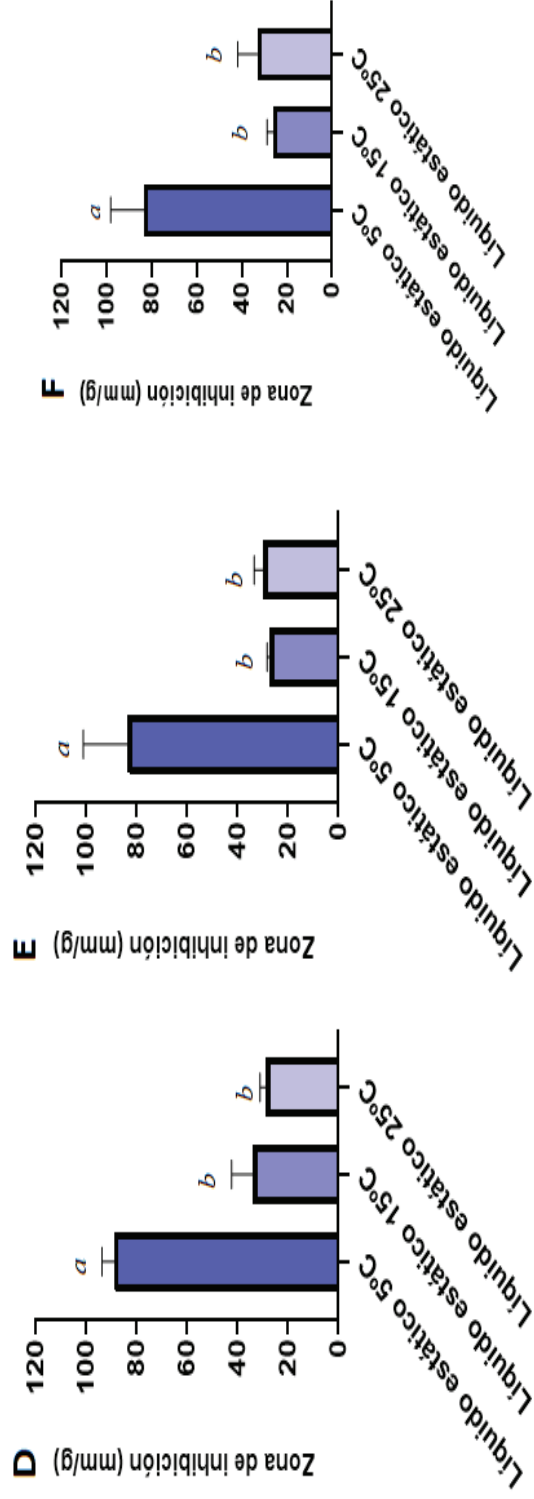


Figura 18 (continuación): Normalización de la actividad antibacteriana presente en los extractos de *C. malorum* (obtenidos de los sistemas líquido estático 5°C, 15°C y 25°C.) contra **D-** *K. pneumoniae*, **E-** *P. mirabilis* y **F-** *E. coli*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) por gramo de sustrato con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

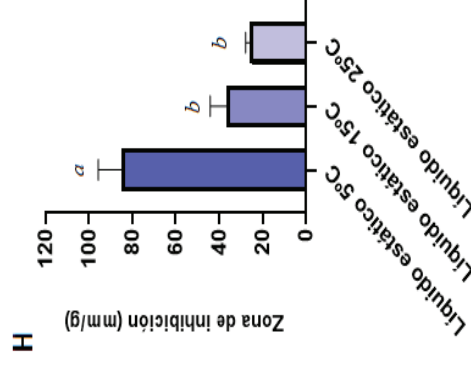
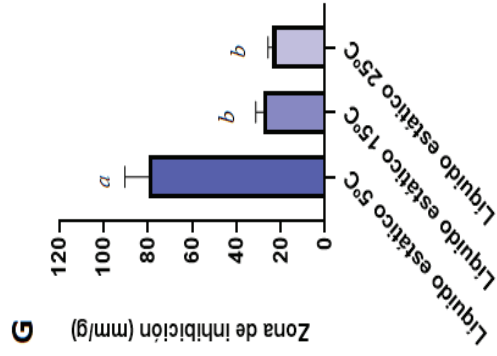


Figura 18 (continuación): Normalización de la actividad antibacteriana presente en los extractos de *C. malorum* (obtenidos de los sistemas líquido estático 5°C, 15°C y 25°C.) contra *G- P. aeruginosa* y **H- S. aureus**. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) por gramo de sustrato con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

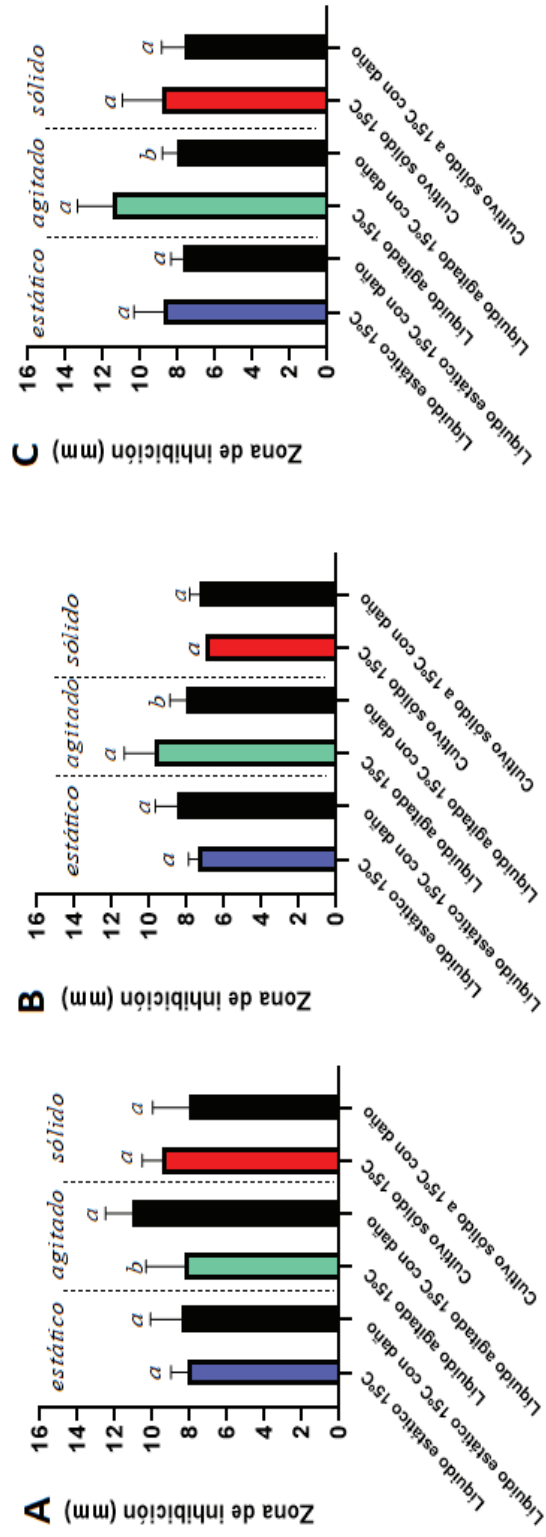


Figura 19: Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* con y sin daño mecánico contra *A-B. subtilis*, *B-P. putida* y *C-E. fecalis*. La estadística comparó la actividad antibacteriana por separado de cada uno de los sistemas (estático, agitado y sólido) tanto con daño como sin daño. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar.

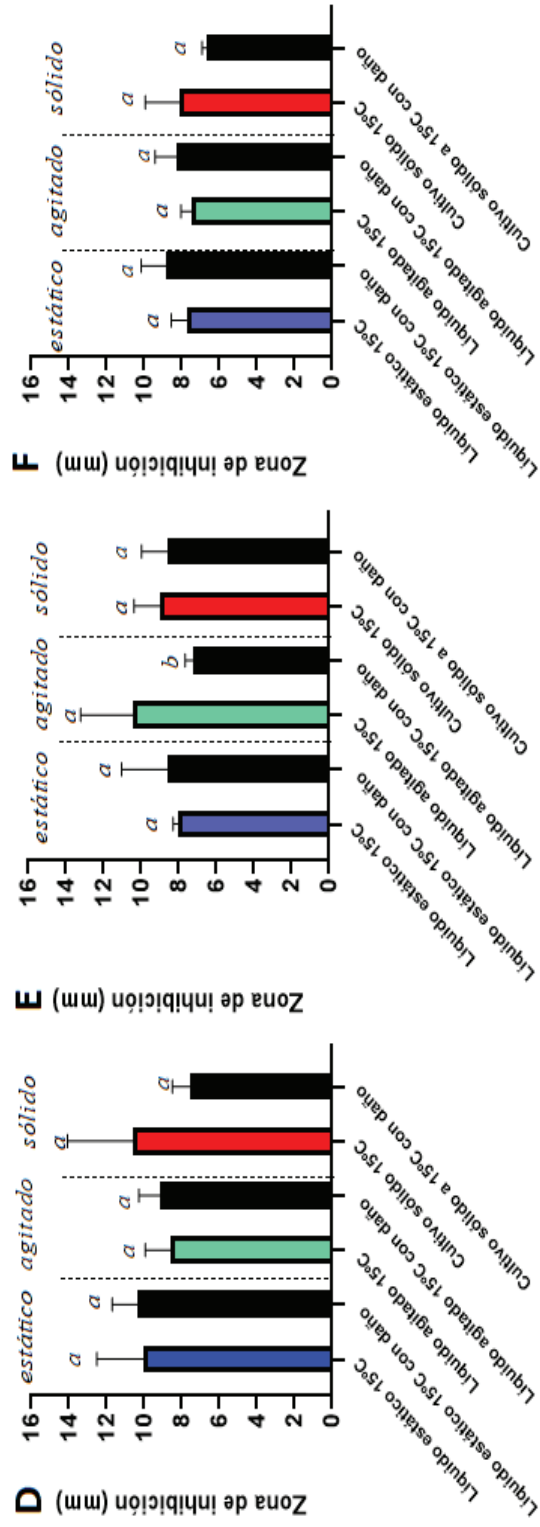


Figura 19 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* con y sin daño mecánico contra *D. K. pneumoniae*, *E. P. mirabilis* y *F. E. coli*. La estadística comparó la actividad antibacteriana por separado de cada uno de los sistemas (estático, agitado y sólido) tanto con daño como sin daño. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar

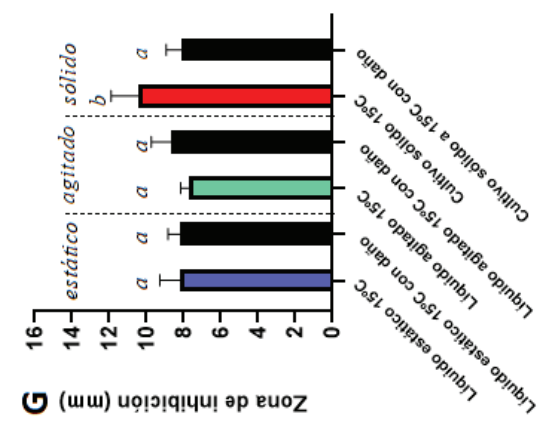
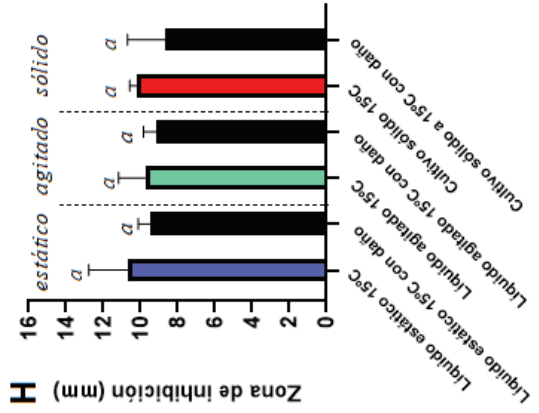


Figura 19 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* con y sin daño mecánico contra *G- P. aeruginosa* y *H- S. aureus*. La estadística comparó la actividad antibacteriana por separado de cada uno de los sistemas (estático, agitado y sólido) tanto con daño como sin daño. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar.

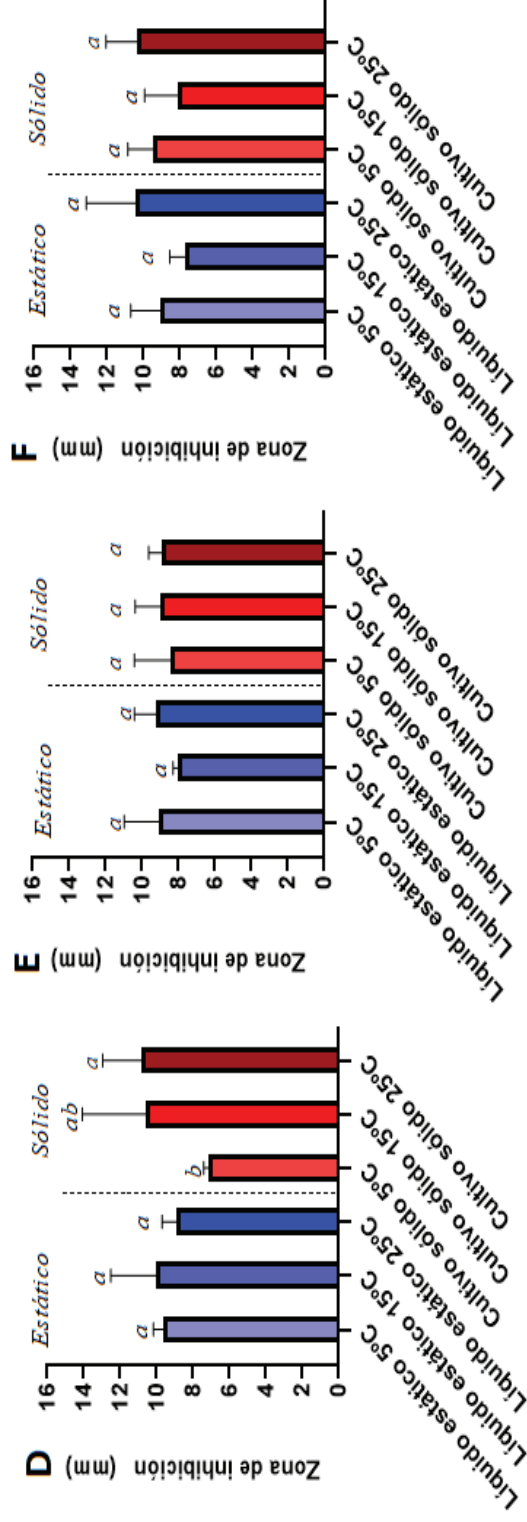


Figura 20: Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* sometidos a diferentes condiciones de temperatura contra *A-B. subtilis*, *B-P. putida* y *C-E. fecalis*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

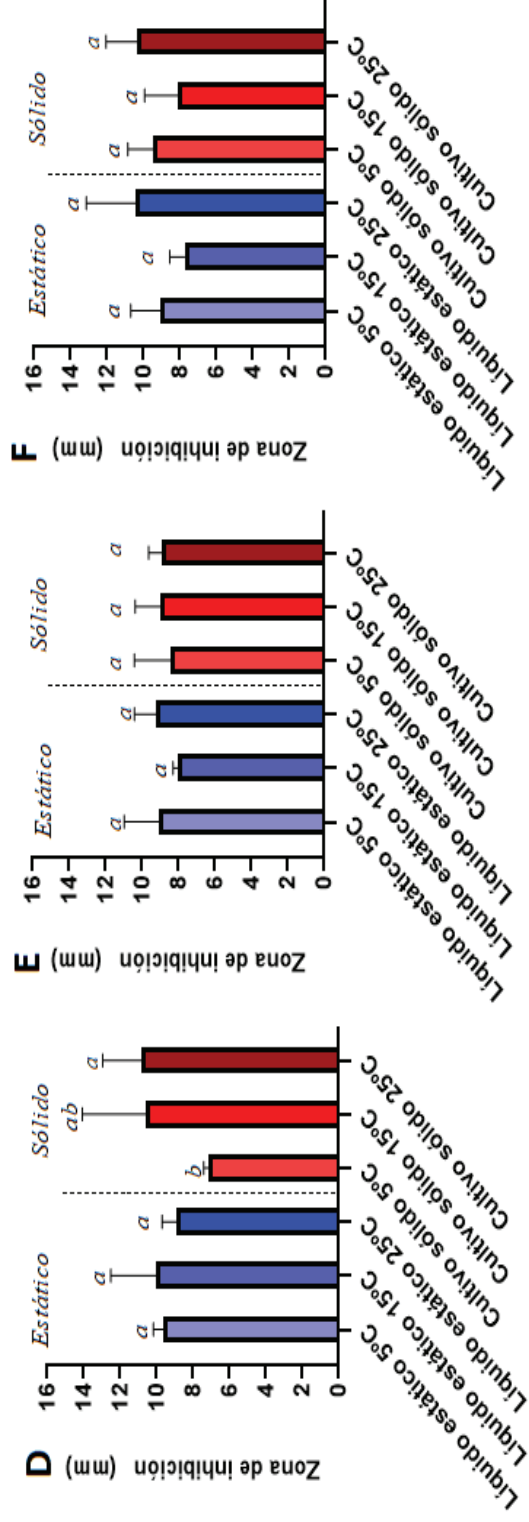


Figura 20 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* sometidos a diferentes condiciones de temperatura contra *D. K. pneumoniae*, *E- P. mirabilis* y *F- E. coli*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

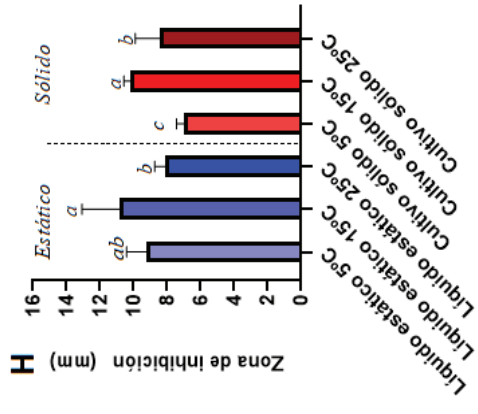
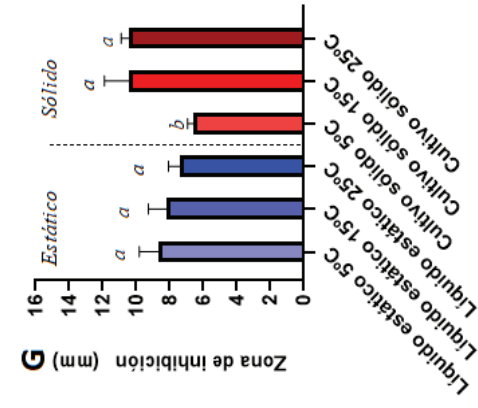


Figura 20 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* sometidos a diferentes condiciones de temperatura contra *G-P. aeruginosa* y *H-S. aureus*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey.

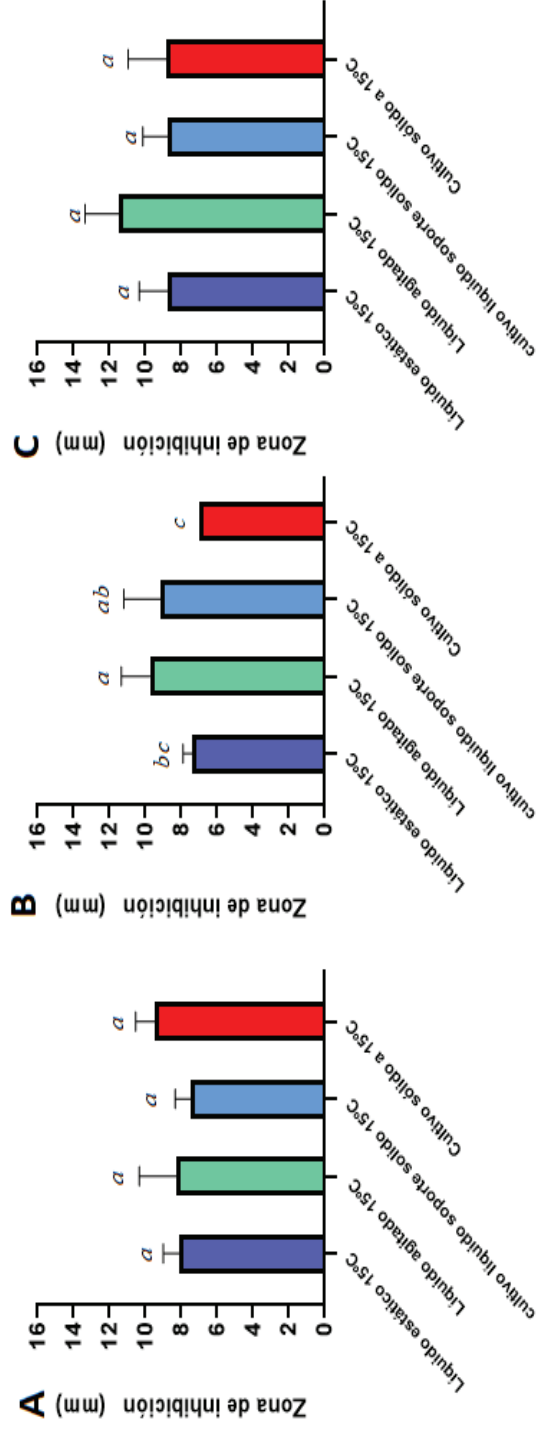


Figura 21: Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* bajo distintas condiciones de cultivo contra *A. B. subtilis*, *B- P. putida* y *C-E. fecalis*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

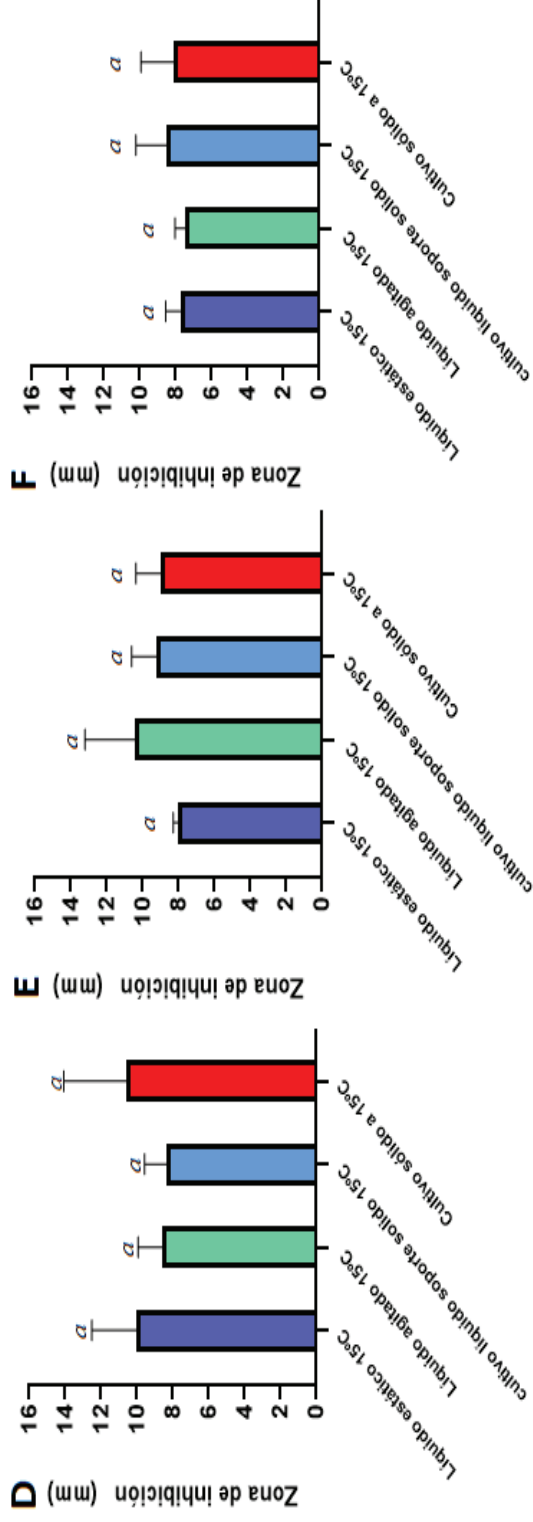


Figura 21 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* bajo distintas condiciones de cultivo contra *D- K. pneumoniae*, *E- P. mirabilis* y *F- E. coli*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

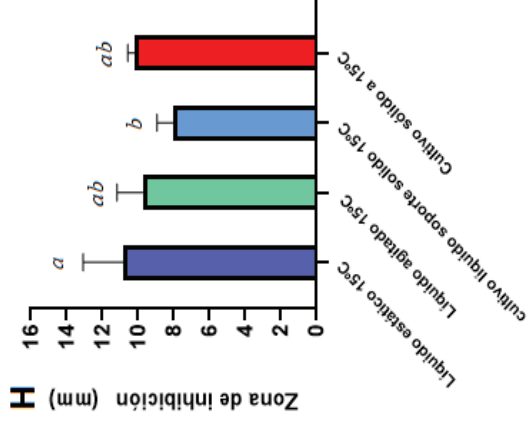
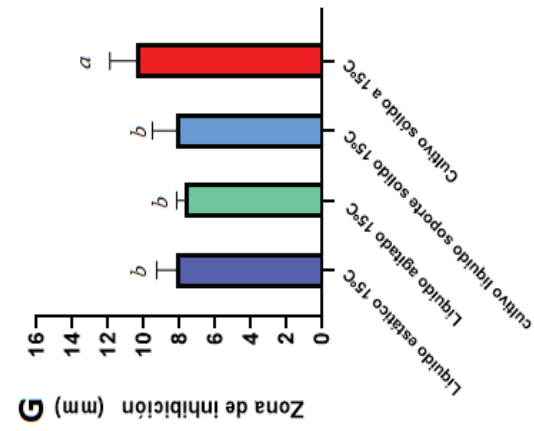


Figura 21 (continuación): Actividad antibacteriana de los extractos de *C. malorum* bajo distintas condiciones de cultivo contra *G- P. aeruginosa* y *H- S. aureus*. Las barras representan el promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) con su correspondiente desvío estándar y las diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0,05$) como resultado de la comparación de medias muestrales de Tukey

5.4: Análisis cromatográfico de los extractos orgánicos de *C. malorum* por HPLC

En los gráficos se observa el cromatograma pico base en donde se grafica la intensidad los picos de iones moleculares con mayor intensidad (BPC), la espectroscopia UV entre 190-900 nm (trazas) y EIC (cromatogramas de iones extraídos).

Se obtuvieron picos simétricos y se asumió que cada uno de ellos representa un componente presente en las muestras analizadas. Los mismos fueron detectados en diferentes tiempos de retención. Esto último fue producto de las interacciones entre el analito, la fase estacionaria y las características de la fase móvil. Los compuestos con mayor afinidad a la fase estacionaron se observaron a mayor tiempo de retención. Los mismos eran de muy baja polaridad y/o apolares.

Los picos iniciales corresponden a compuestos con muy baja afinidad por la fase estacionaria (polares). Se consideró pico base a los picos con mayor intensidad.

Al comparar los cromatogramas de los extractos orgánicos de *C. malorum* obtenidos aplicando diferentes condiciones, se observaron diferencias (Figuras 23 ,24 y 25). En la muestra de cultivo sólido a diferentes temperaturas de incubación (M10, M9 y M11) (Figuras 23 y 24) se destacó aproximadamente a 21 minutos un pico base en los cromatogramas de cultivo sólido a 15°C y 25°C ausente en el de 5°C. En el cultivo sólido a 5°C se destacó el pico base aproximadamente 33 min. En las muestras de líquido estático también se presentó un perfil metabólico diferencial (Figura 23), a 25°C (M8) se observó el pico base a los 16 minutos, en el de 15°C (M1) a los 22 minutos y en el de 5°C (M7) se destacaron dos picos de alta intensidad luego de los 31 minutos de retención. En el líquido agitado a 15°C (M2) se destacó un pico base a los 21 minutos mientras que en el cultivo en soporte inerte a 15°C (M3) se observaron varios picos con intensidad similar a diferente tiempo de retención (Fig. 24). Se compararon los cromatogramas de dos muestras de medio sólido las cuales una de ellas fue sometida a daño mecánico (M6) y la otra no (M10). En la que fue sometida al daño

se observó una disminución en la intensidad de algunos picos. En los dos cronogramas se pudo observar un pico base a los 21 minutos de corrida. El mismo procedimiento se realizó en las muestras de medio líquido estático, en el líquido estático sometido a daño (M4) se detectó en ambos un pico base a los 21 minutos de corrida y se observó algunas variaciones en la intensidad de los picos.

En la figura 22 se observan los picos presentes en cada uno de los cromatogramas analizados, considerando relevantes aquello cuya intensidad fuera mayor o igual al 10%, demostrando la variabilidad en la respuesta metabólica.

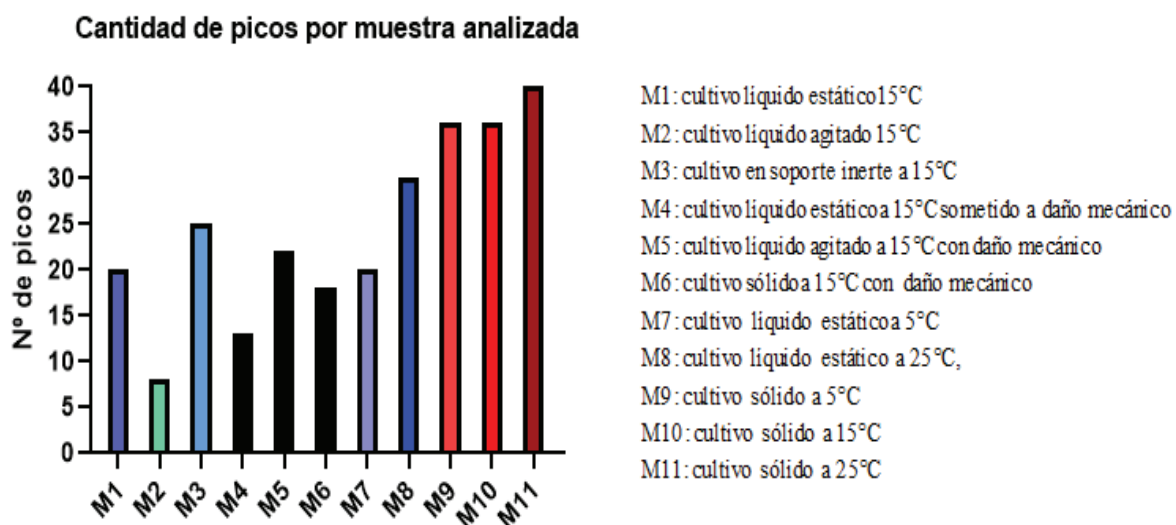


Figura 22: Cantidad de picos de cada cronograma analizado.

En la tabla 6 se observa la abundancia relativa de los compuestos identificados en los diferentes experimentos dicho análisis fue realizado en el departamento de Química Orgánica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires en conjunto con el Instituto Antártico Argentino.

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
wortmannin	100	18.2	13.9	95.1	44.3	78.2	0.7	8.8	0.7	78.2	-
cadophorina A	100	57.7	97.9	231.6	226.9	68.9	2.2	25.4	1.5	55.7	30.8
cadophorina B	100	64.8	87.5	197.5	171.6	107.5	1.2	1.9	0.9	90.8	46.4

Tabla 6: abundancia relativa de los compuestos identificados en las diferentes condiciones probadas.

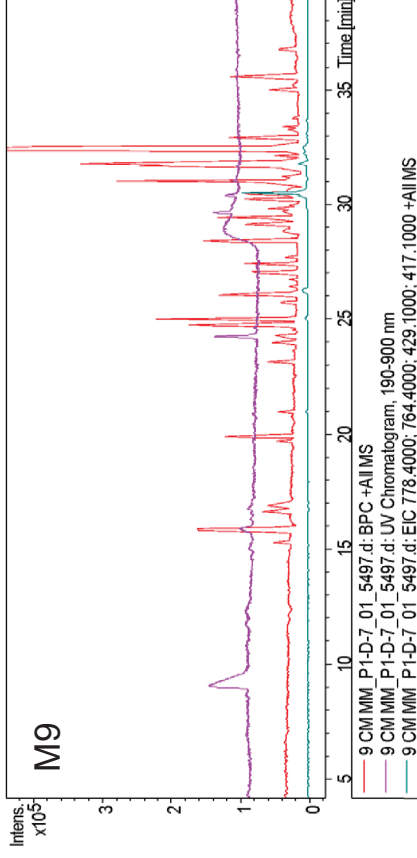
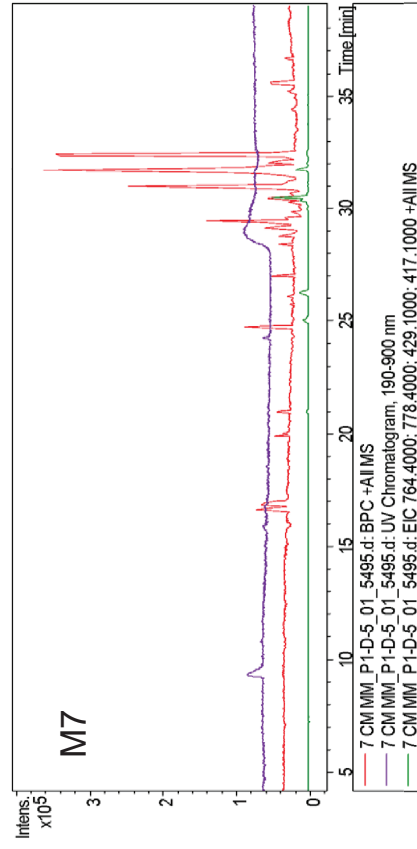
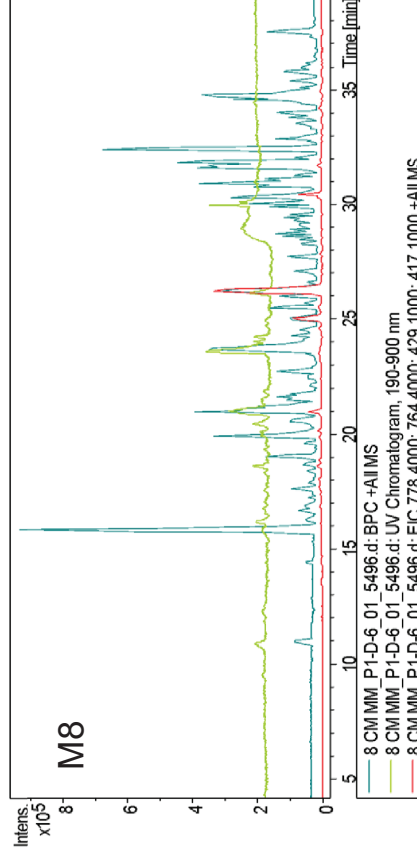
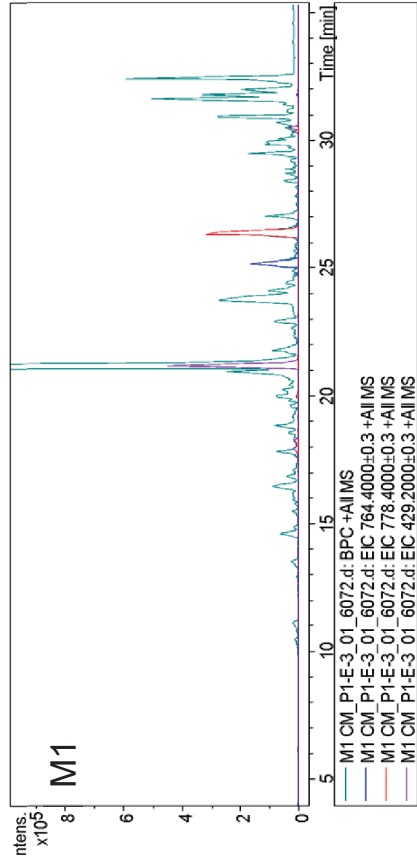


Figura 23: Cromatogramas de los extractos orgánicos de *C. malorum* en diferentes condiciones ambientales. M7: cultivo líquido estático a 5°C, M1: Cultivo líquido estático 15°C, M8: cultivo líquido estático a 25°C y M9: cultivo sólido a 5°C. Los picos a 25 y 26 minutos correspondieron a los cicloheptapeptidos y aproximadamente a los 21 minutos de repetición corresponde a wortmanina.

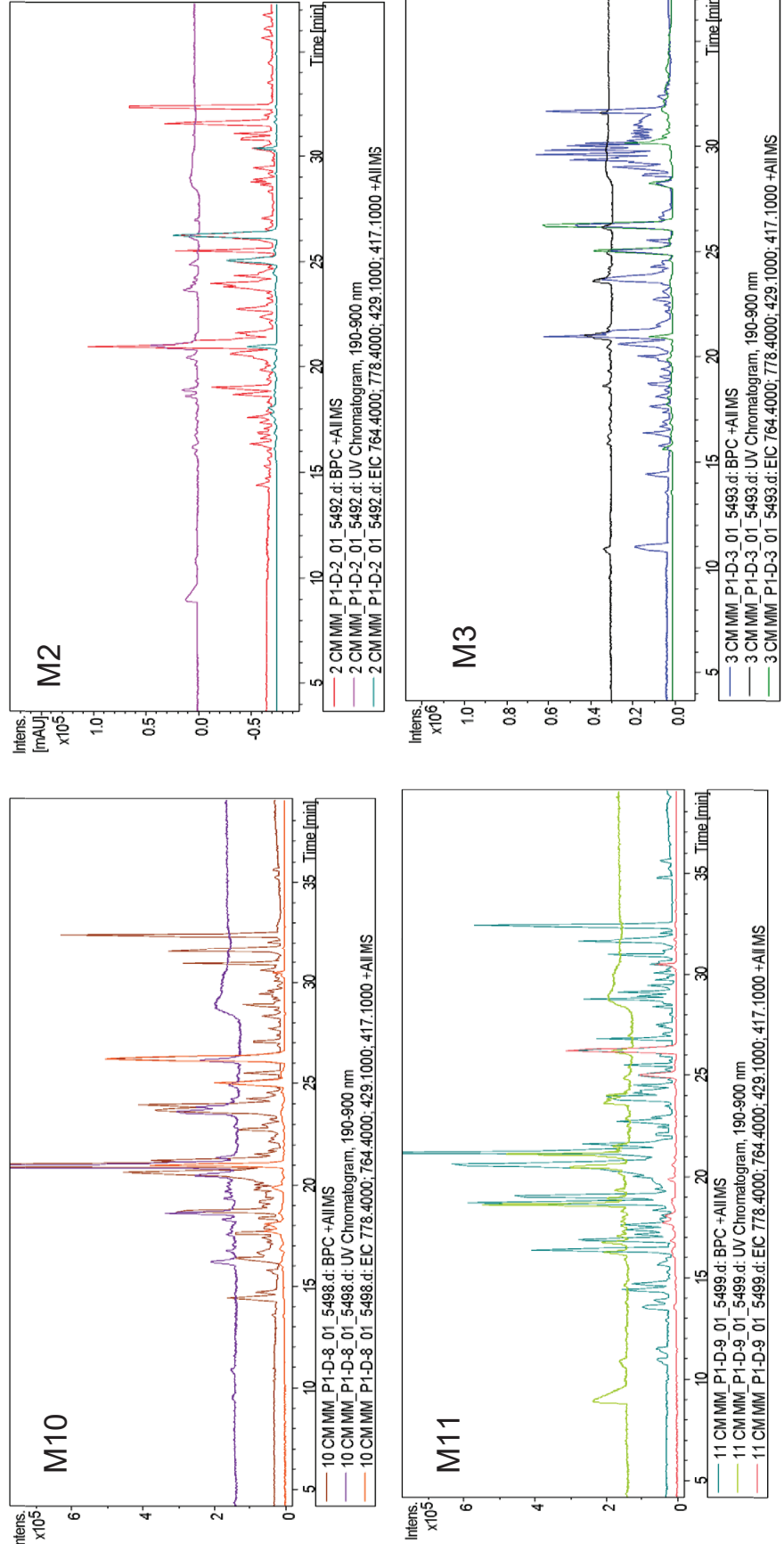


Figura 24: Cromatogramas de los extractos orgánicos de *C. malorum* bajo diferentes condiciones ambientales. M10: cultivo sólido a 15°C, M11: cultivo sólido a 25°C, M3: cultivo en soporte inerte a 15°C y M2: Cultivo líquido agitado 15°C. Los picos a 25 y 26 minutos correspondieron a los cicloheptapeptidos y aproximadamente a los 21 minutos de repetición corresponde a wortmanina.

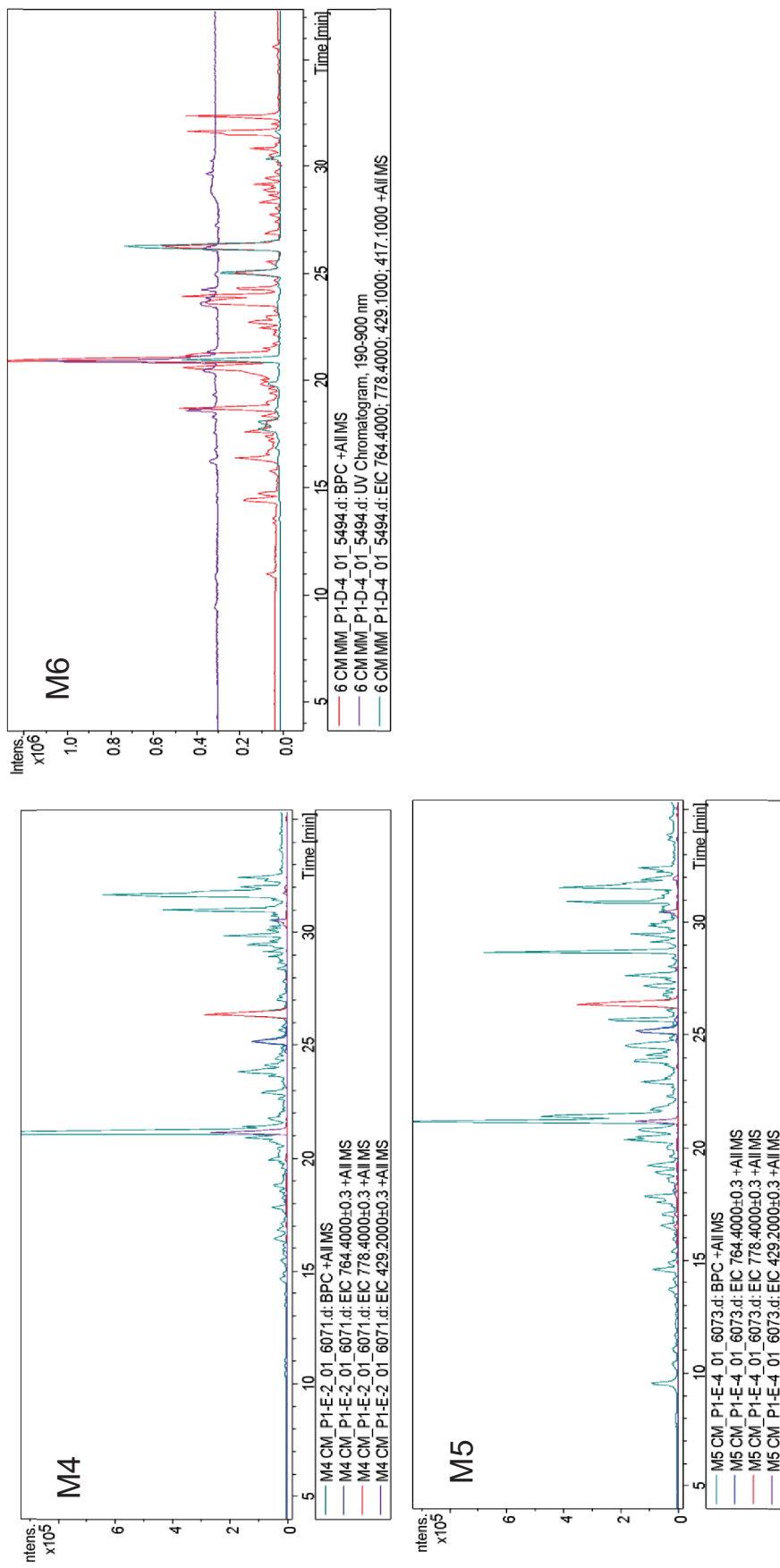


Figura 25: Cromatogramas de los extractos orgánicos de *C. malorum* sometidos a daño mecánico. M4: cultivo líquido sometido a 15°C con daño mecánico, M5: cultivo líquido agitado a 15°C con daño mecánico, M6: cultivo sólido a 15°C con daño mecánico. Los picos a 25 y 26 minutos correspondieron a los cicloheptapétidos y aproximadamente a los 21 minutos de repetición corresponde a wortmanina.

6 DISCUSIÓN

El aislamiento de *C. malorum* mostró perfiles de producción de metabolitos diferenciales al ser sometido a los tipos de estrés propuestos.

En este trabajo se constató la actividad antifúngica y antibacteriana de extractos obtenidos a partir de cultivos de *C. malorum*. Esto se relacionó con otros reportes de bibliografía como se observa en las tablas 1, 2 y 3 donde se detallan otros hongos aislados de la Antártida que presentaron actividad antimicrobiana y antiviral. Ejemplos: *Penicillium nalgiovense* que secreta Anfotericina B (un metabolito secundario antifúngico), *Aspergillus ochraceopetaliformis* que presenta actividad antiviral contra el virus de la influenza H1N1 y H3N2. Esto obedece a dos factores: 1) la presencia de genes en *clusters* encargados de la síntesis de estos metabolitos secundarios y 2) a las condiciones ambientales que inducen la expresión de estos genes. Una presión selectiva para estos microorganismos serían las condiciones ambientales adversas que existen en los ambientes donde fueron aislados que permiten de esta forma expresar metabolitos secundarios de gran interés para la industria farmacéutica hasta ahora poco explorados. Estos genes codifican enzimas capaces de producir una gama amplia de metabolitos bioactivos cuya naturaleza química correspondería a terpenos, alcaloides, policétidos y poliacetilenos con actividad antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiviral y herbicidas (Zucconi y col., 2020). *C. malorum* cumple con los dos ítems citados anteriormente ya que además de ser aislado de la Antártida cuenta con los genes encargados para la biosíntesis de metabolitos secundarios que poseen una gran diversidad estructural y complejidad (Rédou y col., 2016).

De manera cualitativa se observó mayor actividad antifúngica en el sistema líquido estático a 15°C ya que la temperatura y la disponibilidad de agua son factores ambientales que influyen en las funciones fisiológicas de todos los organismos. En estudios previos se observaron variaciones en el perfil metabólico al variar las condiciones de cultivo, por ejemplo al

comparar cromatogramas de una fermentación sólida y otra líquida de los extractos crudos de una cepa de *Aspergillus fumigatus* LN-4 (Zhang y col., 2013).

Se consideró la dificultad de realizar una cuantificación por peso seco en el caso del medio sólido y del líquido en soporte sólido debido a que el micelio queda adherido al sustrato y podría penetrarlo complicando de esta manera la recuperación completa y confiable de la biomasa (Khalil y col.,2021). Por lo anteriormente expresado no se realizó una cuantificación de peso seco en estos casos. De todos modos se realizó el estudio cualitativo de estos sistemas ante la búsqueda de variabilidad en la respuesta de *C. malorum* frente a diferentes entornos y condiciones. Por ejemplo la disponibilidad de fuentes de nutrientes en el sistema sólido se encuentra en mayor concentración en la periferia de las colonias y en cambio en los cultivos sumergidos se encuentran uniformemente distribuidos (Garrigues y col.,2021).

Al realizar la normalización por peso seco únicamente en el sistema estático, se observó mayor actividad antifúngica a 5°C por gramo de biomasa. Los metabolitos secundarios a diferencia de los metabolitos primarios no son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce (Yogabaanu y col., 2017) y se caracterizan por una cinética en particular, es decir, aumentan al desacelerar la producción de biomasa (Vrabl y col.,2019). A los 5°C se observó actividad antifúngica pese a la escasa formación de biomasa demostrando que estos metabolitos se sintetizan independientes de la fase de crecimiento. Esta condición puede constituir una opción adecuada para la producción a escala de estos metabolitos.

Los extractos orgánicos de *C. malorum* presentaron actividad antibacteriana de diferente magnitud frente a las cepas evaluadas. La mayor actividad antibacteriana expresada por gramo de sustrato se presentó en el líquido estático a 5°C. Se realizó un análisis cualitativo de la actividad antibacteriana bajo distintas condiciones. En *B. subtilis* ATCC 6633 se observó una diferencia significativa de la actividad antibacteriana del extracto agitado a 15°C con

daño mecánico al micelio *vs* sin daño. Dicha actividad aumentó al someter el extracto a daño mecánico.

Al variar las condiciones de cultivo se observó diferencia significativa en *S. aureus* ATCC 6538, *P. putida* ATCC 17484 y *P. aeruginosa* ATCC 9027. En *S. aureus* ATCC 6538 se destacó la actividad antibacteriana del extracto estático a 15°C, en *P. putida* ATCC 17484 el agitado a 15°C y en *P. aeruginosa* ATCC 9027 el sólido a 15°C

La prueba de sensibilidad de los extractos de *C. malorum* frente a diferentes bacterias de importancia clínica resultó efectiva. La actividad antibacteriana mostrada por los extractos fue menor que la observada en el control positivo excepto frente a *K. pneumoniae*, donde sí se observó inhibición significativa del crecimiento. El taxón con mayor frecuencia de cepas resistentes a las cefalosporinas de 3° generación son las *K. pneumoniae*. El tratamiento para ese tipo de cepas son los carbapenémicos. Se caracterizan por ser antibacterianos caros y también pueden acelerar aún más el desarrollo de resistencias. Esta bacteria causa infecciones en heridas hospitalarias, gastrointestinales y causa brotes de infecciones nosocomiales. La resistencia a medicamentos es hasta el 70% y la tasa de mortalidad del 40%-70%. Representa un problema de gravedad mundial por ello este hallazgo es sumamente interesante a nivel tanto clínico como epidemiológico (Organización Mundial de la Salud, 2014; Patilaya y col., 2019)

En estos últimos años se han realizaron investigaciones *in vitro* donde se destacó el comportamiento antifúngico de *C. malorum* frente a otros hongos y la generación de dos metabolitos novedosos de los cuales se conoce su estructura (Donalle y col., 2022). Su actividad antifúngica se cree que depende de estos dos cicloheptapéptidos (cadophorina A y B). Con los cromatogramas se realizó un análisis cualitativo y se identificó la presencia de 3 metabolitos secundarios (cadophorina A, B y wortmanina). Los mismos se identificaron por el tiempo de retención de los picos.

Los picos a 25 y 26 minutos correspondieron a los cicloheptapeptidos. Se observó en la mayoría de los cultivos incubados a 15°C un pico base o de alta intensidad, aproximadamente a los 21 minutos de retención y que se corresponde con wortmanina, un antifúngico presente en otro tipo de hongos filamentosos (Brian y col., 1957).

La wortmanina se identificó como un metabolito fúngico permeable a las células e inhibe de manera selectiva e irreversible (IC 50 = 4,2 nM) a la fosfatidilinositol 3-quinasa. A raíz de esto se está tratando de utilizar contra el cáncer y es además un compuesto antifúngico que puede actuar por ejemplo contra *C. albicans* entre otros (Singh y col., 2015).

En la tabla 6 se observó la abundancia relativa y en el caso de wortmanina la condición que presentó mayor abundancia relativa fue en el líquido estático a 15°C. Mientras que cadophorina A presentó mayor abundancia en M4, cadophorina B en M6. Los dos ciclopeptidos presentaron una buena performance en M5 y M1. Dependiendo del metabolito de interés se podría trabajar en una u otra condición para obtener un mejor rendimiento.

Cuando se realizó el análisis cromatográfico de los diferentes sistemas de cultivos se observó una mayor diversidad de picos a 25°C tanto en el cultivo líquido estático como en el sólido al compararlo al cromatograma de 15°C. Cabe destacar que la temperatura de incubación de 25°C se consideró un estrés para *C. malorum* si bien la biomasa no presentó diferencia significativa frente al sistema estático a 15°C

La mayor diversidad de picos en el cromatograma se observó en las condiciones ambientales en las cuales no se presentó una marcada actividad antifúngica pero si se produjo estrés a *C. malorum*. Al analizar los cromatogramas obtenidos de las muestras sometidas a daño mecánico se observó cambios en los perfiles de HPLC-MS y se demostró alteraciones en la respuesta fisiológica ante el estrés mecánico. Este cambio se produjo al activarse una defensa química ante heridas o cortes en el micelio que producen síntesis *de novo* y/o aumentan la expresión de metabolitos con actividad antibacteriana, antifúngica y toxinas (Hernández y

col., 2019). Pese a lo observado anteriormente en la mayoría de los casos este estrés no aumentó la actividad antifúngica.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo surge la necesidad de profundizar varias líneas de investigación que se desprenden de los resultados obtenidos.

7 CONCLUSIONES

- ✳ En el caso de los cultivos agarizados se optimizó la extracción evaluando diferentes estrategias (extracción acuosa, liofilización y extracción directa) y se llegó a la conclusión que el método más eficiente fue por extracción directa.
- ✳ Los extractos orgánicos presentaron actividad antifúngica marcada contra *C. albicans*, *A. fumigatus* y *A. lentulus*. La condición ambiental en la cual se presentó mayor actividad fue en el líquido estático a 5°C por gramo de biomasa y el líquido estático a 15°C mayor actividad antifúngica de manera cualitativa.
- ✳ No se observó actividad antifúngica de los extractos de *C. malorum* frente a *Rhizopus* sp.
- ✳ Se observó actividad antimicrobiana contra todas las cepas bacterianas evaluadas. La mayor actividad antibacteriana se presentó en el líquido estático a 5°C por gramo de biomasa. Se realizó un análisis cualitativo de la actividad antibacteriana donde no se observó una variación significativa excepto en *S.aureus* ATCC 6538, *P. putida* ATCC 17484 y *P. aeruginosa* ATCC 9027. En *S. aureus* ATCC 6538 se destacó la actividad antibacteriana del extracto estático a 15°C , en *P. putida* ATCC 17484 el agitado a 15°C y en *P. aeruginosa* ATCC 9027 el sólido a 15°C.
- ✳ Se observó actividad antibacteriana frente a *K. pneumoniae* resistente a ampicilina.
- ✳ Se confirmó por HPLC que al variar las condiciones ambientales se produce un impacto en los procesos metabólicos de *C. malorum* y esto generó una respuesta fisiológica diferente, reflejado por diferente variedad e intensidad de picos en los cromatogramas.
- ✳ El aumento de la resistencia antimicrobiana y la urgente necesidad de encontrar nuevas estrategias para enfrentarlo hacen que estos resultados cobren relevancia y así abran caminos a nuevas líneas de investigación que sirvan para combatir esta grave problemática.
- ✳ Estos resultados revelaron la importancia de explorar el metabolismo fúngico.

8 PERSPECTIVAS A FUTURO

- ✧ La línea de investigación continuará utilizando a *Cadophora malorum* como organismo de estudio
- ✧ Se lo someterá a un estrés biológico mediante co-cultivo
- ✧ Se realizarán cultivos con modificadores epigenéticos
- ✧ El procedimiento presentado se aplicará para continuar explorando la diversidad metabólica de otros hongos antárticos.
- ✧ La wortmanina que se encontró presente en los extracto de *C.malorum* debería en futuras líneas de investigación ser purificado seleccionado las fracciones cuyo tiempo de elución corresponde a la presencia de este metabolito fúngico y determinar la estructura por espectrometría de masa para obtener el gráfico de abundancia relativa porcentual vs m/z (masa/carga), representado cada barra un ion con su relación m/z específica. Esta técnica analítica permitiría determinar la estructura química de este molécula orgánica observando su patrón de fragmentación y esto se podría complementar con una resonancia magnética nuclear además de espectroscopia IR (determina la presencia de grupos funcionales) y considerando que es un compuesto relacionado al estrógeno. Al obtener la estructura de este compuesto se podría comparar con el depositada en la base de datos de compuestos PubChem bajo CID: 312145 y pudiendo demostrar si hay o no diferencias estructurales sutiles en este metabolito ya encontrado en otros hongos.

9 BIBLIOGRAFÍA

Adpressa, D. A., y Loesgen, S. (2016). Bioprospecting chemical diversity and bioactivity in a marine derived *Aspergillus terreus*. *Chemistry y biodiversity*, 13(2), 253-259.

Atriztán-Hernández, K., Moreno-Pedraza, A., Winkler, R., Markow, T., y Herrera-Estrella, A. (2019). Trichoderma atroviride from predator to prey: role of the mitogen-activated protein kinase Tmk3 in fungal chemical defense against fungivory by Drosophila melanogaster larvae. *Applied and environmental microbiology*, 85(2), e01825-18.

Ávalos Cordero, F. J., y Limón Mirón, M. D. C. (2021). Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*, 2 (1), 1-13.

Azaiez, A., Beaudoin Nadeau, M., Bertrand, A., y Khasa, D. P. (2018). In vitro selection of ecologically adapted ectomycorrhizal fungi through production of fungal biomass and metabolites for use in reclamation of biotite mine tailings. *Mycologia*, 110(6), 1017-1032.

Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., ... y Samson, R. A. (2018). *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in mycology*, 89, 177-301.

Berthelot, C., Leyval, C., Chalot, M., y Blaudez, D. (2019). Interactions between dark septate endophytes, ectomycorrhizal fungi and root pathogens in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 366(13), fnz158.

Bills, G. F., y Gloer, J. B. (2016). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6

Blumhoff, M., Steiger, M. G., Marx, H., Mattanovich, D., y Sauer, M. (2013). Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(1), 259-267.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., y Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7), 619-627..

Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21-32

Brian, P. W., Curtis, P. J., Hemming, H. G., y Norris, G. L. F. (1957). Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Transactions of the British Mycological Society*, 40(3), 365-IN3.

Chakraborty, S., Mohsina, K., Sarker, P. K., Alam, M. Z., Karim, M. I. A., y Sayem, S. A. (2016). Prevalence, antibiotic susceptibility profiles and ESBL production in *Klebsiella*

- pneumoniae and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Periodicum biologorum*, 118(1).
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Burgess, T. I., Carnegie, A. J., Hardy, G. S. J., Smith, D., ... y Groenewald, J. Z. (2017). Fungal Planet description sheets: 625–715. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39, 270.
- Day, M. J., Hall, J. C., y Currah, R. S. (2012). Phialide arrangement and character evolution in the helotialean anamorph genera *Cadophora* and *Phialocephala*. *Mycologia*, 104(2), 371-381.
- De Pascale, D., De Santi, C., Fu, J., & Landfald, B. (2012). The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Marine Genomics*, 8, 15-22
- Donalle, G. C., Martorell, M. M., Siless, G. E., Ruberto, L., y Cabrera, G. M. (2022). Cyclic heptapeptides with metal binding properties isolated from the fungus *Cadophora malorum* from Antarctic soil. *Natural Products and Bioprospecting*, 12(1), 1-10.
- Ebrahim, W., El-Neketi, M., Lewald, L. I., Orfali, R. S., Lin, W., Rehberg, N., ... y Proksch, P. (2016). Metabolites from the fungal endophyte *Aspergillus austroafricanus* in axenic culture and in fungal–bacterial mixed cultures. *Journal of Natural Products*, 79(4), 914-922.
- Fuchser, J., Thiericke, R., y Zeeck, A. (1995). Biosynthesis of aspinonene, a branched pentaketide produced by *Aspergillus ochraceus*, related to aspyrone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (13), 1663-1666
- Garcia-Vidal, C., y Carratalà, J. (2012). Pathogenesis of invasive fungal infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30(3), 151-158
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., ... y López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209(4), 1496-1512
- Garrigues, S., Kun, R. S., Peng, M., Gruben, B. S., Benoit Gelber, I., Mäkelä, M., y de Vries, R. P. (2021). The cultivation method affects the transcriptomic response of *Aspergillus niger* to growth on sugar beet pulp. *Microbiology spectrum*, 9(1), e01064-21.
- Gonçalves, V. N., Vaz, A. B., Rosa, C. A., y Rosa, L. H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS microbiology ecology*, 82(2), 459-471
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R. D., Bovenberg, R. A., y Driessen, A. J. (2018). Engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* as cell factory for natural products. *Frontiers in microbiology*, 9, 2768.

Harrington, T. C., y McNew, D. L. (2003). Phylogenetic analysis places the Phialophora-like anamorph genus Cadophora in the Helotiales. *Mycotaxon*, 87(141), e151.

Hernández-Oñate, M. A., y Herrera-Estrella, A. (2015). Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi. *Current genetics*, 61(3), 359-372.

Hertweck, C. (2009). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nature chemical biology*, 5(7), 450-452.

Hsien-Chun, L., Ruth, E., Chun-Jun, G., Manmeet, A., Edyta, S., Jui-Hsiang, H., ... y CC, W. C. (2012). Two Separate Gene Clusters Encode the Biosynthetic Pathway for the Meroterpenoids Austinol and Dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*.

Ibrahim, D., Welosamy, H., y Lim, S. H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 265.

Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes—are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza*, 11(4), 207-211.

Kehr, J. C., Picchi, D. G., y Dittmann, E. (2011). Natural product biosyntheses in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. *Beilstein journal of organic chemistry*, 7(1), 1622-1635.

Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167-180

Khalil, H., Legin, E., Kurek, B., Perre, P., y Taidi, B. (2021). Morphological growth pattern of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on different *Miscanthus x giganteus* biomass fractions. *BMC microbiology*, 21(1), 1-18.

Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., y Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13172-13177.

Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., ... y Vilgalys, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*, 91(10), 1446-1480

Maciá-Vicente, J. G., Piepenbring, M., y Koukol, O. (2020). Brassicaceous roots as an unexpected diversity hot-spot of helotialean endophytes. *IMA fungus*, 11(1), 1-23.

Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., y Proksch, P. (2014). Co-cultivation—A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine drugs*, 12(2), 1043-1065.

- Martín, J. F., Ullán, R. V., & García-Estrada, C. (2010). Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbial biotechnology*, 3(3), 285-299.
- McColloch, L. P. (1944). A study of the apple rot fungus *Phialophora malorum*. *Mycologia*, 36(6), 576-590.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... y Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655
- Nassar, M. S., Hazzah, W. A., y Bakr, W. M. (2019). Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be?. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 94(1), 1-5.
- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., y Wang, H. (2019). Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 294.
- Patilaya, P., Husori, D. I., & Marhafanny, L. (2019). Susceptibility of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Pus Specimens of Post-Surgery Patients in Medan, Indonesia to Selected Antibiotics. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Nov 30; 7 (22): 3861-3864
- Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nature reviews Drug discovery*, 16(9), 603-616
- Petersen, L. E., Marner, M., Labes, A., y Tasdemir, D. (2019). Rapid metabolome and bioactivity profiling of fungi associated with the leaf and rhizosphere of the Baltic seagrass *Zostera marina*. *Marine drugs*, 17(7), 419.
- Pfannenstiel, B. T., y Keller, N. P. (2019). On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. *Biotechnology advances*, 37(6), 107345
- Rantasalo, A., Landowski, C. P., Kuivanen, J., Korppoo, A., Reuter, L., Koivistoinen, O., ... y Mojzita, D. (2018). A universal gene expression system for fungi. *Nucleic acids research*, 46(18), e111-e111.
- Rédou, V., Kumar, A., Hainaut, M., Henrissat, B., Record, E., Barbier, G., y Burgaud, G. (2016). Draft genome sequence of the deep-sea *ascomycetous* filamentous fungus *Cadophora malorum* Mo12 from the Mid-Atlantic Ridge reveals its biotechnological potential. *Genome announcements*, 4(4), e00467-16.
- Rokas, A., Mead, M. E., Steenwyk, J. L., Raja, H. A., y Oberlies, N. H. (2020). Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Natural product reports*, 37(7), 868-878.

- Sanitá Lima, M., & Coutinho de Lucas, R. (2022). Co-cultivation, co-culture, mixed culture, and microbial consortium of fungi: an understudied strategy for biomass conversion. *Frontiers in Microbiology*, 12, 837685
- Shi, R., Luo, Q., Liu, Y., Meng, G., Chen, W., y Wang, C. (2022). Effect of γ -butyrolactone, a quorum sensing molecule, on morphology and secondary metabolism in *Monascus*. *LWT*, 172, 114225.
- Shi, T., Yu, Y. Y., Dai, J. J., Zhang, Y. T., Hu, W. P., Zheng, L., y Shi, D. Y. (2021). New polyketides from the Antarctic fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. *Marine drugs*, 19(3), 168.
- Singh, V., Praveen, V., Tripathi, D., Haque, S., Somvanshi, P., Katti, S. B., y Tripathi, C. K. M. (2015). Isolation, characterization and antifungal docking studies of wortmannin isolated from *Penicillium radicum*. *Scientific reports*, 5(1), 11948.
- Singla, S., Htut, K. Z., Zhu, R., Davis, A., Ma, J., Ni, Q. Z., ... y Dhinojwala, A. (2021). Isolation and Characterization of Allomelanin from Pathogenic Black Knot Fungus— a Sustainable Source of Melanin. *ACS omega*, 6(51), 35514-35522.
- Soukup, A. A., Keller, N. P., y Wiemann, P. (2016). Enhancing nonribosomal peptide biosynthesis in filamentous fungi. *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis: Methods and Protocols*, 149-160.
- Travadon, R., Lawrence, D. P., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E., y Baumgartner, K. (2015). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal biology*, 119(1), 53-66.
- Vrabl, P., Schinagl, C. W., Artmann, D. J., Heiss, B., y Burgstaller, W. (2019). Fungal growth in batch culture—what we could benefit if we start looking closer. *Frontiers in microbiology*, 10, 2391.
- Wang, B., Guo, G., Wang, C., Lin, Y., Wang, X., Zhao, M., ... y Pan, L. (2010). Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. *Nucleic acids research*, 38(15), 5075-5087
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.
- World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance. report on World Health Organization.
- Yan, Q., Lopes, L. D., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Vining, O., Philmus, B., ... y Loper, J. E. (2018). Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in *Pseudomonas protegens*. *MBio*, 9(1), e01845-17

- Yogabaanu, U., Weber, J. F. F., Convey, P., Rizman-Idid, M., y Alias, S. A. (2017). Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. *Polar Science*, 14, 60-67.
- Zhang, B., Li, X., Li, G., Wang, Q. M., y Wang, M. (2022). Cadophora species from marine glaciers in the Qinghai-Tibet Plateau: an example of unsuspected hidden biodiversity. *IMA fungus*, 13(1), 1-29.
- Zhang, Q., Wang, S. Q., Tang, H. Y., Li, X. J., Zhang, L., Xiao, J., ... y Gao, J. M. (2013). Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(47), 11447-11452.
- Zhu, M., Ding, Y., Li, X., Xiao, Y., Zhao, Z., y Li, T. (2021). Biodiversity of Root Endophytic Fungi from *Oxyria sinensis* Grown in Metal-Polluted and Unpolluted Soils in Yunnan Province, Southwestern China. *Plants*, 10(12), 2731.
- Zucconi, L., Canini, F., Temporiti, M. E., y Tosi, S. (2020). Extracellular enzymes and bioactive compounds from Antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 6459.

Versión final con las modificaciones sugeridas por el jurado correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Griselda'.

Clara Griselda Fascetto Cassero

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Martorell'.

Dra. Ma. Martha Martorell (directora)