



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminas inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos destructores de madera



M. del Carmen Orozco-Mosqueda^a, Eduardo Valencia-Cantero^a,
Pablo López-Albarrán^b, Mauro Martínez-Pacheco^a y Crisanto Velázquez-Becerra^{b,*}

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

^b Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

Recibido el 8 de setiembre de 2014; aceptado el 16 de junio de 2015

Disponible en Internet el 6 de setiembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Arthrobacter agilis
UMCV2;
Dimetilhexadecilamina;
Hongos destructores
de la madera

Resumen El reino *Fungi* está representado por innumerable cantidad de organismos entre los cuales se encuentran hongos patógenos que deterioran los principales componentes estructurales de la madera, como celulosa, hemicelulosa y lignina. El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar la actividad antifúngica y la producción de diversas aminas de *Arthrobacter agilis* UMCV2 con acción antagonica sobre hongos xilófagos. Para ello, se aislaron 4 organismos fúngicos (designados en conjunto UMTM) a partir de madera en descomposición en un bosque de pino encino de la comunidad de Cuanajo, Michoacán, México. Dos de ellos presentaron una clara actividad enzimática de celulasas, xilanasas y enzimas accesorias óxido-reductoras, y fueron identificados como pertenecientes a 2 géneros agresivos para la madera: *Hypocrea* (aislado UMTM3) y *Fusarium* (aislado UMTM13). *In vitro*, las aminas evaluadas mostraron tener efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los UMTM y la dimetilhexadecilamina; uno de estos compuestos mostró un fuerte potencial para ser utilizado como tratamiento preventivo contra el ataque de hongos destructores de madera.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Arthrobacter agilis
UMCV2;
Dimethylhexadecylamine;
Wood-decay fungi

Bacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 and diverse amines inhibit *in vitro* growth of wood-decay fungi

Abstract The kingdom *Fungi* is represented by a large number of organisms, including pathogens that deteriorate the main structural components of wood, such as cellulose, hemicellulose and lignin. The aim of our work was to characterize the antifungal activity in *Arthrobacter*

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cvelazquez@umich.mx (C. Velázquez-Becerra).

agilis UMCV2 and diverse amines against wood-decaying fungi. Four fungal organisms (designated as UMTM) were isolated from decaying wood samples obtained from a forest in Cuanajo-Michoacán, México. Two of them showed a clear enzymatic activity of cellulases, xylanases and oxido-reducing enzymes and were identified as *Hypocrea* (UMTM3 isolate) and *Fusarium* (UMTM13 isolate). *In vitro*, the amines showed inhibitory effect against UMTM growth and one of the amines, dimethylhexadecylamine (DMA16), exhibited strong potential as wood preventive treatment, against the attack of decaying fungi.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El reino *Fungi* está representado por un diverso grupo de organismos que abarca entre 1,5 y 5 millones de especies, entre las que se encuentran los hongos filamentosos patógenos de plantas¹⁴. Los hongos se han adaptado a diversos nichos ecológicos que les han permitido prosperar en casi todos los hábitats del planeta. Una gran cantidad son saprofitos, lo cual facilita la descomposición de la materia orgánica y permite el reciclaje de nutrientes esenciales para el desarrollo y el crecimiento de otros los organismos vivos¹. La descomposición posibilita la incorporación de un alto porcentaje de materia orgánica al suelo y suministra fuentes de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, hierro y fósforo que son aprovechables por las plantas. Esto ocurre como resultado del metabolismo microbiano sobre hidratos de carbono, grasas, aceites, lignina y proteínas, entre otros^{28,29}.

Por su capacidad para descomponer las paredes celulares lignificadas mediante sistemas tanto enzimáticos como no enzimáticos²¹, los hongos destructores de la madera, también llamados xilófagos, presentan características especiales. Por un lado, los xilófagos desempeñan un papel positivo como los principales descomponedores bióticos de la madera y sus remanentes, pero por otro, en entornos urbanos, representan un grave riesgo al afectar la integridad estructural de construcciones de madera, en forma análoga a las raíces y troncos de árboles en pie. La pérdida de resistencia mecánica de la madera causada por estos organismos está intrínsecamente ligada a situaciones peligrosas, ya que a menudo ocasionan un daño significativo tanto a las construcciones como a las personas^{18,21}.

La madera está compuesta principalmente por 3 grupos de macromoléculas: celulosa, poliosas (hemicelulosas) y lignina. Algunos organismos fúngicos tienen la capacidad de degradar estas macromoléculas que conforman la pared celular en plantas; a consecuencia de esto, se alteran las propiedades fisicoquímicas de la madera^{19,26,27}. Entre esos organismos se pueden mencionar Agaricomycetes causantes de la pudrición marrón (*Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Antrrodia vaillantii*, *Lentinus lepideus*, etc.), Basidiomycetes causantes de la pudrición blanca (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Schizophyllum commune*, etc.), Ascomycetes causantes de la pudrición suave (*Chaetomium globosum*, *Monodictys putredinis*, etc.) y Sordariomycetes (*Hypocrea muroiana*, *Cryphonectria parasitica* y *Fusarium oxysporum*), con más de 600 géneros y 3000 especies conocidas^{17,24}. Estos organismos fúngicos

logran la despolimerización de macromoléculas a partir de la producción de diversas enzimas hidrolíticas, por ejemplo, la degradación de la celulosa cristalina se consigue con endo-1,4-β-glucanasas, exo-1,4-β-glucanasas y 1,4-β-glucosidasas²⁷. En cambio, la lignina presenta una mayor resistencia a la degradación por organismos xilófagos y confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra un posible ataque biológico enzimático.

La lignina es un polímero complejo tridimensional, formado por la unión de ácidos y alcoholes fenilpropílicos. Para la degradación de la lignina, los organismos utilizan un complejo enzimático de oxidasas y peroxidasas que catalizan las primeras reacciones y rompen las uniones dentro de la molécula. La vía metabólica utilizada por los hongos xilófagos se inicia con la acción de la enzima lignina peroxidasa, la cual rompe enlaces carbono-carbono o enlaces éter. Otra enzima de amplia distribución entre los hongos de pudrición blanca es la lacasa, una oxidasa constituida por un cofactor con 4 átomos de cobre, cuyo aceptor de electrones es el O₂. La lacasa ataca principalmente los sustratos fenólicos en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ácido violúrico, que actúan como cooxidantes, y la habilitan para atacar los sustratos más difícilmente oxidables, como los de tipo no fenólico²³.

Entre las estrategias actuales para controlar el daño que provocan estos hongos xilófagos está la aplicación de fungicidas. Algunos fungicidas, además de actuar contra el crecimiento fúngico, pueden tener actividad dual contra el crecimiento de insectos y bacterias. También se pueden diferenciar de acuerdo con el modo de aplicación y la condición del material lignocelulósico en el que se aplican. Por ejemplo, los productos que se citan para su empleo principalmente en la madera seca son el ácido bórico (antibacterial, fungicida e insecticida); los carbamatos (antibacteriales); compuestos inorgánicos de cobre (antibacteriales y fungicidas) y compuestos cuaternarios de amonio (fungicidas). Los utilizados preferentemente en árboles en pie y, en menor medida, en los cultivos para consumo humano son el mancozeb (fungicida) y los triazoles (fungicidas), además de otros^{4,5,27}. La mayoría de estos activos son formulados a base de metales pesados²⁶. Entre las acciones reportadas por el uso de estos compuestos se cita el daño a corto plazo por alterar las comunidades microbianas del suelo, así como efectos negativos en la salud humana^{12,16,20,27,30}. Para afrontar esta problemática existe una variedad de sustancias de origen natural que prometen ser excelentes alternativas

para el control de hongos destructores de la madera. Entre estas se conocen sustancias como los extractos de plantas, los aceites esenciales, los extractivos de madera, las ceras y las resinas, entre otros, con capacidad para proteger a la madera contra estos patógenos³². Asimismo, ciertos compuestos aminados han demostrado una elevada actividad fungistática contra diversos hongos fitopatógenos. En un trabajo realizado por Xu *et al.*³⁸, se encontró que la trimetilamina y la dimetiloctilamina tuvieron una clara actividad fungistática, con la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia* y *Clonostachys rosea*.

Además de las sustancias mencionadas, existen compuestos orgánicos volátiles (COV) con capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos de plantas. En particular, un análisis cromatográfico de COV producidos por la bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 condujo a la identificación de la amina dimetilhexadecilamina (DMA16), que al ser aplicada en bajas concentraciones mostró ejercer un efecto de represión sobre el crecimiento de los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*^{22,34,36}. Otro COV producido por diversos aislados bacterianos con una elevada actividad inhibitoria contra *P. lilacinus* y *P. chlamydosporia* fue la butamina⁴⁰.

Esta información muestra el potencial de las aminas para preservar el adecuado estado de la madera al contrarrestar el daño provocado por el ataque de hongos xilófagos, y se las considera una valiosa alternativa al uso de compuestos peligrosos, como el ácido bórico, los carbamatos, los triazoles y otros agentes preservadores de la madera^{11,13}.

El propósito de nuestro trabajo fue determinar la actividad antifúngica de la cepa bacteriana *A. agilis* UMVV2 y de los compuestos volátiles expresados *in vitro* sobre el crecimiento de hongos xilófagos aislados en la comunidad de Cuanajo, Michoacán, México.

Materiales y métodos

Sitio y colecta de los hongos xilófagos

El área de estudio se localizó en la comunidad de Cuanajo, municipio de Pátzcuaro, Michoacán, México (longitud: -101,5167, latitud: 19,4833). Se seleccionó la madera de ejemplares del género *Pinus* infectada con los organismos xilófagos, tanto de árbol en pie como de madera derribada o aserrada. Luego, se procedió a tomar una muestra del hongo a partir del corte de los carpóforos en contacto con el tronco. A continuación, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Madera (FITECMA-UMSNH), donde se procedió al aislamiento de los organismos xilófagos.

Para el aislamiento de los organismos colectados (llamados UMTM) se trabajó en campana de flujo laminar (Novatech, México), donde las muestras se lavaron con agua esterilizada por 5 min, para después ser colocadas en cajas de Petri en medio agar dextrosa Sabouraud (ADS) (BD Bioxon®, México). Esas placas se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 10 días³⁷. A partir de las cajas con presencia de crecimiento se hicieron subcultivos hasta obtener cultivos puros.

Identificación molecular de los aislados xilófagos UMTM

Se realizó la extracción del ADN de 2 aislados UMTM con el método descrito por Reader y Broda²⁵, con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

1. Se pesaron 100 mg de micelio en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, EE. UU.) y se colocaron 0,4 g de perlas de vidrio, 200 µl de buffer de lisis (0,2 M Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,01 M EDTA; 1 % de SDS) y 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).
2. El contenido del tubo se mezcló en un vórtex (Scientific Industries Inc., EE. UU.) durante 6 min.
3. Se adicionaron 300 µl de fenol:cloroformo:isoamílico y 300 µl de buffer de lisis. Las muestras se mezclaron nuevamente en vórtex durante 30 s.
4. Se centrifugaron (Eppendorf, EE. UU.) a 14 000 r.p.m. durante 30 s.
5. La primera fase se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 300 µl de cloroformo:isoamílico (24:1). Se mezcló nuevamente en vórtex durante 10 s.
6. Se centrifugaron las muestras a 14 000 r.p.m. durante 30 s.
7. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se le agregaron 2,5 volúmenes de isopropanol. Las muestras se mantuvieron en un congelador a -20 °C (Torrey, México) durante 30 min.
8. Se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 5 min.
9. La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70 % y se centrifugó durante 3 min a 14 000 r.p.m.
10. La pastilla obtenida se dejó en campana hasta que se secó. Posteriormente, se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril.

Finalmente, la pastilla de ácidos nucleicos fue purificada utilizando el PureLink Plant DNA Purification Kit (Invitrogen^R, EE. UU.), de acuerdo con las especificaciones del producto. El ADN fue visualizado en gel de agarosa al 1 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y luego se llevó a cabo la cuantificación de la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific, Genesys, EE. UU.), empleando para las lecturas 3 µl de ADN y 997 µl de agua desionizada estéril. La concentración de ADN se calculó de acuerdo con la fórmula empleada por Barbas III *et al.*⁶ (concentración de ADN = $A_{260} * 50 * 1000/3$).

Para la identificación de los aislados fúngicos, se llevó a cabo la amplificación del gen 18S utilizando los oligonucleótidos NS1 y NS6³⁶. La reacción de PCR se efectuó en un equipo BioRad-iCycler (EE. UU.) en un volumen final de 20 µl, obtenido como sigue: 3 a 8 ng de ADN; 0,5 µM de NS1; 0,5 µM de NS6; PCR Master Mix (Promega Corp., EE. UU.), 12 µl. Las muestras fueron centrifugadas y calentadas a 94 °C durante 2 min. Se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR bajo las siguientes rampas de temperatura: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C 1 min; por último, se dio un ciclo de extensión adicional a 72 °C durante 3 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1 %. Una vez corroborada la amplificación del gen 18S, se llevó a cabo la purificación del producto de PCR con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega

Corp., EE. UU.), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Este material fue secuenciado con la técnica de Sanger en sistemas automatizados de tecnología capilar y de fluorescencia (<http://www.langebio.cinvestav.mx/>). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias depositadas en la base de datos GenBank, y para ello se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamientos básicos (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con el objeto de encontrar las secuencias homólogas más cercanas. Dichas secuencias fueron alineadas con el programa MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) y luego fueron recortadas manualmente para uniformizar el tamaño de las secuencias en 1076 bases. Con estas secuencias se construyó un árbol filogenético para la búsqueda de homologías, y para ello se empleó el algoritmo del método de agrupamiento de máxima parsimonia y una prueba de soporte de la topología *bootstrap* de 500 seudorréplicas del mismo programa MEGA 6.

Actividad holocelulolítica de los aislados fúngicos UMTM

La exploración de la presencia de celulasas, xilanasas y enzimas accesorias óxido-reductoras extracelulares en cada aislado fúngico silvestre se realizó después de 5 días de fermentación líquida de las fuentes de carbono carboximetil celulosa (1%), xilana de abedul (1%) o lactosa (2%) disueltas en un volumen inicial de 10 ml de medio mínimo mineral con suplemento de vitaminas y sulfato de amonio, de acuerdo con lo descrito por Alvarez-Navarrete *et al.*². La presencia de celulasas y xilanasas se determinó con la medición de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico⁹. Para determinar la actividad óxido-reductora se utilizó la técnica de reducción del 2,6-diclorofenolindofenol¹⁰.

Inhibición del crecimiento de aislados fúngicos UMTM por COV emitidos por *A. agilis* UMCV2

La bacteria *A. agilis* UMCV2 fue proporcionada por el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH³³. Para la evaluación del efecto de los volátiles emitidos por dicha cepa sobre el crecimiento en hongos UMTM aislados en la comunidad de Cuanajo, se empleó un sistema de cajas de Petri divididas (100 × 15 mm), con el propósito de evitar el contacto físico de ambos organismos. En una mitad de la caja se inoculó un fragmento de micelio (0,25 cm³) en medio ADS. En la otra mitad de la caja se estrió *A. agilis* UMCV2 sobre agar nutritivo (BD Bioxon, México). A continuación, las cajas de Petri fueron selladas y colocadas en una cámara de incubación a 28 °C en oscuridad por un período aproximado de 5 días. Los valores de crecimiento micelial de los aislados UMTM se evaluaron teniendo en cuenta el diámetro mayor.

Inhibición del crecimiento de aislados fúngicos UMTM por aminas

Muestras de 0,25 cm³ de los aislados fúngicos UMTM se sembraron en medio ADS adicionado con las

aminas dimetilbutanamina (DMA4), dimetiloctilamina (DMA8), dimetildecilamina (DMA10), dimetildodecilamina (DMA12), dimetiltetradecilamina (DMA14) y dimetilhexadecilamina (DMA16), en concentraciones de 50 y 100 μM. Todas las aminas empleadas fueron elaboradas por Sigma-Aldrich (EE. UU.). Las cajas se sellaron e incubaron a 28 °C por un período aproximado de 5 días. El crecimiento de los aislados UMTM se evaluó registrando el mayor diámetro de crecimiento del micelio.

Efecto fungistático de la madera adicionada con DMA16

Se utilizaron muestras de la albura de *Pinus radiata* con dimensiones de 1,5 × 0,25 × 0,25 cm (también llamadas «probetas»), las cuales fueron previamente esterilizadas por autoclave (AESA, México), 30 min a 120 °C y 15 lb. La adición de la DMA16 a las probetas se llevó a cabo de la siguiente manera: utilizando un frasco de 500 ml se sumergieron las probetas en una mezcla alcohol: agua:DMA16 (1:1:100 μM) por un período de 24 h a 30 °C en oscuridad. Pasado ese lapso, las probetas se extrajeron del frasco para dejar secar en oscuridad y a temperatura ambiente durante otras 24 h. Luego, las probetas se colocaron en un sistema de cajas de Petri adicionado con el medio ADS y se conformaron los siguientes 4 tratamientos: 1) control (el aislado UMTM crecido en medio ADS); 2) madera-hongo (probetas y el aislado UMTM en ausencia de la mezcla alcohol:agua:DMA16); 3) disolvente (el aislado UMTM crecido en presencia de probetas tratadas únicamente con una mezcla alcohol:agua 1:1), y 4) DMA16-hongo (el aislado UMTM crecido en presencia de probetas tratadas con la mezcla alcohol:agua:DMA16). Este experimento se realizó a 28 °C en oscuridad por un período aproximado de 5 días y se evaluó el crecimiento de aislados UMTM mediante el registro del diámetro mayor del crecimiento micelial.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron de forma independiente 2 veces y tuvieron 4 réplicas cada vez. Para la comparación de medias entre 2 tratamientos los resultados se analizaron mediante la prueba estadística de *t* (*t* de Student), o bien una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y una separación de medias con la prueba de Duncan para comparaciones múltiples ($p < 0,05$).

Resultados

Aislados fúngicos encontrados en la comunidad de Cuanajo-Michoacán

De los muestreos realizados en campo, en total se obtuvieron 10 cultivos microbianos, de los cuales solo 4 lograron crecer y fueron aislados en forma pura. Los ejemplares fueron nombrados UMTM2, UMTM3, UMTM7 y UMTM13. Los sustratos en los cuales se encontraron estos organismos fueron madera aserrada (UMTM2), árbol en pie (UMTM3 y UMTM7) y ejemplar arbóreo ya derribado (UMTM13).

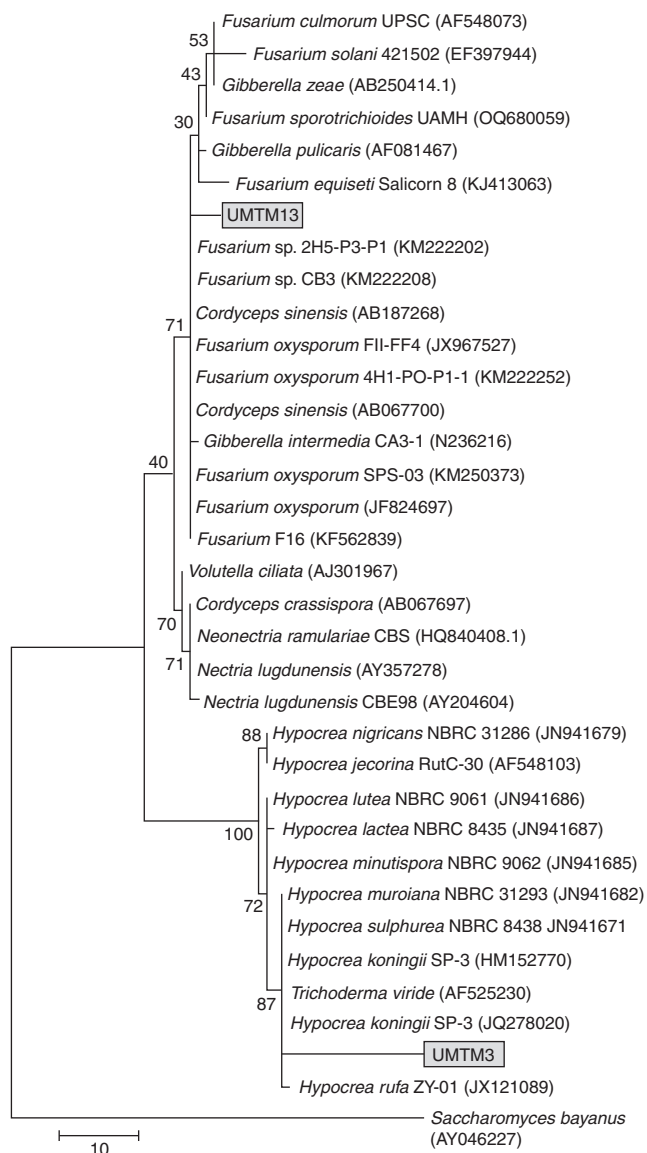


Figura 1 Árbol filogenético realizado a partir de la secuenciación del gen 18S de los aislados UMTM usando el método de agrupamiento máxima parsimonia. Se muestra el aislado UMTM3 dentro de agrupamiento del género *Hypocrea*. El aislado UMTM13 forma parte del agrupamiento de los géneros *Fusarium-Gibberella*. Los números contiguos a los nodos representan el porcentaje de aparición del nodo con base en un *bootstrap* de 500 repeticiones. Las secuencias de referencia fueron obtenidas del GenBank y sus números de acceso se muestran entre paréntesis.

Identificación molecular de los aislados UMTM

De los 4 aislados obtenidos, se seleccionaron 2 para ser identificados según la técnica molecular descrita en el apartado de materiales y métodos. Estos fueron los aislados UMTM3 y UMTM13, por la mayor sensibilidad y la mayor tolerancia que mostraron, respectivamente, a las aminas evaluadas en este trabajo, según se muestra más adelante.

En la **figura 1** se muestra el agrupamiento de las secuencias de los genes ribosomales 18S de los aislados UMTM3 y

Tabla 1 Actividad holocelulolítica de los aislados fúngicos encontrados en la comunidad de Cuanajo-Michoacán, México

Aislado fúngico	Actividad enzimática (U/ml)		
	Celulolítica	Xilanolítica	Óxido-reductora (10 ⁻⁶)
UMTM2	1,75	0,5	0,12
UMTM3	2,88	0,0	3,27
UMTM7	0,88	0,27	2,33
UMTM13	1,11	2,65	3,89

UMTM13 con las secuencias más cercanas encontradas en la base de datos GenBank. El aislado UMTM13 se agrupó en un racimo muy compacto soportado con un valor de *bootstrap* de 71/100, junto con organismos identificados como *F. oxysporum*. En ese mismo racimo encontramos organismos del género *Gibberella*, y un subracimo de este grupo concentró otras especies del género *Fusarium* y *Gibberella*. Si bien este resultado no nos permitió determinar con certeza la especie del aislado UMTM13, nos permitió inferir que es un organismo del género *Fusarium*.

Por otra parte, la secuencia del gen ribosomal de 18S del aislado UMTM3 se agrupó en un racimo soportado con un valor de *bootstrap* de 100/100 junto con 10 especies del género *Hypocrea*, de manera que concluimos que el aislado UMTM3 corresponde a dicho género, pero no fue posible precisar la especie.

Actividad holocelulolítica de los aislados UMTM

En los aislados UMTM se detectó actividad celulolítica, xilanolítica y óxido-reductora (**tabla 1**). La mayor actividad celulolítica correspondió al aislado UMTM3, con 2,88 U/ml. Por otra parte, el aislado UMTM13 mostró los valores más altos de actividad tanto xilanolítica como óxido-reductora.

Inhibición del crecimiento de aislados UMTM por COV de *A. agilis* UMCV2

Con la metodología descrita de cajas divididas se demostró que los COV emitidos por la cepa bacteriana *A. agilis* UMCV2 reprimieron el crecimiento de 3 de los 4 aislados UMTM evaluados (**fig. 2A**). Los organismos UMTM2, UMTM3 y UMTM7 mostraron una significativa inhibición del crecimiento micelial ($p \leq 0,05$) en relación con el tratamiento control. En cambio, el organismo UMTM13 no fue inhibido por los COV bacterianos. El organismo UMTM3 fue el que mostró la mayor sensibilidad a la presencia de *A. agilis* UMCV2 después de 5 días de incubación bajo el sistema de cajas de Petri en compartimentos separados: mientras que el desarrollo del micelio en el tratamiento control alcanzó a tocar los bordes de la caja de Petri (**fig. 2B**), en el tratamiento con *A. agilis* UMCV2 el desarrollo del aislado UMTM3 fue apenas visible durante el período considerado.

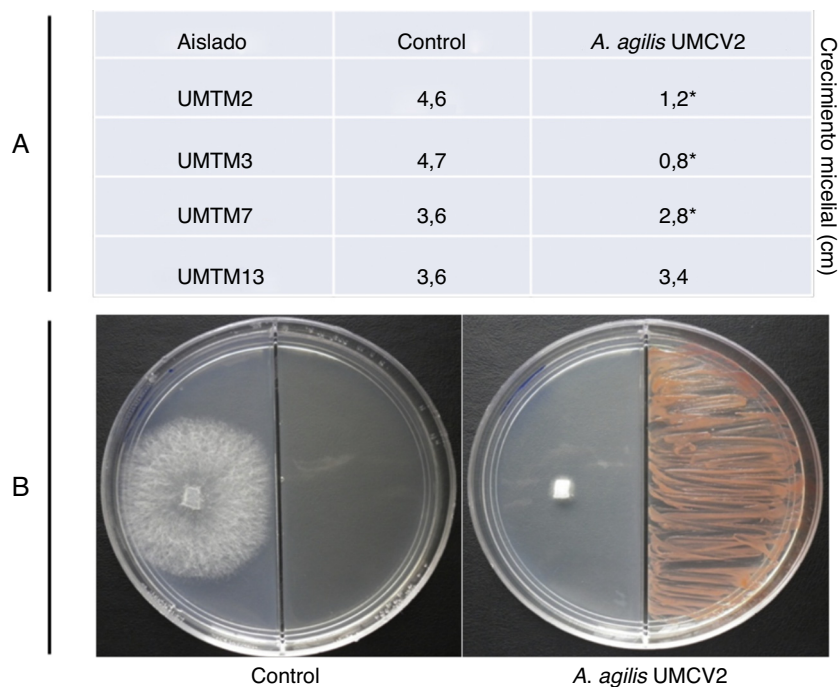


Figura 2 Efecto de los COV emitidos por *A. agilis* UMCV2 sobre el crecimiento de aislados UMTM. El panel A muestra los valores promedio del crecimiento micelial en los organismos expuestos a los COV. El panel B muestra el crecimiento del aislado UMTM3 bajo el sistema de cajas de Petri en compartimentos separados. Los resultados se analizaron mediante la prueba *t* de Student ($p < 0,05$; $n = 4$), el asterisco indica una diferencia estadística entre tratamientos.

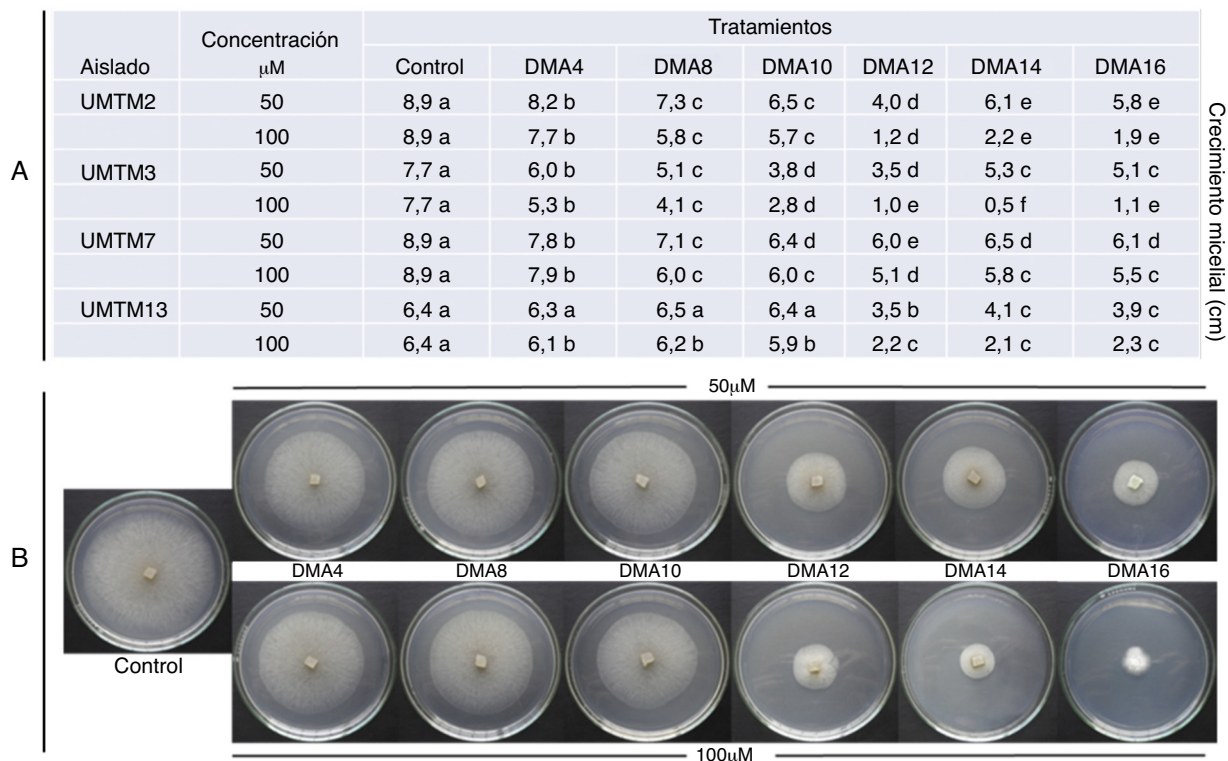


Figura 3 Efecto de las aminas sobre el crecimiento de aislados UMTM. El panel A muestra los valores observados para el crecimiento micelial de los aislados UMTM2, UMTM3, UMTM7 y UMTM13 en presencia de las aminas dimetilbutanamina (DMA4), dimetiloctilamina (DMA8), dimetildecilamina (DMA10), dimetildodecilamina (DMA12), dimetiltetradecilamina (DMA14) y dimetilhexadecilamina (DMA16) en concentraciones de 50 y 100 μM . El panel B muestra la imagen de la represión sobre el crecimiento de aislado UMTM13 por las aminas utilizadas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA seguido de una prueba de Duncan ($p < 0,05$; $n = 4$) para cada aislado a una misma concentración. Medias con la misma letra no muestran diferencia de significación estadística.

Efecto inhibitorio del crecimiento micelial de aislados UMTM por aminas

En la [figura 3 A](#) se muestra el efecto de aminas de cadena corta (DMA4 y DMA8), de cadena mediana (DMA10 y DMA12) y de cadena larga (DMA14 y DMA16) sobre el crecimiento de los aislados UMTM, a concentraciones de 50 y 100 μM . Los resultados fueron comparados a una misma concentración e indicaron que los compuestos de cadena corta tuvieron una menor efectividad para inhibir el crecimiento fúngico en comparación con los compuestos de cadena mediana y larga. También resultó evidente que dicha inhibición aumentó con el aumento de la concentración de las aminas. Los aislados UMTM2, UMTM3 y UMTM7 fueron más sensibles al efecto de las aminas en comparación con el aislado UMTM13, que a una concentración de 50 μM de las aminas DMA4, DMA8 y DMA10 no presentó diferencias significativas con el control.

En la [figura 3 B](#) se muestra, a modo de ejemplo, el impacto sobre el crecimiento micelial del aislado UMTM13 de las distintas aminas utilizadas a concentraciones de 50 y 100 μM . Las aminas DMA4, DMA8 y DMA10 mostraron una menor actividad inhibitoria que las DMA12, DMA14 y DMA16, ya sea a 50 o a 100 μM . Resulta interesante hacer notar que el efecto de inhibición es dependiente de la concentración y de la longitud de la cadena hidrocarbonada de la amina.

Las aminas no solo causaron una fuerte represión del crecimiento de estos aislados, sino también cambios morfológicos. La observación con microscopio óptico (40X) mostró diferencias en la estructura del micelio del aislado UMTM7 en el tratamiento control ([fig. 4A](#)) comparado con el expuesto a la amina DMA16 a 50 μM ([fig. 4B](#)) y a 100 μM ([fig. 4C](#)). En presencia de dicha amina a 50 μM se verificó una mayor densidad de las fibras miceliales, a pesar de que la colonia fue de menor tamaño ([fig. 3A](#)). A una concentración de 100 μM de DMA16, se observó una considerable disminución de la densidad y del crecimiento micelial ([fig. 4C](#)).

Efecto inhibitorio de la madera adicionada con DMA16 sobre el crecimiento de los aislados UMTM

En la [figura 5 A](#) se observa el efecto «protector» que tuvo el compuesto DMA16 sobre los aislados UMTM al aplicarse en la madera de *P. radiata*. Los aislados UMTM2, UMTM7 y UMTM13 mostraron una inhibición de su crecimiento estadísticamente significativa en el tratamiento DMA16-hongo. Esta respuesta significativa no se encontró con el aislado UMTM3, pero se evidenció una clara tendencia. Por otra parte, el tratamiento disolvente solo mostró una inhibición del crecimiento en el aislado UMTM2, ya que en el organismo UMTM7 el crecimiento fue mayor que en el tratamiento control.

En la [figura 5 B](#) se muestra cómo fue el crecimiento del aislado UMTM2 en presencia o ausencia de DMA16. Se observó que cuando este organismo creció en madera sin tratamiento (tratamiento madera-hongo), el desarrollo fúngico se extendió por toda la caja de Petri e incluso sobre la madera. De igual manera, el disolvente en ausencia de la amina no reprimió su desarrollo y alcanzó valores promedio de 7,3 cm ([fig. 5A](#)). Finalmente, notamos que cuando la madera fue previamente tratada con esta amina (DMA16-hongo) hubo una clara inhibición en el desarrollo del aislado, lo que limitó su crecimiento sobre la madera.

Discusión

En nuestros ensayos, la emisión de COV de *A. agilis* UMCV2 bajo el sistema de cajas de Petri divididas limitó de forma significativa el crecimiento de los aislados fúngicos UMTM2, UMTM3 y UMTM7. Sin embargo, el aislado UMTM13 mostró resistencia a los volátiles bacterianos y generó un crecimiento micelial similar al control.

Se ha señalado en diversos trabajos que los COV prometen ser una buena alternativa para el control de patógenos. En un trabajo reciente se descubrió que la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 produce una serie de compuestos volátiles que inhiben el crecimiento y la germinación de esporas en *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; entre estos se identificaron fenoles, bencenos, alcoholes, aldehídos y otros³⁹. La cepa *A. agilis* UMCV2 produce, además de la dimetilhexadecilamina, compuestos que en su conjunto pueden contribuir a la inhibición de los organismos xilófagos, ya que dentro del perfil de compuestos volátiles identificados se detectaron alcoholes, dimetil pirazina, quinolina y otros³⁴. Asimismo, y en relación con el estudio exploratorio para detectar la presencia de celulasas, xilanasas y enzimas accesorias óxido-reductoras extracelulares en estos aislados nativos, encontramos que los 4 mostraron tales actividades enzimáticas vinculadas con el deterioro de la madera, propia de organismos xilófagos^{2,23}.

Por otra parte, mostramos un efecto dependiente de la concentración y de la longitud de la cadena hidrocarbonada perteneciente al grupo lipídico sobre el crecimiento de los aislados UMTM. En el análisis comparativo de las aminas dimetilbutanamina (DMA4), dimetiloctilamina (DMA8), dimetildecilamina (DMA10), dimetildodecilamina (DMA12), dimetiltetradecilamina (DMA14) y dimetilhexadecilamina (DMA16), se observó un mayor efecto inhibitorio a mayor longitud de la cadena. Este resultado se vincula con lo reportado por Velázquez-Becerra *et al.*³⁵, quienes advirtieron también un efecto dependiente de la longitud de la cadena con los compuestos aminados. En este último trabajo citado, los compuestos dimetilbutanamina, dimetiloctilamina y dimetildecilamina mostraron un efecto menos agresivo sobre los organismos fitopatógenos *B. cinerea* y *P. cinnamomi* que las aminas dimetildodecilamina, dimetiltetradecilamina y dimetilhexadecilamina, las cuales tuvieron un efecto significativamente mayor.

Además de los compuestos aminados, los ácidos grasos son otro grupo de sustancias que han sido identificadas y utilizadas como agentes antifúngicos. Se ha demostrado que estos compuestos tienen un fuerte potencial como inhibidores de patógenos. Por ejemplo, Andrew y Smith³ mostraron la actividad de diversos ácidos grasos capaces de erradicar o inhibir el crecimiento de una amplia variedad de organismos. Distintos trabajos comunican las propiedades antimicrobianas de los ácidos grasos; entre otros, los ácidos grasos C10:0 y C12:0 fueron reportados como compuestos con actividad antifúngica^{3,7}; asimismo, los ácidos grasos C10:0, C12:0, C14:0, C16:1 presentaron actividad antimicrobiana^{3,8} y los C18:1, C18:2, C18:3, C20:4 fueron identificados como antivirales^{3,31}.

Aún no se tiene en claro el mecanismo por el cual los ácidos grasos limitan el crecimiento microbiano. De acuerdo con las evidencias, se piensa que el objetivo o blanco principal de acción es la membrana de la célula, donde los ácidos

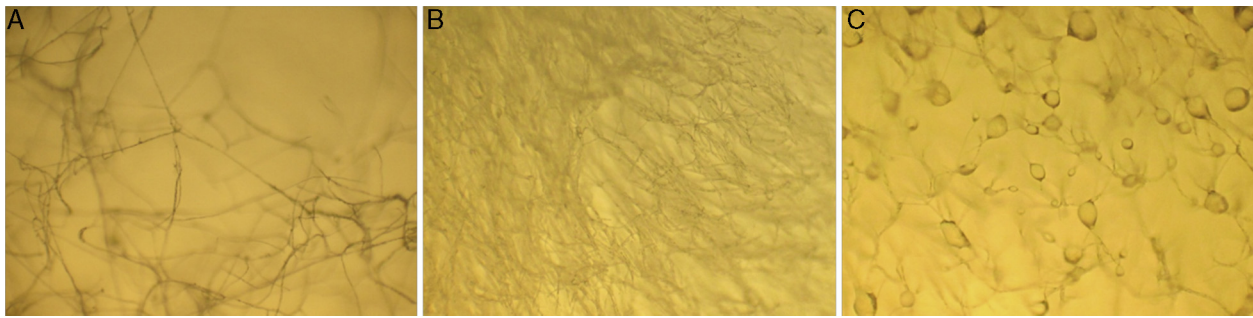


Figura 4 Efecto de la dimetilhexadecilamina (DMA16) sobre el crecimiento del aislado UMTM7. La imagen A muestra la estructura del micelio de dicho aislado en el medio. La imagen B muestra la estructura del micelio de ese mismo aislado en presencia de DMA16 a $50\ \mu\text{M}$ y la imagen C muestra el micelio del mismo aislado en presencia de DMA16 a $100\ \mu\text{M}$. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio óptico a 40x.

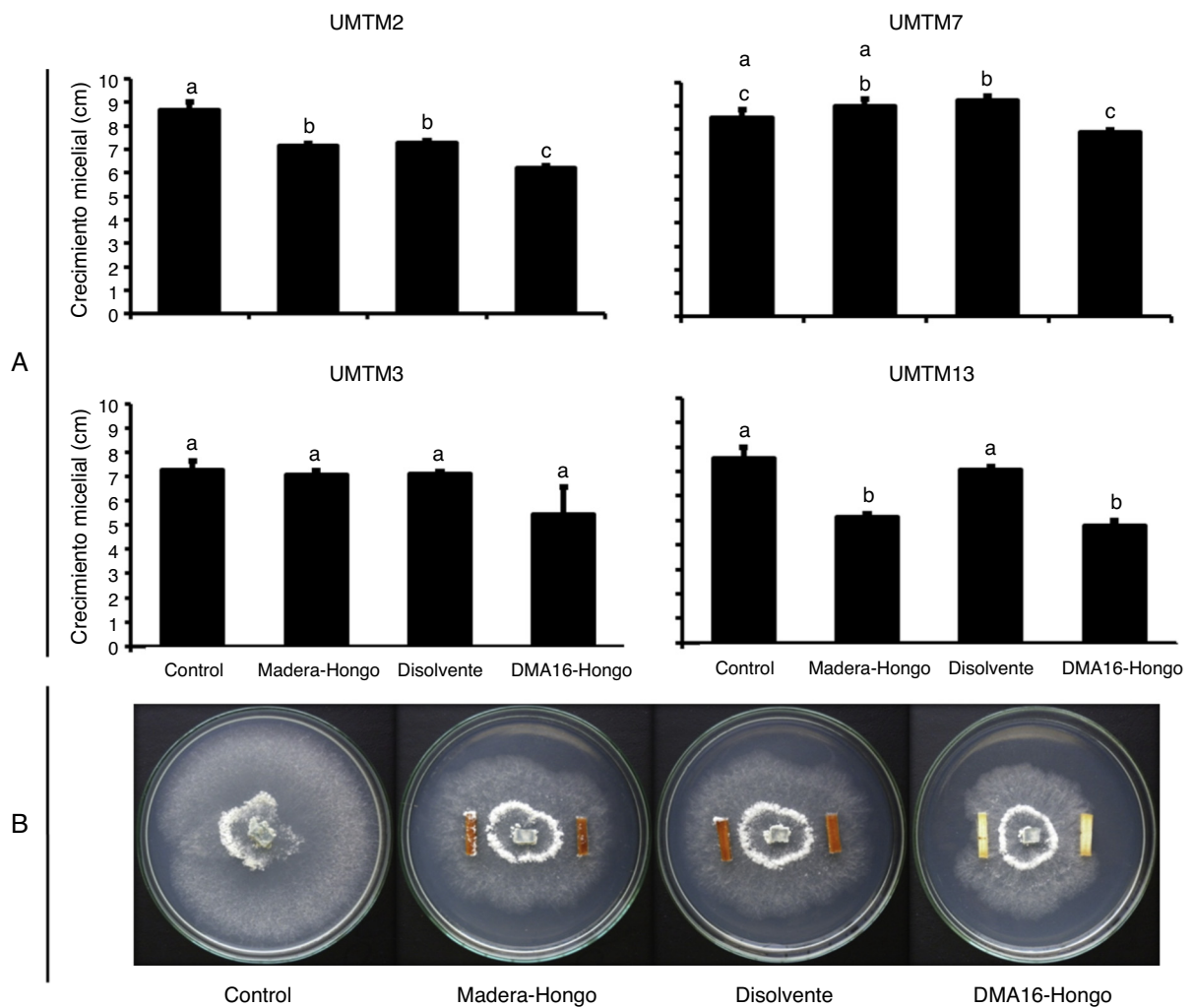


Figura 5 Efecto de los aislados xilófagos sobre la madera sin tratar o tratada con el compuesto dimetilhexadecilamina (DMA16). El panel A muestra crecimiento micelial de los aislados UMTM en los diversos tratamientos. El panel B muestra «probetas» de madera de *P. radiata* expuestas a los distintos tratamientos en presencia del aislado UMTM2 en cajas de Petri. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA seguido de una prueba de Duncan ($p < 0,05$; $n = 4$), las barras con la misma letra indican respuestas sin diferencias de significación estadística.

grasos interrumpen la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Además de interferir con la producción de energía celular, también pueden llegar a inhibir la actividad enzimática, así como desencadenar una alteración en la absorción de nutrientes y liberar una actividad de peroxidación y productos de degradación^{3,15}.

Pudimos también notar cómo la presencia del compuesto DMA16 en probetas de madera (*P. radiata*) se asoció con un efecto protector contra los aislados UMTM. Si bien es cierto que los hongos *Hypocrea* spp. UMTM3 y UMTM7 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento control, sí se observó que el crecimiento de estos aislados quedó limitado al medio de cultivo y no pasó a las probetas de madera, lo cual resulta importante comentar, ya que este fenómeno indica un efecto protector en la madera que impide el crecimiento fúngico.

Finalmente, cabe señalar que el compuesto DMA16 promete ser útil como un posible tratamiento protector contra organismos destructores de la madera, aunque cuando se condensa y se aplica a la madera aparentemente pierde eficacia. Por esa razón creemos que se requieren más y mejores estudios, a fin de encontrar una forma de aplicación más efectiva y una eficaz concentración del compuesto que funcione contra un amplio rango de organismos destructores de la madera.

Conclusiones

Los organismos fúngicos encontrados en la comunidad de Cuanajo-Michoacán se correspondieron con géneros que deterioran la madera y alteran sus propiedades fisicoquímicas; el aislado UMTM3 se asoció con *Hypocrea* spp. y el aislado UMTM13 con *Fusarium* spp. Por otra parte, tanto los COV emitidos por la cepa *A. agilis* UMCV2, como las aminas probadas en este estudio, mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de nuestros aislados UMTM y revelaron capacidad para limitar su desarrollo en condiciones *in vitro*. En especial, el compuesto DMA16 deja abierta la posibilidad para su uso como tratamiento preventivo contra el ataque de xilófagos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y a la Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH, por el apoyo a este trabajo.

Bibliografía

1. Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversity of fungi in Mexico. *Rev Mex Bio.* 2014;85:76–81.
2. Alvarez-Navarrete M, López GER, García AF, López GR, Martínez-Pacheco MM. Selection and molecular identification of fungal isolates that produce xylanolytic enzymes. *Genet Mol Res.* En prensa.
3. Andrew DP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85:1629–42.
4. Axelstad M, Boberg J, Nellemann C, Kiersgaard M, Pernille RJ, Christiansen S, Sørig HK, Hass U. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci.* 2011;120:439–46.
5. Bahraminejad S, Saeed A, Mehdi F. *In vitro* antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *Afr J Biotechnol.* 2011;10:16193–201.
6. Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. 2007. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harb Protoc.* 2007 [consultado Feb 2014]. Disponible en: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11>
7. Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2001;109:670–8.
8. Bergsson G, Steingrímsson O, Thormar H. *In vitro* susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2790–2.
9. Breuil C, Saddler JN. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme Microb Tech.* 1985;7:327–32.
10. Calderón OMA, Mendoza MRA, López GR, Santoyo G, Flores GA, Martínez-Pacheco MM. Scrutiny for a disaccharide oxydoreductase from filamentous extracellular pathogens. *Afr J Microbiol Res.* 2011;5:3487–92.
11. Chen F, Liu X. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from Stone Fruit Orchards in the Eastern United States. *Plant Dis.* 2013;97:1063–8.
12. Dong F, Jing L, Bezhan C, Yongpu C, Jun X, Xingang L, Yuanbo L, Xiu C, Bertucci C, Tedesco D, Zanasi R, Yongquan Z. Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil. *Environ Sci Technol.* 2013;47:3386–94.
13. Formenti S, Naresh M, Pietri A, Battilani P. *In vitro* impact on growth, fumonisins and aflatoxins production by *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* using anti-fungal compounds and a biological control agent. *Phytopathol Mediterr.* 2012;51:247–56.
14. Heitman J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. *Fungal Biol Rev.* 2011;25:48–60.
15. Huang BC, George B, Jeffery LE. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2010;55:555–60.
16. Kah M, Sabine B, Colin DB. Factors influencing degradation of pesticides in soil. *J Agric Food Chem.* 2007;55:4487–92.
17. Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. Editor surrey. En: *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi.* 9th ed. Wallingford, UK: CABI Bioscience; 2001.

18. Lonsdale D. Principles of tree hazard assessment and management. En: Research for Amenity Trees. London: The Stationery Office; 1999. p. 388.
19. Martínez TA, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol*. 2005;8:195–204.
20. Milenkovski S, Erland B, Per-Eric L, Olof B. Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology*. 2010;19:285–94.
21. Nicolotti G, Gonthier P, Guglielmo F, Matteo MG. A biomolecular method for the detection of wood decay fungi: A focus on tree stability assessment. *Arboric Urban For*. 2009;35:14–9.
22. Orozco-Mosqueda MC, Velázquez-Becerra C, Macías Rodríguez LI, Santoyo G, Flores-Cortez I, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E. *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) *in vitro* via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil*. 2013;362:51–66.
23. Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassini F. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:16–20.
24. Patel N, Oudemans PV, Hillman BI, Kobayashi DY. Use of the tetrazolium salt MTT to measure cell viability effects of the bacterial antagonist *Lysobacter enzymogenes* on the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *A Van Leeuw*. 2013;103:1271–80.
25. Reader U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol*. 1985;1:17–20.
26. Reinprecht L. Carisse O, editor. 2010. Fungicides for wood protection -world viewpoint and evaluation testing in Slovakia, Fungicides, InTech [consultado 25 Ene 2014]. DOI: 10.5772/13233. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/fungicides/fungicides-for-wood-protection-world-viewpoint-and-evaluation-testing-in-slovakia>
27. Schmidt O. Indoor wood-decay basidiomycetes: Damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycol Prog*. 2007;6:261–79.
28. Setälä H, McLean MA. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia*. 2004;139:98–107.
29. Talbot JM, Bruns TD, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Peay KG. Independent roles of ectomycorrhizal and saprotrophic communities in soil organic matter decomposition. *Soil Biol Biochem*. 2013;57:282–91.
30. Tetiana MA, Kubrak OI, Husak VV, Kenneth BS, Volodymyr IL. The mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo induces mild oxidative stress in Goldfish brain, liver, and kidney. *Environ Toxicol*. 2014;29:1227–35.
31. Thormar H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessolano T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31:27–31.
32. Tian J, Xiaoquan B, Hong Z, Jingsheng H, Bo H, Youwei W. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol*. 2011;145:464–70.
33. Valencia-Cantero E, Hernández-Calderón E, Velázquez-Becerra C, López-Meza JE, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil*. 2007;291:263–73.
34. Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Flores-Cortez I, Valencia-Cantero E. A volatile organic compound isolated from *Arthrobacter agilis* modulates growth of *Medicago sativa in vitro*. *Plant Soil*. 2011;339:329–40.
35. Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C, Valencia-Cantero E. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma*. 2013;6:1251–62.
36. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols. A guide to methods and applications. 1990;31:5–22.
37. Worrall J, Anagnost SE, Zabel RA. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia*. 1997;89:199–219.
38. Xu C, Mo M, Zhang L, Zhang K. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol Biochem*. 2004;36:1997–2004.
39. Yuan J, Waseem R, Qirong S, Qiwei H. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:5942–4.
40. Zou CS, Mo MH, Gu YQ, Zhou JP, Zhang KQ. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biol Biochem*. 2007;39:2371–9.