



**universidad  
de león**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Aislamiento y caracterización de microorganismos desde madera en descomposición con potencial industrial**

**Programa de Doctorado Biología  
Molecular y Biotecnología**

**Óscar Velasco Rodríguez**

**León · 2023**

**Director**

**Dr. Carlos Barreiro Méndez**



**Memoria presentada por Óscar  
Velasco Rodríguez para optar al  
grado de Doctor**



*A mi padre*



## *Agradecimientos*

---

Esta tesis doctoral se ha desarrollado gracias a la ayuda de mucha gente, dentro y fuera del laboratorio, que sin su colaboración y apoyo no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

El primer lugar, me gustaría agradecer a las instituciones que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta tesis doctoral. Al Área de Investigación (ERA-IB) de la Comisión Europea y al Ministerio de Economía y Competitividad gracias a los cuales se financió el proyecto ProWood (*“Wood and derivatives protection by novel biocoating solutions”*; ref. PCIN-2016-081, ERA-IB 7th Joint Call) que posibilitó la realización de esta tesis.

A la Universidad de León por facilitarme la realización de la tesis doctoral en ella, así como por la ayuda administrativa, los cursos, seminarios de formación y por todos los recursos que he podido llegar a usar durante mi periodo doctoral.

Al Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) por dejarme trabajar en sus instalaciones, por proporcionarme todo el material necesario para la realización de este trabajo y sobre todo por convertirme en uno más de ellos.

A mi director de tesis, el Dr. Carlos Barreiro, que, sin su dirección, guía y paciencia (creo que sobre todo paciencia), no hubiera sido posible nada de esto. Por confiar en mí para la realización de este trabajo, así como por toda la ayuda, charlas y discusiones que hemos tenido durante estos años, estaré siempre agradecido.

A todas las personas con las que he tenido la oportunidad de trabajar dentro de INBIOTEC. Muchas gracias, Katarina, por enseñarme básicamente todo lo que sé sobre hongos. Antonio, Rosma y Maite, por resolver siempre toda duda que pudiera tener sobre Actinomicetos. Carlos y Alberto, por ayudarme siempre que necesitaba una

mano. Clara y Mar, por sus consejos y charlas a la hora del café. Josefina y Berna, por estar siempre ahí ayudando en todos los pasos del proceso.

Me gustaría también agradecer a todas las personas con las que he tenido la oportunidad de trabajar, aunque sea por poco tiempo, porque todas ellas han contribuido a la realización de esta tesis doctoral. David, Macarena, María, Nieves, Alexia e Iván muchas gracias por ayudarme mientras trabajabais a mi lado. En especial me gustaría agradecer a Mariana, ya que ha sido mi mano derecha en el laboratorio durante estos años, por su inestimable ayuda, apoyo y risas, sin ti no hubiera sido posible.

Además, me gustaría agradecer a las personas que sin estar presentes conmigo en el día a día, me ha apoyado siempre. Pepe, Rafa y Belén gracias por estar ahí desde mis inicios en el mundo del laboratorio. Marta, gracias por apoyarme siempre, sin importar la tontería que se me ocurriera y por ser siempre un punto de apoyo cuando quiero hablar con alguien. Adam, *I really want to thank you for pushing me to achieve the PhD, and also for all the trips and hours of conversation.* Conor, *for always supporting me, even though sometimes I doubted myself.* Adrián, Edu y Guillermo por estar conmigo desde siempre y convertiros en parte de mi familia.

Por último, me gustaría agradecer especialmente a toda mi familia por creer en mí, apoyarme en todo momento, estar siempre a mi lado y sacar lo mejor y peor de mí. Estoy y estaré siempre por todo ello eternamente agradecido de teneros.

---

<b>Índice</b>
---------------

ÍNDICE.....	- K-
RESUMEN .....	- X -
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1. LA MADERA.....	- 3 -
1.1.1. Nivel macroscópico .....	- 3 -
1.1.2. Nivel microscópico.....	- 5 -
1.1.3. Nivel molecular .....	- 7 -
1.2. IMPORTANCIA DE LA MADERA .....	- 10 -
1.2.1. Importancia económica.....	- 10 -
1.2.2. Madera como material para la obtención de energía.....	- 11 -
1.2.3. La madera como material de construcción.....	- 14 -
1.3. PROTECCIÓN DE ESTRUCTURAS DE MADERA .....	- 14 -
1.3.1. Impregnación de la madera .....	- 15 -
1.3.2. Modificación de la madera.....	- 16 -
1.3.3. Recubrimientos protectores de la madera.....	- 17 -
1.3.4. Nuevas alternativas para la protección de la madera .....	- 17 -
1.4. LA DEGRADACIÓN DE LA MADERA.....	- 18 -
1.4.1. Agentes abióticos.....	- 18 -
1.4.2. Bacterias degradadoras de madera .....	- 19 -
1.5. LA DEGRADACIÓN POR HONGOS .....	- 21 -
1.5.1. Degradación blanda.....	- 22 -
1.5.2. Degradación blanca .....	- 24 -
1.5.3. Degradación parda .....	- 26 -
1.5.4. Decoloración de la madera .....	- 28 -
1.6. NUEVAS FUENTES DE MICROORGANISMOS .....	- 29 -
1.6.1. La madera como nicho ecológico.....	- 30 -
1.7. APLICACIONES DE LOS MICROORGANISMOS .....	- 33 -
1.7.1. Microorganismos productores de sustancias antimicrobianas.....	- 33 -
1.7.2. Microorganismos como antagonistas de hongos degradadores .....	- 37 -
1.7.3. Microorganismos productores de enzimas de interés industrial.....	- 38 -
1.8. EL GÉNERO <i>BACILLUS</i> .....	- 41 -
1.8.1. Clado <i>B. cereus</i> .....	- 41 -
1.8.2. Clado <i>B. subtilis</i> .....	- 43 -
1.9. OBJETIVOS .....	- 47 -
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>- 49 -</b>
2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS .....	- 51 -

2.1.1. Cepas bacterianas .....	- 51 -
2.1.2. Cepas fúngicas.....	- 51 -
2.2. MEDIOS DE CULTIVO .....	- 52 -
2.2.1. Medios de cultivo bacterianos .....	- 53 -
2.2.2. Medios de cultivo fúngicos .....	- 55 -
2.2.3. Aditivos de medios de cultivo. ....	- 61 -
2.3. EQUIPAMIENTO.....	- 61 -
2.3.1. Equipamiento para microbiología.....	- 61 -
2.3.2. Equipamiento para biología molecular.....	- 62 -
2.3.3. Equipamiento para estudios de proteómica. ....	- 62 -
2.3.4. Equipamiento de uso general. ....	- 63 -
2.4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS. ....	- 64 -
2.4.1. Cepas bacterianas .....	- 64 -
2.4.2. Cepas fúngicas.....	- 65 -
2.5. REACTIVOS QUÍMICOS .....	- 65 -
2.5.1. Reactivos para biología molecular.....	- 65 -
2.5.2. Reactivos para proteómica .....	- 68 -
2.5.3. Conjuntos de reactivos (kits) .....	- 70 -
2.6. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE MADERA EN DEGRADACIÓN.....	- 70 -
2.6.1. Recogida de muestras .....	- 70 -
2.6.2. Aislamiento de microorganismos desde muestras de madera .....	- 71 -
2.6.3. Cultivo de microorganismos aislados de madera en degradación.....	- 72 -
2.7. AISLAMIENTO DE ADN .....	- 73 -
2.7.1. Aislamiento de ADN de bacterias ambientales.....	- 73 -
2.7.2. Aislamiento de ADN de hongos ambientales .....	- 74 -
2.8. MANIPULACIÓN DEL ADN .....	- 75 -
2.8.1. Determinación de la cantidad y calidad del ADN extraído.....	- 75 -
2.8.2. Identificación de microbiana mediante secuenciación.....	- 75 -
2.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	- 75 -
2.8.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	- 76 -
2.9. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL PARA ESTUDIOS METAGENÓMICOS.....	- 77 -
2.9.1. Aislamiento de ADN para metagenómica.....	- 77 -
2.9.3. Evaluación de la diversidad microbiana .....	- 79 -
2.10. ENSAYO DE COMPETENCIA .....	- 79 -
2.11. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ENZIMÁTICA EN CEPAS DE <i>PENICILLIUM</i> .....	- 81 -
2.11.1. Determinación de actividad celulolítica.....	- 81 -
2.11.2. Determinación de actividad feruloil esterasa (FAE).....	- 82 -
2.12. ESPORULACIÓN DE <i>B. PUMILUS</i> .....	- 82 -
2.12.1. Tinción de esporas (Schaeffer-Fulton).....	- 83 -
2.13. ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	- 83 -
2.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	- 84 -

2.14.1. Determinación de capacidad antifúngica por volátiles .....	- 84 -
2.14.2. Determinación de capacidad antifúngica por sustancias solubles .....	- 85 -
2.14.3. Determinación de capacidad antibacteriana .....	- 86 -
2.15. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GENOMA DE <i>B. PUMILUS</i> .....	- 87 -
2.16. ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO .....	- 88 -
2.16.1. Obtención de las muestras .....	- 88 -
2.16.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	- 90 -
2.16.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	- 90 -
2.16.4. Electroforesis bidimensional fluorescente (DIGE) .....	- 92 -
2.16.5. Detección y análisis mediante 2D-DIGE .....	- 98 -
2.16.6. Extracción de puntos proteicos y digestión tróptica .....	- 99 -
2.16.7. Identificación proteica mediante espectrometría de masas.....	- 101 -
2.17. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS UTILIZADAS .....	- 102 -
2.17.1. Análisis estadísticos .....	- 102 -
2.17.2. Análisis de genomas .....	- 102 -
2.17.3. Bases de datos .....	- 103 -
2.17.4. Análisis filogenético .....	- 103 -
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>- 105 -</b>
CAPÍTULO 1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DESDE MADERA EN DEGRADACIÓN .....	- 107 -
3.1.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	- 107 -
3.1.2. Muestreo de madera en degradación .....	- 107 -
3.1.3. Identificación de especies aisladas .....	- 115 -
3.1.4. Análisis metagenómicos .....	- 127 -
3.1.5. Diversidad microbiana.....	- 132 -
CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MICROBIANOS .....	- 137 -
3.2.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	- 137 -
3.2.2. Actividad antagonista de los microorganismos aislados .....	- 137 -
3.2.3. Análisis de presencia de PKS y NRPS en Actinobacteria .....	- 157 -
3.2.4. Análisis de presencia de PKS y NRPS en <i>Penicillium</i> .....	- 165 -
3.2.5. Presencia de actividades enzimáticas de interés en <i>Penicillium</i> .....	- 171 -
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE <i>BACILLUS PUMILUS</i> .....	- 175 -
3.3.1. Introducción y objetivos del capítulo .....	- 175 -
3.3.2. Selección del mejor candidato.....	- 176 -
3.3.3. Condiciones de crecimiento de cepas de <i>B. pumilus</i> .....	- 178 -
3.3.4. Optimización de las condiciones de esporulación de <i>B. pumilus</i> .....	- 181 -
3.3.5. Caracterización de la capacidad antimicrobiana de <i>B. pumilus</i> .....	- 187 -
3.3.6. Secuenciación y análisis genómico de cepas de <i>B. pumilus</i> .....	- 198 -
3.3.7. Análisis comparativo del proteoma de diferentes <i>B. pumilus</i> .....	- 210 -
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>- 223 -</b>
4.1. LA MADERA EN DEGRADACIÓN COMO ECOSISTEMA .....	- 225 -

4.1.1. <i>Fracción cultivable</i> .....	- 225 -
4.1.2. <i>Fracción no cultivable</i> .....	- 226 -
4.2. POTENCIAL ANTIFÚNGICO Y ENZIMÁTICO DE LOS AISLADOS.....	- 227 -
4.2.1. <i>Potencial antifúngico de las cepas fúngicas aisladas</i> .....	- 227 -
4.2.3. <i>Potencial antifúngico de las cepas bacterianas aisladas</i> .....	- 228 -
4.2.4. <i>Busqueda de genes biosintéticos en Actinobacterias y Penicillium</i> .....	- 229 -
4.2.5. <i>Capacidad enzimática de las cepas de Penicillium</i> .....	- 231 -
4.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CEPAS DE <i>B. PUMILUS</i> .....	- 232 -
4.3.1. <i>Actividad antibacteriana y antifúngica</i> .....	- 233 -
4.3.2. <i>Análisis del genoma de las cepas aisladas</i> .....	- 234 -
4.3.3. <i>Análisis proteómico comparativo</i> .....	- 236 -
4.4. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	- 239 -
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>- 241 -</b>
CONCLUSIONES .....	- 243 -
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>- 245 -</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>- 295 -</b>
7.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	- 297 -
7.1.1. <i>Tablas suplementarias</i> .....	- 297 -
7.1.2. <i>Figuras suplementarias</i> .....	- 304 -
7.2 PUBLICACIONES.....	- 320 -
7.2.1. <i>Artículos</i> .....	- 320 -
7.2.2. <i>Capítulos</i> .....	- 321 -

## Resumen

La madera en degradación se considera un ecosistema en sí mismo, en ella se dan complejas relaciones entre los microorganismos que conviven en su interior. La necesidad de luchar por los nutrientes crea un ambiente competitivo entre las especies que se encuentran dentro de ella, convirtiéndola en un ecosistema propicio para el aislamiento de especies microbianas interesantes para el desarrollo industrial.

Durante este trabajo se han aislado 720 microorganismos de madera en degradación desde bosques de España y Noruega, aislando e identificando mayormente bacterias de la familia Bacillaceae y hongos del género *Penicillium*. Se ha analizado las diferencias en la microbiota en ambos lugares, observando una relación entre la degradación de la madera y la diversidad microbiana. Los microorganismos aislados se han puesto a prueba para inhibir el crecimiento de hongos degradadores de madera, observando cepas dentro de los géneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Pseudomonas* capaces de inhibir por completo a estos hongos. Además, se han hallado agrupaciones de genes biosintéticos (PKSs y NRPSs) en los principales microorganismos productores de compuestos bioactivos, bacterias de la clase Actinobacteria y hongos del género *Penicillium*. Para completar la caracterización de los aislados se ha demostrado la producción de enzimas relevantes para la industria, celulasas, endocelulasas y feruloil esterasas, por parte de los hongos aislados del género *Penicillium*.

Por otra parte, se ha seleccionado y caracterizado aquellas cepas más propicias para ser usadas en la protección de la madera contra de degradación, dos cepas de *Bacillus pumilus* (V17C11 y P48C1), para ello se ha: **i)** desarrollando un protocolo para propiciar la esporulación de estas cepas, **ii)** comparando su capacidad para producir compuestos antifúngicos y capacidad antibacteriana con cepas de la misma especie aisladas de superficies metálicas y con una cepa de colección tipo, **iii)** secuenciado y analizado el genoma de estas cepas, y **iv)** comparado el proteoma de las cepas de *B. pumilus* utilizadas durante este trabajo entre sí.



# 1. Introducción y objetivos



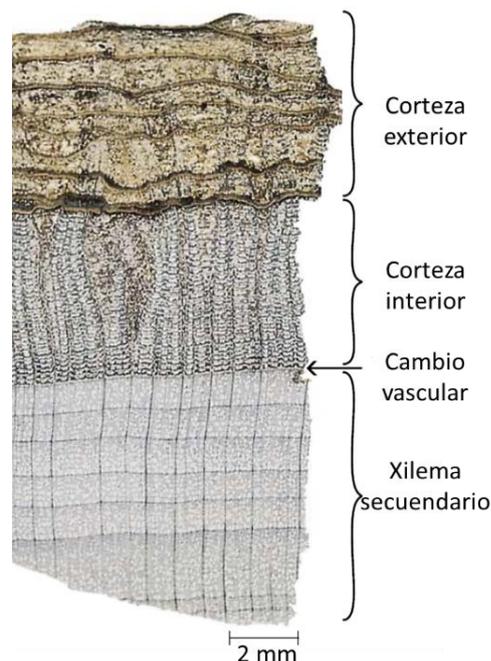
*Quercus pseudo-cocifera*. Lamina 165 (1839-1845). Por: Pierre-Edmond Boissier. En: *Voyage botanique dans le midi de l'Espagne pendant l'année 1837*. Real Jardín Botánico.



## 1.1. LA MADERA

Un árbol en crecimiento contiene dos partes bien diferenciadas. Por un lado, las raíces, responsables del aporte de agua, el anclaje al sustrato y de almacenamiento de nutrientes y, por otro lado, el tallo, compuesto por el tronco, las ramas y las hojas, esta parte es la responsable de formar los nutrientes en las hojas y de distribuir tanto el agua como dichos nutrientes por todas las células de árbol a través de canales denominados xilemas y floemas.

El tronco del árbol está formado por diferentes componentes que crean una estructura altamente especializada compuesta principalmente por dos elementos que se esquematizan en la figura 1.1. Por un lado, **la corteza**, dividida en dos zonas: **i)** la corteza interna, donde se encuentra el floema conductor, formado por células vivas que se encargan del transporte de nutrientes, **ii)** el floema no conductor, compuesto por células muertas y vivas que tienen principalmente función de almacenamiento. Por otro lado, el **xilema secundario**, es lo que se conoce comúnmente como madera. Para comprender su estructura se deben entender todos sus niveles de complejidad, empezando a nivel macroscópico, microscópico y acabando a nivel molecular.

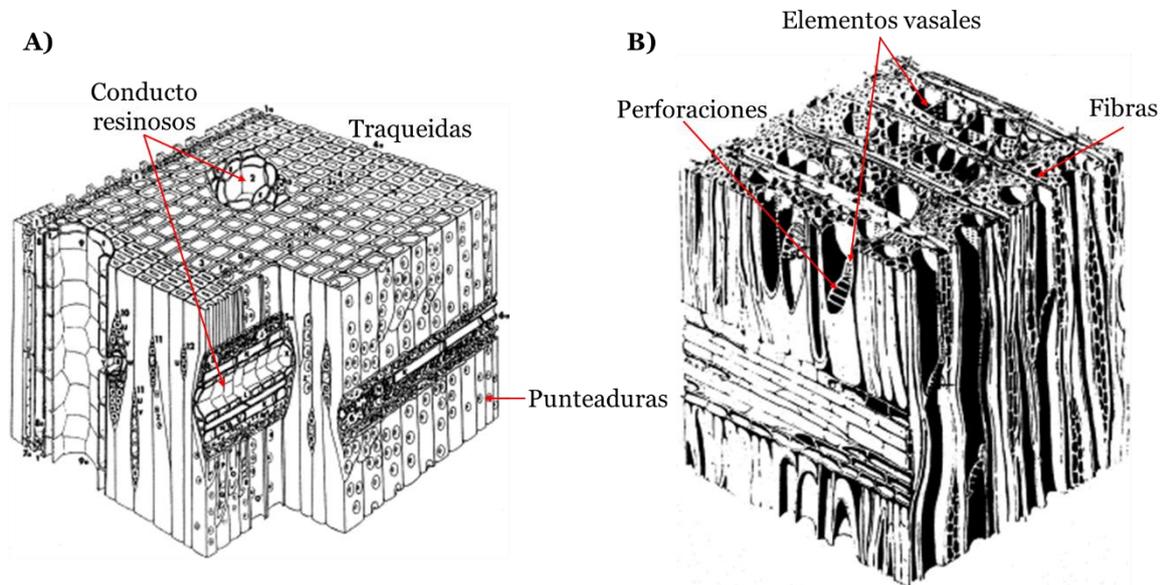


**Figura 1.1. Corteza y xilema secundario de un tilo americano (*Tilia americana*).** La flecha señala la transición de corteza interior a xilema secundario (madera) (Modificado de Evert & Eichhorn 2013).

### 1.1.1. Nivel macroscópico

A nivel macroscópico, dependiendo de las características internas de la madera ésta se puede dividir en dos tipos principales, la “madera blanda” y la “madera dura”. Estos nombres no hacen referencia a la densidad de la madera, sino que más bien clasifican el tipo de madera

según sus características internas, que se relacionan directamente con el tipo de árbol del que vienen. Siendo la **madera blanda** propia de coníferas (familias como Pinaceae, Podocarpaceae, Cupressaceae, Taxaceae, entre otras) y la **madera dura** propia de angiospermas no monocotiledóneas (familias como Lauraceae, Moraceae, Sapindaceae, Rutaceae, entre otras).



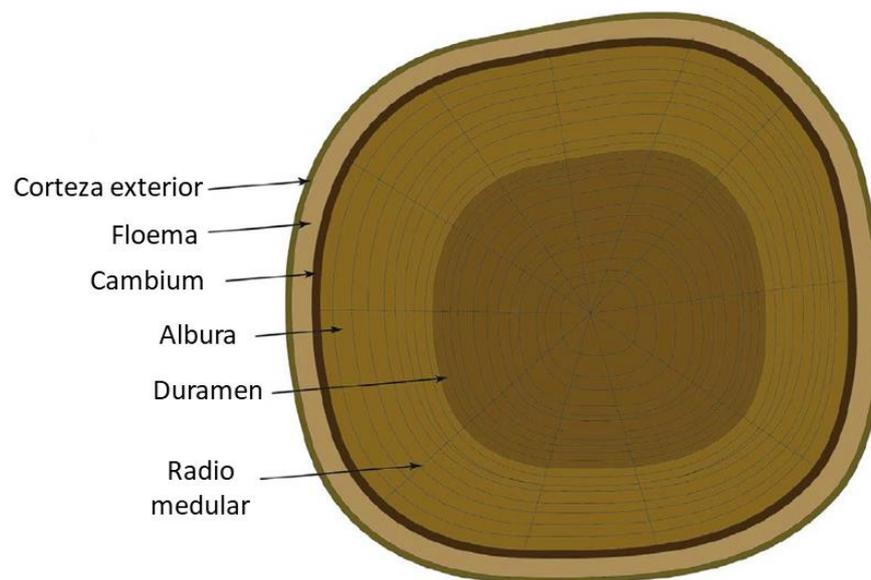
**Figura 1.2. Estructura comparada entre madera blanda y madera dura. A) Madera blanda. B) Madera dura.** Las principales diferencias entre ambos tipos de madera son a nivel celular, la madera blanda estaría formado casi únicamente por traqueidas, mientras que la madera dura contiene más tipos celulares como los vasos conductores y las fibras (Modificada de Howard & Manwiller 1969 y Thunman & Leckner 2002).

La estructura de la **madera blanda** contiene únicamente dos tipos de células. El principal tipo son las largas y estrechas traqueidas, encargadas del transporte de agua en las plantas. Este tipo celular sufre un proceso de muerte programada al madurar, vaciando por completo su protoplasto y eliminando su pared celular primaria. La conexión entre las distintas traqueidas se da a través de unas pequeñas interrupciones en la pared secundaria denominadas punteaduras, estos elementos actúan como canales que conectan las distintas traqueidas. En algunos tipos de coníferas, como en los pinos (*Pinus*), el único tipo de células parenquimáticas del xilema secundario son aquellas relacionadas con los conductos de resina, grandes canales formados por largos espacios intracelulares recubiertos por células parenquimáticas que segregan resina al conducto. Esta resina tiene como objetivo proteger al árbol del ataque de hongos o insectos (figura 1.2.A) (Pallardy, 2008).

En cambio, la estructura de la **madera dura** es algo más variada, con mayor número de tipos celulares. Por un lado, células parenquimáticas con función de almacenamiento de sustancias, como fibras y tejido esclerenquimático, y por otro, los elementos vasales. Estos elementos vasales forman parte de los elementos xilemáticos conductores, siendo los principales en angiospermas e inexistentes en la mayoría de coníferas. Estos elementos están formados por células alargadas denominadas vasos, que al igual que las traqueidas, en su

madurez, carecen de protoplasto. Al contrario que las punteaduras, estos vasos tienen perforaciones principalmente al final de su pared primaria y secundaria, conectando directamente las distintas células y creando largos y continuos elementos vasales (figura 1.2.B) (Pallardy, 2008).

Como se puede observar en la figura 1.3, dentro del xilema secundario se pueden distinguir dos zonas, la **albura y el duramen**. La albura se define como la porción del árbol que contiene células vivas y material de reserva, mientras que el duramen sería la zona del tronco formada a través de la muerte celular programada y la acumulación de sustancias que le dan su característico color oscuro, muchas de estas sustancias están involucradas en la protección del duramen frente a la degradación por agentes bióticos como hongos o insectos.



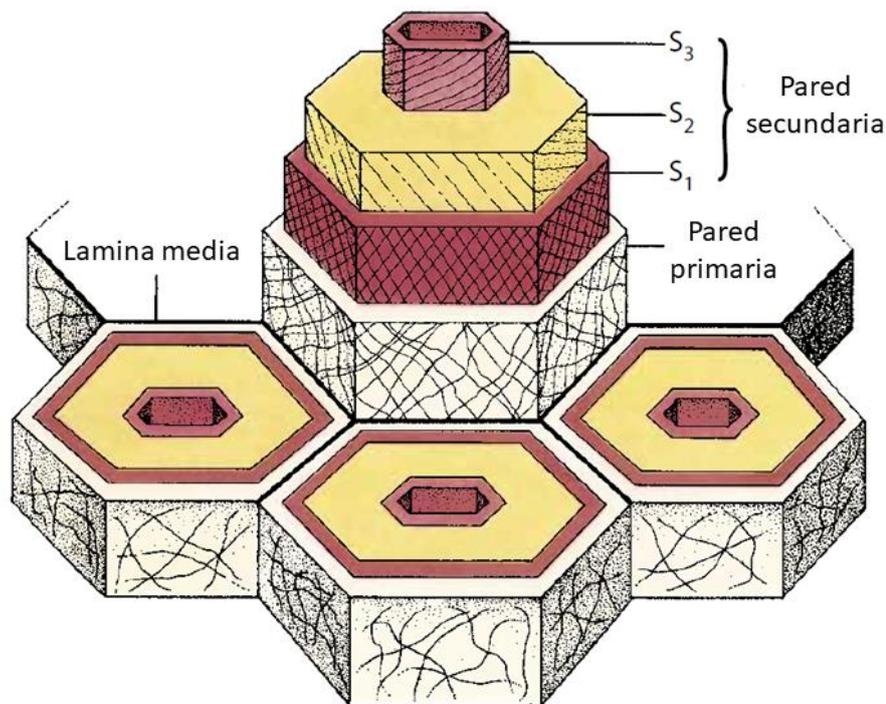
**Figura 1.3: Esquema de la estructura interna del xilema secundario.** Se distinguen las diferentes partes, corteza exterior, floema, cambium y albura que forman parte de xilema secundario todavía vivo y el duramen, caracterizado por su color más oscuro. (Modificado de Ramage *et al.* 2017).

### 1.1.2. Nivel microscópico

Las células vegetales se componen principalmente de dos componentes, **el protoplasto y la pared vegetal**. El protoplasto se define como todo el contenido delimitado por la membrana plasmática, término introducido por el botánico alemán Johannes von Hanstein en 1880 para referirse a toda la célula, excluyendo la pared vegetal (Hanstein, 1880). En el caso de la madera, muchas de las células principales que forman su estructura eliminan completamente el protoplasto al alcanzar la madurez, no encontrándose nada en el lugar donde debería haber estado el protoplasto, que pasa a denominarse lumen. Siendo este lumen el lugar por donde se transporta el agua dentro de la madera. De esta manera, la madera es un material compuesto por aire, el interior del lumen y por los distintos componentes de la pared celular (Rowell, 2005).

La **pared vegetal** es una matriz formada mayormente por carbohidratos que es excretada desde protoplasto al exterior de la membrana plasmática. Esta pared celular es una estructura altamente regular con poca variación entre especies. Está compuesta por tres regiones: **i)** la lámina media, **ii)** la pared primaria, y **iii)** la pared secundaria. Cada región está compuesta por tres componentes mayoritarios: **i)** celulosa, **ii)** hemicelulosa, y **iii)** una matriz o material embebido, que se organizan y distribuyen de forma característica en cada una de las regiones (Evert & Eichhorn, 2013).

Para entender la funcionalidad de la pared celular primero hay que pensar que las células vegetales no suelen existir en soledad, siempre están agrupadas en grandes tejidos u órganos, y de su unión nace su funcionalidad. La unión entre las distintas células vegetales es posible gracias a la **lámina media**. Esta región está compuesta por lo que aporta cada una de las células vegetales que une entre sí, pudiendo unir 2 o más células vegetales al mismo tiempo. Está situada en la región más exterior de la pared vegetal y aunque en células vegetales suele ser rica en peptina, en el caso de la madera suele estar lignificada (figura 1.4) (Rowell, 2005).



**Figura 1.4: Estructura microscópica de las células vegetales.** Se pueden distinguir las distintas estructuras que forman la célula vegetal (Modificado de Evert & Eichhorn 2013).

Inmediatamente después de la lámina media se encuentra la **pared primaria**. Esta pared es la primera en formarse y se caracteriza por ser fina y estar compuesta por microfibras de celulosa en dirección aleatoria (Zamil & Geitmann, 2017).

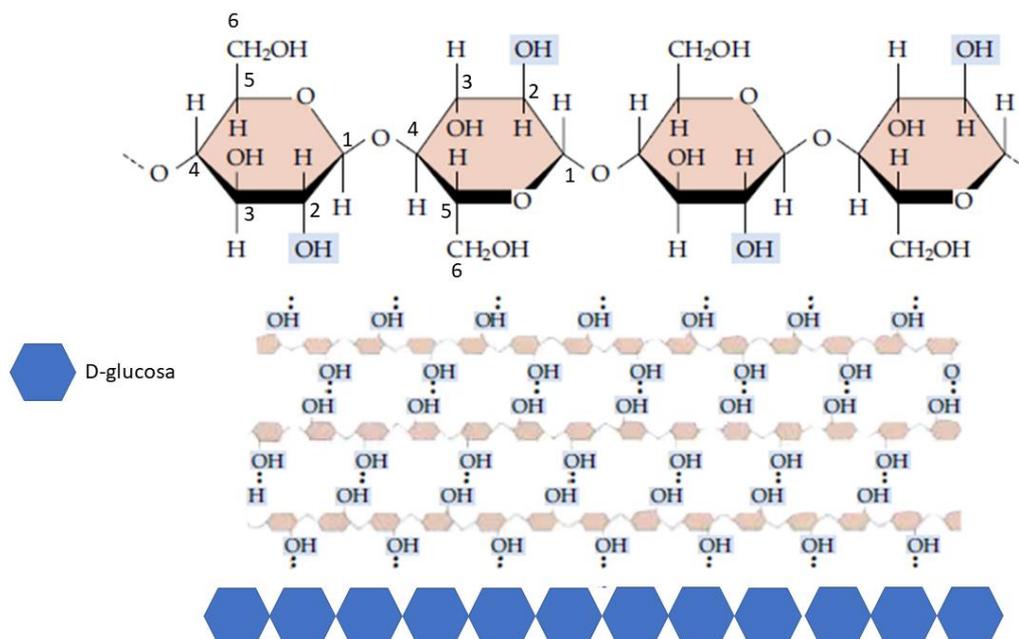
La **pared secundaria** se sitúa después de la primaria y se forma cuando ha terminado el crecimiento de la célula vegetal. Está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y por lignina, con una menor presencia de otras proteínas estructurales o enzimas. Desde fuera, la pared primaria, hacia dentro, el lumen, primero se encontraría la **capa S1**, capa estrecha

donde las microfibras de celulosa se encuentran situadas en forma helicoidal y cruzada. La capa más importante, la **capa S2**, la más gruesa de la pared secundaria y de la que dependen las propiedades macroscópicas de la madera. (Barnett & Bonham, 2004). Por último, la **capa S3** es la menos lignificada de la pared secundaria, este fenómeno responde a un motivo fisiológico, esta sería la última capa, estando en contacto con el lumen, de esta manera la presencia de lignina, molécula muy hidrófoba, dificultaría el movimiento del agua dentro de la planta (figura 1.4) (Barnett & Bonham, 2004; Rowell, 2005).

### 1.1.3. Nivel molecular

Como ultimo nivel de complejidad de la madera aparece el nivel bioquímico. Las diferentes moléculas que forman la madera, así como la importancia de su distribución para las propiedades macroscópicas de la misma han sido comentadas en los anteriores apartados. Las tres moléculas más importantes son: **i)** celulosa, **ii)** hemicelulosa, y **iii)** lignina.

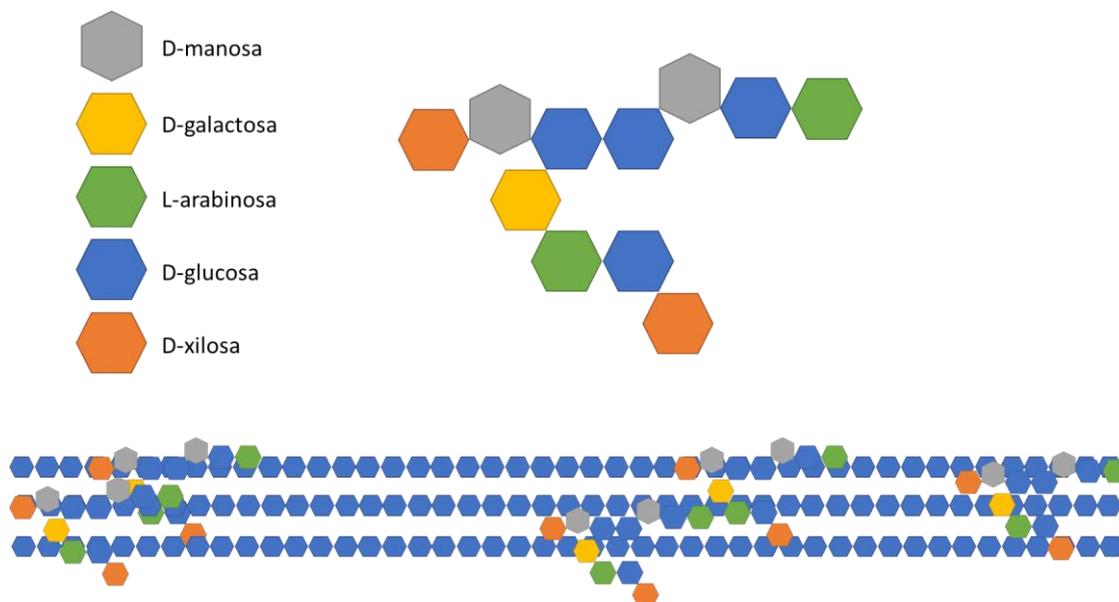
La **celulosa** es la molécula orgánica más abundante de la tierra, es un polímero sindiotáctico lineal formado por anillos de D-anhidroglucopiranosos unidos entre sí por enlaces glucosídicos entre el carbono 1 (C1) de un anillo de piranosos y el carbono 4 (C4) del siguiente anillo (uniones  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4). La unidad mínima que se repite estaría formada por dos moléculas de anhidroglucosa unidas de la anterior manera, y se denomina **celobiosa**, en la cual aparecen las moléculas rotadas 180° la una con respecto a la otra, tal y como se muestra en la figura 1.5 (Lehninger, 2009).



**Figura 1.5: Estructura molecular de la celulosa.** La celulosa está formada por repeticiones de moléculas de D-anhidroglucopiranosos (D-glucosa) unidos a través de enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, haciendo que una de las moléculas de celulosa este rotada 180° con respecto a la siguiente (Modificado de Nelson & Cox 2017).

El número de veces que se repita esta conformación dentro de una cadena de celulosa se denomina el grado de polimerización siendo en la madera en torno a 10.000 y pudiendo elevarse hasta 15.000. Estas cadenas tienen dos extremos distintos; por un lado, en C4 tienen un grupo hidroxilo libre (extremo no reductor) y por el otro lado, C1, un extremo aldehído libre (extremo reductor). Además, durante toda su cadena presentan extremos hidroxilo en los C2, C3 y C6, pudiendo formar puentes de hidrógeno con elementos de la misma cadena, intramoleculares, o entre distintas cadenas de celulosa, intermoleculares. Estos puentes de hidrógeno intramoleculares dan a la cadena de celulosa rigidez, mientras que los puentes de hidrógeno intermoleculares le otorgan la capacidad de unirse a otras cadenas formando fibras (Han & Rowell, 2008). Esta capacidad de empaquetarse en fibras crea regiones cristalinas, las cuales son especialmente habituales en la celulosa presente en la madera (hasta el 65%), y regiones amorfas (Popescu, 2017).

La **hemicelulosa** es un copolímero compuesto por unidades heterogéneas de azúcares, algunos ejemplos son D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa entre otros. Este copolímero está constituido por cortas cadenas de azúcares unidas, siendo el grado de polimerización mucho menor que la celulosa, entre 200-300. Debido a su naturaleza heterogénea estas moléculas, aun siendo únicamente el 15%-30% del peso seco de la madera, contiene el mayor número de grupos hidroxilo reactivos. Por ello, la hemicelulosa funciona como elemento de unión entre la superficie altamente polar de las microfibras de celulosa y la lignina, mucho menos polar, formando puentes de hidrógeno con las microfibras y enlaces covalentes con la lignina (figura 1.6) (Popescu, 2017).

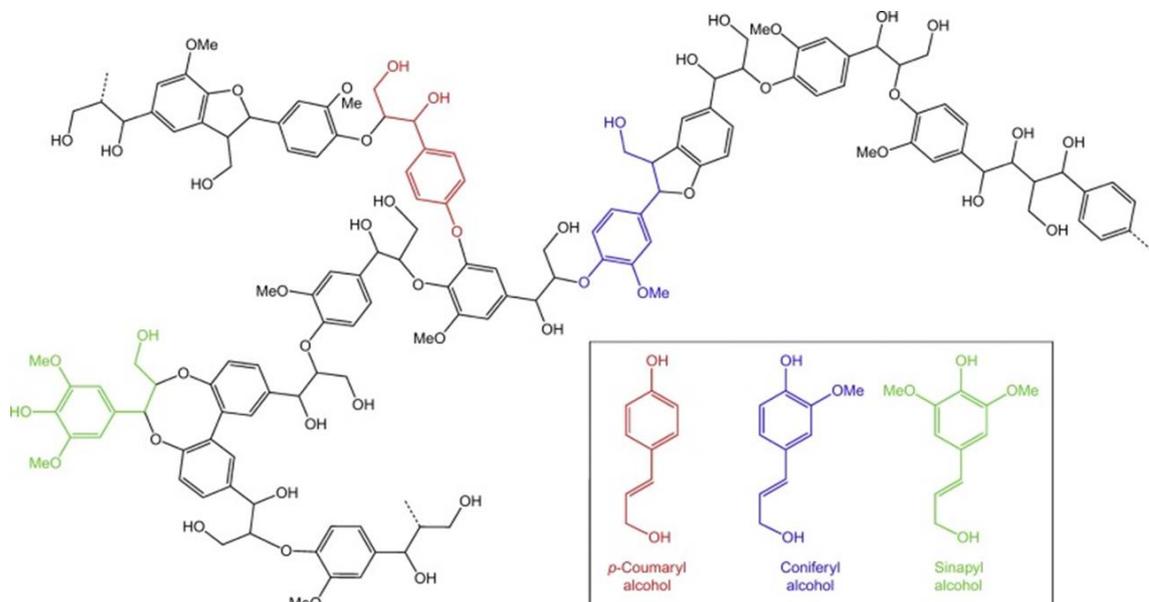


**Figura 1.6: Estructura y función de la hemicelulosa:** La hemicelulosa está formada por repeticiones de varios azúcares distintos formando cadenas de 200 a 300 azúcares.

Las **ligninas** son co-polímeros amorfos, altamente complejos y mayormente aromáticos formados por unidades de fenilpropano que se consideran una sustancia de inclusión dentro de la pared celular. En general, las ligninas provienen de tres monolignoles, el alcohol p-

cumarílico, coniferílico y sinapílico los cuales son modificados por múltiples reacciones enzimáticas hasta convertirse en complejos polímeros de lignina, como se puede ver en la figura 1.7. Dentro de la planta tiene función de sostén estando muy implicadas en el transporte de agua, así como en la defensa de la planta frente a hongos (Evert & Eichhorn, 2013).

Existen diferencias dependiendo del tipo de madera, las ligninas de maderas blandas son derivadas principalmente del alcohol coniferílico y se denominan guaiacil ligninas y suelen suponer del 25% al 35% del peso de la madera. En cambio, las ligninas de maderas duras provienen, además del alcohol coniferílico, del alcohol sinapílico, pasando a denominarse siringil-guaiacil ligninas. Éstas se encuentran en menor proporción en la madera dura, del 18% al 25% del peso de la madera. Las diferencias en la composición de las ligninas son una de las causas de la degradación preferencial por un tipo de hongos u otro durante la pudrición de la madera (Popescu, 2017; Rowell, 2005).



**Figura 1.7. Estructura molecular de la lignina de maderas duras.** La estructura de la lignina de la madera deriva del alcohol coniferílico (azul) y del alcohol sinapílico (verde) formando grandes moléculas de naturaleza mayormente aromática que cumplen funciones de sostén, transporte de agua y defensa de la planta frente a patógenos. En plantas no leñosas también está formada por el alcohol p-cumarílico (rojo) (Modificado de Yue y Economy, 2017).

Por su naturaleza aromática las ligninas han despertado el interés de la industria. La ruptura de este polímero a unidades más simples como ácido ferúlico, vainillina o ácido cumárico a través de procesos enzimáticos puede no solo aprovechar este compuesto, del que se quema el 98%, si no que puede ser usado para la obtención de productos de alto nivel añadido como el ácido ferúlico (Cháves-Sifontes & Domine, 2013).

## 1.2. IMPORTANCIA DE LA MADERA

El 43 % del territorio de la Unión Europea (EU28) está cubierto por superficies boscosas, siendo España el segundo país europeo con más superficies boscosas (27,6 millones de hectáreas), con un 15,2% de la superficies boscosas europeas en su territorio (Eurostat, 2018). Aunque esta tesis se centrara en los productos derivados de los bosques es importante no olvidar la importancia que tienen para la sociedad. Esta importancia no solo radica en su significación económica, que se discutirá más adelante, sino que los propios bosques tienen una importancia fundamental a muchos niveles que afectan a todos los ámbitos de vida de las personas. Algunos de los beneficios se resumen en la tabla 1.

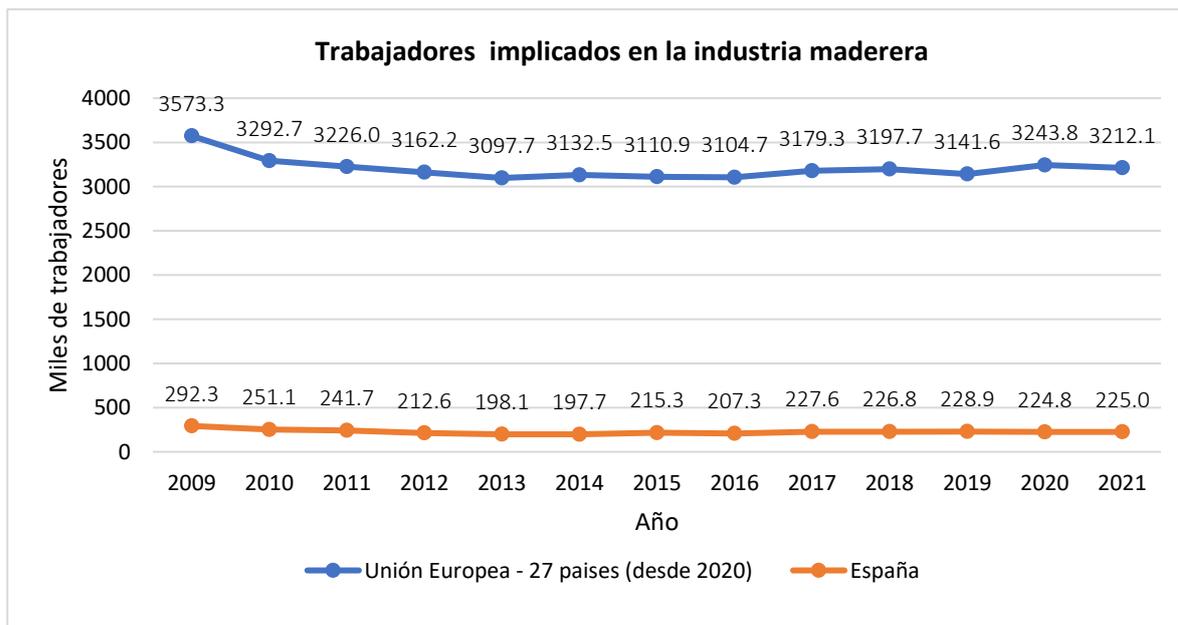
**Tabla 1: Beneficios de los bosques y los árboles en la sociedad.** (Para más información Watson *et al.* 2018).

<b>Recreativos</b>	Bosques y parques pueden convertirse en motores recreativos para mejorar económicamente zonas rurales o urbanas, así como formar parte del patrimonio cultural	(Bell <i>et al.</i> , 2009)
<b>Control de inundaciones</b>	La reforestación de lugares con riesgo de inundaciones no debe ser la única vía de control, aun así, su utilidad para ayudar al control de las inundaciones no debe de ser menospreciada	(Calder & Aylward, 2006)
<b>Salud</b>	Los beneficios de los bosques y parques en la salud engloban desde control de la contaminación acústica, disminución de la polución hasta los beneficios cardiacos y psicológicos de pasear por ellos	(Farrow & Washburn, 2019)
<b>Ecológicos</b>	Estudios recientes muestran que el más mínimo signo de deforestación tiene consecuencias severas en la biodiversidad de un determinado lugar	(Betts <i>et al.</i> , 2017)
<b>Mitigación del cambio climático</b>	Los bosques tienen una importancia capital en el secuestro de las emisiones de carbono a la atmósfera	(Pan <i>et al.</i> , 2011)

### 1.2.1. Importancia económica

En la Unión Europea las industrias que se basan en la madera cubren un rango muy amplio desde grandes compañías de muebles, papeleras hasta industrias de impresión. Todas juntas en 2020 se contaban alrededor de 393 mil empresas, representando el 19% de las empresas de manufactura presentes en Europa (Eurostat, 2020).

Uniéndolo a las actividades de silvicultura y tala en 2021 el número de personas que trabajaban o dependían directamente del sector maderero era cercano a 3,2 millones de trabajadores, siendo en España superior a 225 mil trabajadores (figura 1.8).



**Figura 1.8. Número de trabajadores dedicados a la industria de la madera en la Unión Europea.** (Datos obtenidos de EUROSTAT 2023).

### 1.2.2. Madera como material para la obtención de energía

El consumo de energía global tubo en 2018 el mayor aumento que ha tenido en años, casi doblando el incremento de energía consumida los años anteriores. Este aumento de 2,9% es el más importante desde 2010. El consumo de energía proveniente de combustibles fósiles sigue siendo dominante, pero el aumento de energías renovables muestra la importancia de estas hacia un futuro más ecológico (BPSTATS, 2019, 2020).

Este aumento de las energías renovables coincide con 2 de los 17 de los Objetivos para el Desarrollo Sostenible que la Organización de Naciones Unidas aprobó en 2015;

- **El objetivo 7** “Energía Asequible y No Contaminante” que insta al aumento de las energías renovables, así como a la mejora de su eficiencia (Naciones Unidas, 2020).
- **El objetivo 13** “Acción por el clima” que reclama la acción conjunta de todos los países para la lucha contra el cambio climático (Naciones Unidas, 2020).

Con todo ello, una de las energías renovables usadas actualmente sería la proveniente de biocombustibles sólidos, líquidos o gaseosos derivados de bosques, arboles u otras fuentes de terreno forestal, la denominada dendroenergía. Dentro de este tipo de producción de energía existen dos caminos separados para la transformación de la biomasa en energía.

La **ruta termoquímica** involucraría la transformación de la biomasa a cualquier tipo de energía en presencia de calor y poca concentración de oxígeno. Dentro de este camino existen distintas variantes como puede ser la combustión directa del material, la gasificación o la pirolisis

La **ruta bioquímica** involucraría la conversión del material lignocelulósico en compuestos químicos que puedan utilizarse para la obtención de energía. Estos compuestos pueden ser de distinta naturaleza como alcoholes, etanol, o gases como metano

Una vez el material lignocelulósico ha sido pretratado, tratamiento físico, químico o enzimático en el que se busca romper las moléculas que forman la biomasa lignocelulósica para poder acceder a los residuos de su interior, y los residuos de celulosa y hemicelulosa han sido liberados de la matriz lignocelulósica, estos deben de ser degradados a sus componentes más básicos, para que puedan ser usados para generar combustibles renovables. El proceso de hidrolisis de la celulosa y hemicelulosa a mono y disacáridos más simples se denomina sacarificación y puede ser llevado a cabo a través de reacciones químicas violentas, tales como la hidrolisis ácida o la hidrolisis alcalina o a través de hidrolisis enzimáticas.

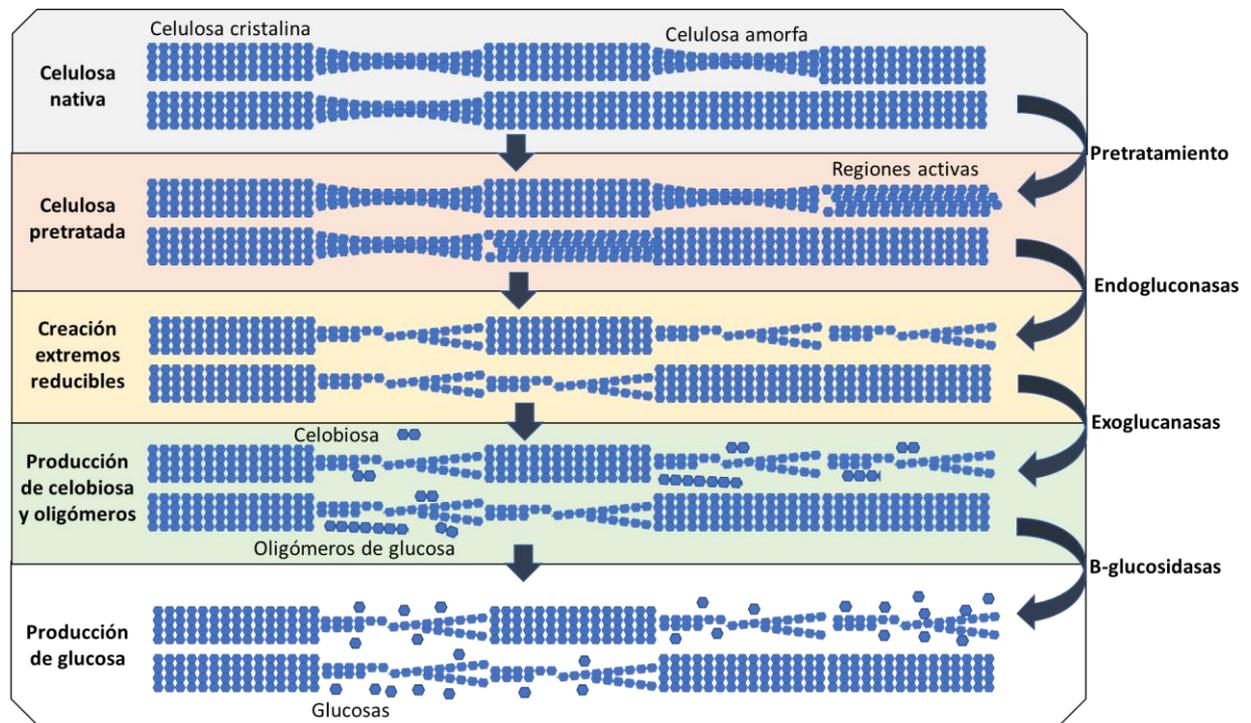
Las reacciones violentas son capaces de conseguir una hidrolisis alta de los polímeros de celulosa pero sufren de varias desventajas como la corrosión de los equipos al estar en contacto a altas temperaturas junto con ácidos y bases fuertes (Sun & Cheng, 2002), o la aparición de sustancias de desecho que son capaces de inhibir la acción de los microorganismos que se necesitaran en los siguientes procesos (Hans *et al.*, 2019).

La **hidrolisis enzimática** se basa en las distintas actividades de las enzimas celulolíticas, resumidas en la figura 1.9. Las endoglucanasas ( $\beta$ -1,4 endoglucano hidrolasa) son capaces de entrar en las zonas poco cristalinas de los polímeros de glucosa y romperlos en cadenas más cortas. Una vez se han roto, las exoglucanasas (1,4- $\beta$ -celobiohidrolasa) pueden romper desde los extremos de las cadenas de celulosa extrayendo de ellas unidades de celobiosa (dos unidades de glucosa unidas). Por último, la  $\beta$ -glucosidasas son capaz de descomponer las celobiosas en unidades de glucosa, que ya serian asimilables por microorganismos durante la fermentación. La hidrolisis de los polímeros de hemicelulosa resulta más difícil por su naturaleza heterogénea, y por ello se necesitan mezclas de enzimas con actividades complementarias que se agrupan con el nombre de hemicelulasas (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Numerosas especies de hongos y bacterias han sido analizadas durante los años por su capacidad para producir celulasas y hemicelulasas. Entre las bacterias se ha demostrado que pueden tener esta capacidad los géneros *Acetovibrio*, *Anoxybacillus*, *Anaerocellum*, *Acidothermus*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Geobacillus*, *Fervidobacterium*, *Fibrobacter*, *Hallocella*, *Microbispora*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Thermonospora*, *Therobifida*, *Rhodothermus*, *Ruminococcus*, *Salinivibrio* y *Streptomyces* (Sarsaiya *et al.*, 2019; Taherzadeh & Karimi, 2007).

De todos modos, los hongos por su mayor capacidad de producción son los principales productores de estas enzimas. Numerosas especies de hongos son capaces de producir celulasas, entre ellas *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* han sido las especies más importantes en la producción de celulasas a nivel industrial. Estas especies cuentan con la ventaja de ser altamente productivas, seguras para trabajar a nivel industrial y sus genomas

están completamente secuenciados, facilitando cualquier intervención genética (Idris *et al.*, 2017).



**Figura 1.9. Proceso de sacarificación del material celulósico para conseguir azúcares.** El tratamiento secuencial de la biomasa lignocelulósica a través de reacciones enzimáticas consigue extraer las moléculas de glucosa que se usaran para la obtención de energía.

Aunque el mercado de las enzimas celulolíticas ha estado completamente dominado por *Trichoderma* y *Aspergillus* se ha demostrado que existen otros géneros que puede ganarles terreno. Así, el género *Penicillium* ha demostrado ser un gran productor de celulasas subsanando la gran carencia de *Trichoderma* de ser deficiente en  $\beta$ -glucosidasas (Ortega *et al.*, 2001). Otros, como el género *Alternaria* son capaces de producir una gran cantidad de enzimas, además de celulasas, como xilanasas o cutinasas, permitiendo una degradación más completa de la pared vegetal (García-Calvo *et al.*, 2018).

El último proceso que se llevaría a cabo para convertir el material lignocelulósico en biocombustibles sería la fermentación del hidroxilado. En este punto contamos con una mezcla compleja de moléculas extraídas del material lignocelulósico, generalmente hexosas como la D-glucosa obtenidas de la celulosa, pentosas como la xilosa extraídas de la hemicelulosa y moléculas de distinta clase como compuestos aromáticos y fenólicos, ácidos alifáticos, furfural y otros compuestos inorgánicos (Jönsson *et al.*, 2013).

Para su conversión a alcoholes que puedan ser utilizados como biocombustibles hace falta un proceso de fermentación en el cual están involucrados distintos microorganismos dependiendo del producto final que se quiera obtener. Para la transformación de hidroxilado a bioetanol se necesitaría la fermentación alcohólica de los monosacáridos presentes. Para ello la levadura más usada industrialmente ha sido *Sacharomyces cerevisiae* que es capaz de

convertir las hexosas presentes en el hidroxilado en etanol. Sin embargo, *S. cerevisiae* carece naturalmente de las enzimas para la conversión de las pentosas, por ello, se ha intentado introducir estas enzimas dentro de *S. cerevisiae* a través de manipulación genética (Lopes *et al.*, 2017), o realizar una co-fermentación con especies capaces de transformar las pentosas, como diversas especies de *Candida* o *Komagataella (Pichia)* (Mohd Azhar *et al.*, 2017).

---

---

### 1.2.3. La madera como material de construcción

La madera se ha venido usando como material de construcción desde el inicio de la civilización, su bajo peso en relación a su resistencia permite que las estructuras construidas en madera aguanten su propio peso mejor que otros materiales tan usados como el acero, además, la hacen apropiada para lugares con alta actividad sísmica. Por otro lado, la resistencia a la electricidad y al calor que presenta la madera confieren estabilidad a los edificios acabados, ya que sus dimensiones o resistencia no se ven afectadas por los cambios de temperatura (Ramage *et al.*, 2017).

En esta nueva era donde la conciencia ecológica se está haciendo hueco en la sociedad, la construcción con materiales que provengan de fuentes renovables, como es la madera, está cogiendo peso con el paso de los años. Esta implementación de los edificios de madera responde a motivos de naturaleza económica como es el ahorro de costes que supone las construcciones en madera. Y a otros de naturaleza ecológica, ya que la construcción en madera ha demostrado ser medioambientalmente sostenible, ya sea por el secuestro de carbono en los edificios construidos de madera, o porque la huella de carbono generada en la producción de esta madera para construcción es menor que la generada con la construcción en cemento o acero (Churkina *et al.*, 2020).

---

---

## 1.3. PROTECCIÓN DE ESTRUCTURAS DE MADERA

Una de las principales deficiencias de la madera es su **biodegradabilidad**, al ser un biopolímero, las moléculas que lo forman están expuestas a una progresiva degradación oxidativa. Esta degradación viene dada por **factores abióticos** como puede ser la radiación UV, abrasiones por el viento, cambios de temperatura y humedad que afectarían a su durabilidad. Además, estas inclemencias abióticas permitirían la entrada de microorganismos degradadores de la madera, los cuales ya son capaces de degradarla a nivel interno, debilitando la estructura (Teacă *et al.*, 2019).

Por ello, la protección de la madera es un tema tan antiguo como su uso. Esta protección busca mejorar sus propiedades incrementando su resistencia al fuego, a los rayos UV o a la degradación, así como incrementar sus propiedades mecánicas. Como describió Ramage *et al.* (2017) todos estos tratamientos están dirigidos a:

- **Reducir la entrada de agua dentro de la madera.** Como la madera es un material capaz de captar agua y humedad muchos de los tratamientos usados

buscan aumentar su hidrofobicidad o detener la entrada de agua a través de recubrimientos o con compuestos intercalantes.

- **Secuestrar los grupos hidroxilos** activos dentro de la madera para que los hongos no sean capaces de degradarlos.
- **Impregnación de la madera con sustancias antifúngicas** que permitan eliminar a los hongos degradadores de la madera.
- **Recubrimientos** que aumenten la capacidad de la madera para resistir al fuego, a la degradación, a la humedad o a la radiación UV.

Para conseguir estos objetivos se están usando principalmente tres estrategias resumidas en la figura 1.10, que son: **i)** la impregnación de la madera con sustancias químicas, **ii)** la modificación de la madera a través de tratamientos físicos o químicos, y **iii)** los recubrimientos que aumenten sus capacidades.

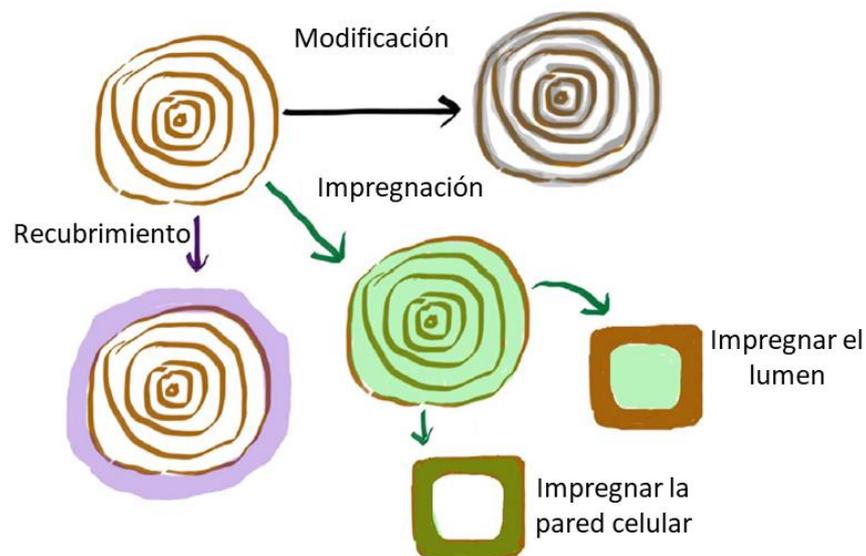


Figura 1.10. Diagrama que muestra las diferentes estrategias usadas para la protección de la madera (Modificado de Ramage *et al.* 2017).

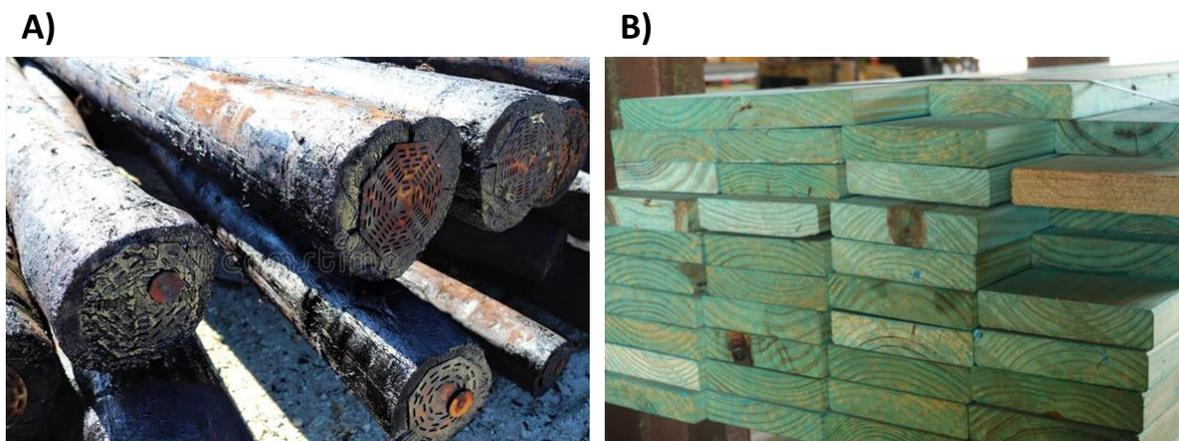
### 1.3.1. Impregnación de la madera

La **impregnación** de la madera con sustancias que aumenten su durabilidad, o su resistencia ha sido el método más usado de protección de la madera en la historia. Este proceso se consigue a través la inclusión del compuesto preservador en la madera por medio de varios sistemas como difusión, capilaridad o altas presiones, dos ejemplos de impregnaciones usadas en la protección de la madera frente a la degradación se pueden ver en la figura 1.11.

Los compuestos más usados a lo largo de los años son aquellos derivados del cobre y del arsenito entre los que se destaca arseniato de cobre cromado (CCA) patentado por S. Kamesam en 1938 (Freeman *et al.*, 2003). Este compuesto fue aplicado en Estados Unidos en el 80% de la madera tratada para fines domésticos y no domésticos a finales del siglo 20. Sin embargo, debido a las restricciones derivadas de su toxicidad, tanto el arsénico como el cromo

hexavalente son reconocidos carcinógenos humanos, su uso se restringió en 2003 por la Comisión Directiva de la Unión Europea 76/769/EEC (European Union, 2003; Mohajerani *et al.*, 2018).

Actualmente se están usando soluciones protectoras de la madera derivadas de los compuestos anteriormente mencionados, que siendo altamente efectivas tienen menos efectos adversos. Algunos ejemplos, que no están faltos de limitaciones, son “bis-(N-cyclohexyldiazeniumdioxo)-copper” (Cu-HDO), peligroso para ambientes acuáticos y los azoles de cobre (CA), donde el polvo derivado de este producto puede causar daños en el sistema respiratorio (Schultz *et al.*, 2007; Sisler *et al.*, 2019). Aun así, en la actualidad existen soluciones viables y poco perjudiciales como son el cobre cuaternario alcalino (ACQ: *Alkaline Copper Quaternary*) (Edlich *et al.*, 2005).



**Figura 1.11. Ejemplos de impregnaciones de la madera. A)** La impregnación con creosota aumenta la durabilidad, pero confiere a la madera una indeseada inflamabilidad, usado en vías ferroviarias o postes marinos. **B)** La impregnación con arseniato de cobre cromado (CCA) confiere a la madera un característico color verde.

### 1.3.2. Modificación de la madera

La **modificación térmica** de la madera se remonta a principios del siglo 20 cuando se vio que secar la madera a altas temperaturas disminuía su humedad de equilibrio (la cantidad de humedad en el que un material higroscópico no pierde ni gana más humedad). Esta técnica consiste en el tratamiento de la madera a temperaturas entre 160°C y 260°C en presencia o no de distintos tipos de gases o aceites. Este tipo de modificación de la madera produce cambios químicos en la estructura interna de la madera como: **i)** la degradación y deshidratación de las hemicelulosas, eliminando grupos reactivos, **ii)** la degradación de la celulosa amorfa con un aumento de la proporción de la celulosa cristalina, y **iii)** la policondensación de la lignina aumentando la capacidad intercalante. Todo esto se traduce en maderas con más estabilidad dimensional, más resistencia al ataque de hongos saprófagos y menos humedad de equilibrio (Esteves & Pereira, 2009).

Por otro lado, la **modificación química** de la madera usa los grupos reactivos dentro de las moléculas que forman la madera para aumentar estas propiedades. Los principales grupos

reactivos que se encuentran en la madera son los hidroxilos presentes en los tres componentes principales que la forman (celulosa, hemicelulosa y lignina), estos grupos son los responsables de la afinidad de la madera por el agua y de su reactividad. Por ello, muchas estrategias para la protección de la madera se han basado en la modificación química de estos grupos hidroxilo a través de reacciones de esterificación o alquilación. Entre ellas la más estudiada, y una de las pocas que están presentes en el mercado, es la acetilación de la madera. Esta acetilación ha demostrado que aumenta la resistencia a la degradación debida a termitas y microorganismos, así como disminuye la foto-descoloración de la madera (Gérardin, 2016; Mantanis, 2017).

### 1.3.3. Recubrimientos protectores de la madera

El **recubrimiento de la madera** con compuestos y sustancias puede aumentar sus capacidades, así como la protegerla de la degradación. Esta estrategia no es incompatible con las estrategias anteriormente mencionadas, existiendo sistemas complejos en los que se combinan varios métodos para una mayor protección, o para otorgarle a la madera de características útiles para su servicio.

Un recubrimiento se define como un compuesto, líquido o pasta que al aplicarlo a un sustrato forma una capa que otorga propiedades protectoras, estéticas o de otra naturaleza (ISO 4618:2014). Esta definición resalta dos elementos, el primero es la aparición de una capa sobre el sustrato, que puede ser de distinta naturaleza y otorgar distintas propiedades. Y el segundo, es la forma de aplicación, si el material que formara el recubrimiento debe de ser aplicado sobre la madera en algún momento este material ha tenido que adoptar un estado líquido, y este paso de líquido a sólido es fundamental en la formulación y producción de recubrimientos (Bulian & Graystone, 2009).

### 1.3.4. Nuevas alternativas para la protección de la madera

Las limitaciones derivadas de la toxicidad de los principales métodos de protección de la madera han abierto un nuevo horizonte a productos naturales poco perjudiciales para la salud y el medio ambiente, por ejemplo, los **extractos de plantas** y los **aceites esenciales**. Numerosas investigaciones han destacado el uso de aceites como los procedentes del anís, la albahaca, el comino, el orégano y el tomillo contra hongos de la degradación parda y blanca (Pánek *et al.*, 2014; Voda *et al.*, 2003). También se ha demostrado la utilidad de otras partes de la madera, como los taninos procedentes de la corteza de mimosa (*Acacia mollissima*) o del quebracho (*Schinopsis lorentzii*), así como, los extractivos derivados de maderas poco degradables como la teca (*Tectona grandis*) para inhibir el crecimiento de hongos degradadores de la madera (Brocco *et al.*, 2017; Rodríguez Anda *et al.*, 2019; Tascioglu *et al.*, 2013).

Otras de las estrategias que se están usando para evitar la degradación de la madera es la utilización de **microorganismos** que naturalmente inhiban el crecimiento de los hongos

degradadores. Este procedimiento es ampliamente conocido en otros campos como es la agricultura donde se llevan años aplicando bacterias como *Bacillus thuringiensis* u hongos como *Trichoderma harzianum* para el control de enfermedades y plagas que afectan a los cultivos (Chauhan *et al.*, 2018; van Lenteren *et al.*, 2018). El uso de distintas especies de *Trichoderma* para proteger la madera ha sido estudiado revelando el alto potencial inhibitorio contra distintos hongos como *Neolentinus lepideus*, *Rhodonía placenta* y *Antrodia carbonica* (representantes de la podredumbre parda), entre otros. (Bruce *et al.*, 1991; Morrell & Sexton, 1990; Ribera, Fink, *et al.*, 2017; Ribera, Gandía, *et al.*, 2017).

El uso de bacterias para evitar la degradación de la madera también se ha estudiado. Así, el género *Streptomyces* ha sido analizado en relación a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos degradadores de la madera, teniendo algunos ejemplos exitosos como *Streptomyces exfoliatus* MT9 que tiene efecto frente a 7 hongos degradadores de la madera (Sharma *et al.*, 2016). Otros géneros, como *Bacillus*, han sido estudiados ampliamente por su capacidad de producir tanto compuestos como enzimas que inhiben el crecimiento de los hongos. Estos han demostrado su capacidad de antagonizar el desarrollo de hongos degradadores de madera, Así, *Bacillus subtilis* B1 es capaz de inhibir el crecimiento de un hongo que causa efectos cromógenos en la madera (*Lasioidiplodia theobromae*) (Kumar & Gupta, 2006; Sajitha *et al.*, 2018; Susi *et al.*, 2011).

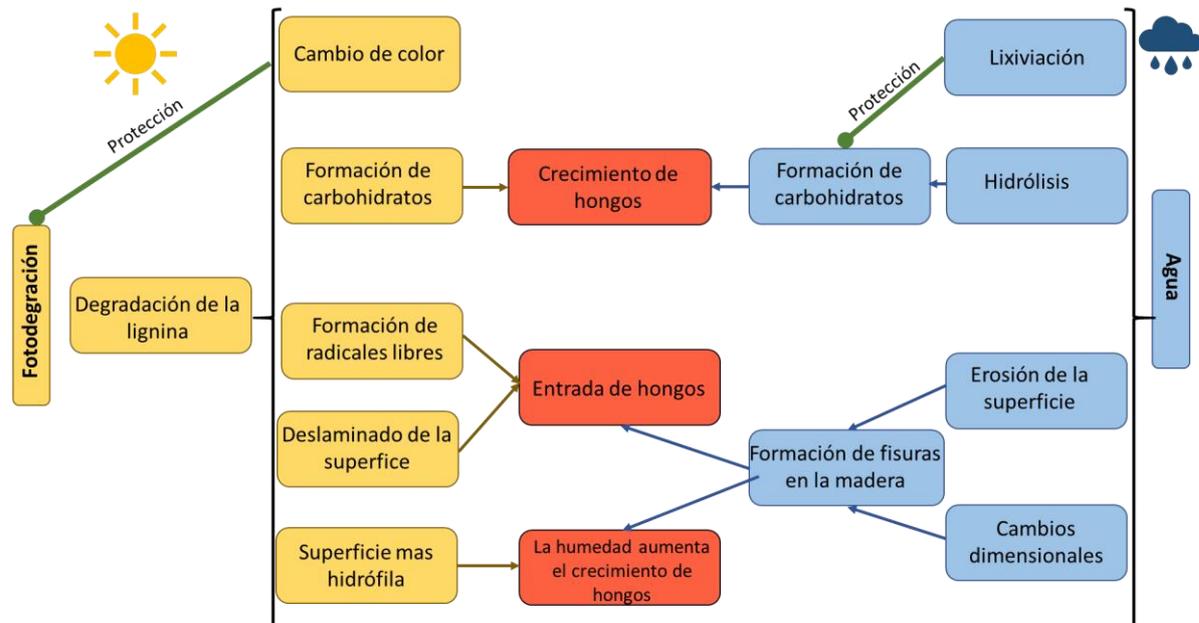
## 1.4. LA DEGRADACIÓN DE LA MADERA

### 1.4.1. Agentes abióticos

La degradación de la madera es un proceso complejo donde están involucrados múltiples factores que producen cambios a nivel físico, químico y mecánico. Los cambios a nivel químico producen variaciones en la microestructura de la madera, afectando a sus propiedades físicas y mecánicas. Las primeras fases del proceso de degradación se deben a motivos abióticos, como son la luz ultravioleta (UV) o la lluvia.

La **fotodegradación** comienza cuando la madera es puesta en contacto con la luz solar, desde este momento se van produciendo sucesivas reacciones en su superficie que implican desde cambios de color hasta la erosión de la misma. Este proceso empieza con la degradación de los compuestos aromáticos presentes en la lignina. Esta degradación lleva a tres consecuencias: **i)** descenso de hidrofobicidad de la madera aumentando su capacidad de absorber agua; **ii)** formación de radicales libres que reaccionaran con los demás componentes de la madera creando un amarillamiento de la superficie de la madera y la degradación de sus componentes; y **iii)** desaparición de la lignina, el pegamento que une las distintas moléculas vegetales, produciendo la disminución de la cohesión entre las células de la madera, que llevaría al deslaminado de estas (figura 1.12) (Bejo *et al.*, 2019; Cogulet *et al.*, 2018; Teacă *et al.*, 2019).

Por otro lado, la **lluvia** ejerce su acción en la degradación a través de otras reacciones. La madera al ser un material higroscópico es capaz de absorber la humedad del medio donde se encuentra. Los cambios derivados del estrés por el cambiante contenido hídrico de la madera pueden llevar a daños en su estructura, por ejemplo, grietas en la superficie. Además, el agua por su efecto disolvente es capaz de arrastrar los componentes degradados por la luz UV aumentando así su degradación. En la figura 1.12 se resumen los principales motivos y consecuencias de la degradación abiótica (Bejo *et al.*, 2019; Hon, 1994).

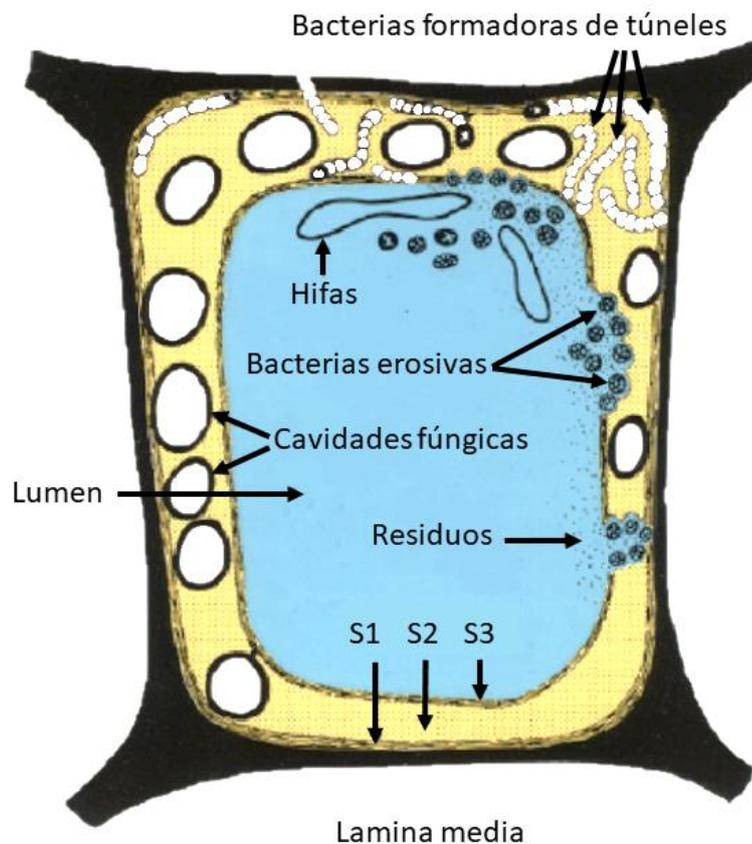


**Figura 1.12. Esquema representativo de los daños en la madera por agentes abióticos.** A la izquierda en amarillo se presentan las consecuencias en la madera por efecto de la fotodegradación, a la derecha en azul los daños producidos en la madera por el agua, y en rojo en el centro las consecuencias de ambos efectos abióticos (Modificado de Cogulet, Blanchet, & Landry 2018).

### 1.4.2. Bacterias degradadoras de madera

Las bacterias son capaces de obtener energía de un gran número de moléculas orgánicas, por ello, pueden encontrarse en cualquier lugar, siendo ubicuas. Debido a esta capacidad de poder obtener energía de casi cualquier elemento es lógico pensar que pueden extraerla también de la madera en degradación. Aunque los protagonistas principales de la degradación de la madera son los hongos, las bacterias son capaces de usar componentes de la pared vegetal como fuente de alimento, siendo a su vez, capaces de resistir altas concentraciones de sustancias tóxicas y de erosionar la madera en situaciones de anoxia. Por ello, las bacterias están especialmente vinculadas a la degradación de estructuras de madera históricas que se han conservado en condiciones con bajas concentraciones de oxígeno, por ejemplo, aquellas que han permanecido largas temporadas bajo el agua, como barcos (Cha *et al.*, 2014; Klaassen, 2008).

Las bacterias se pueden dividir según sea el mecanismo que usen para degradar la madera. Por un lado, estarían las **bacterias formadoras de túneles (BFT)** y por otro, las **bacterias erosivas (BE)**, ambas representadas en la figura 1.13. Aunque se conoce su capacidad desde hace años la taxonomía de los grupos de bacterias relacionados con la degradación sigue siendo objeto de debate, habiéndose consensuado que son bacterias mayormente anaerobias o aerobias facultativas que actúan en grandes consorcios. Dentro de estos, se han logrado identificar algunas especies como *Microbacterium luteolum* o el género *Cytophaga* (Nilsson & Björdal, 2008; Nilsson & Daniel, 1992).



**Figura 1.13. Ilustración representativa de los patrones seguidos por las bacterias degradadoras de la madera.** Se puede apreciar las distintas formas de degradación de la madera, por un lado la degradación fúngica donde se crean grandes cavidades por la acción de los hongos, y por otro, la degradación bacteriana con sus diferentes formas, bacterias formadoras de túneles y bacterias erosivas (Modificado de Singh 2012).

Las **bacterias formadoras de túneles** atacan la célula vegetal a través del lumen. Estas degradarían en primer lugar una zona de entrada en la capa S3, pasando de esta manera a la capa S2. La característica principal de estas bacterias sería su capacidad para crear túneles por donde van degradando la célula vegetal con una estructura que está vinculada al comportamiento de las bacterias. El avance se da de manera intermitente, dejando una formación característica a su paso, túneles con bandas. Estas bacterias se multiplican dentro de los túneles que han formado, creando una estructura en forma de roseta desde el punto inicial de entrada. Además, estas bacterias son capaces de degradar todas las capas de la pared

vegetal, independientemente de la cantidad de lignina presente, avanzando en cualquier dirección. Estas características únicas de formación de túneles les han otorgado a estas bacterias la capacidad de conseguir nutrientes sin entrar en competencia con otras bacterias u hongos presentes en la madera (Singh, 2012; Singh *et al.*, 2016, 2019).

Las **bacterias erosivas** son capaces de degradar el material lignocelulósico en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, por ello son las principales responsables de la degradación de maderas que han estado en condiciones subacuáticas. Su medio de acción, al igual que las bacterias formadoras de túneles, empieza en el lumen degradando la pared celular de una forma gradual, avanzando únicamente en la dirección que dicta el eje de las microfibras de celulosa, como indica la orientación paralela de los canales formados por estas bacterias con el eje largo de las microfibras. La degradación se produciría en las diferentes capas de la pared celular hasta llegar a la altamente lignificada lámina media, donde este tipo de bacteria se detendría, ya que no son capaces de degradarla, como apuntan restos arqueológicos subacuáticos, donde la única parte restante de la celular vegetal fue la lámina media (Cha *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). Por último, estas bacterias dejan a su paso grandes cantidades de residuos principalmente de naturaleza lignocelulósica (Singh *et al.*, 2019).

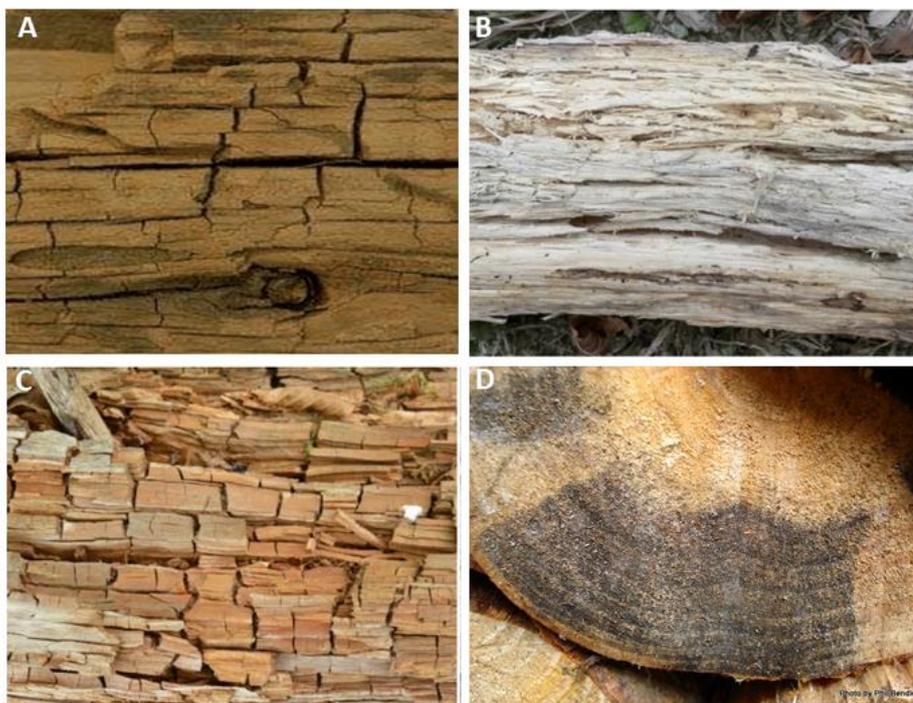
## 1.5. LA DEGRADACIÓN POR HONGOS

La relación de los hongos con la degradación de la madera es posterior a la aparición de los primeros árboles en el periodo Devónico medio hace 385 millones de años. Durante esta etapa se da la aparición de las primeras plantas arborescentes, y con ello la aparición de la lignina como agente intercalarte que permitió a los primeros arboles crecer más altos que las plantas existentes en ese momento (Stein *et al.*, 2007). Millones de años más tarde se dio la aparición de los primeros mecanismos capaces de degradar completamente esta matriz lignocelulósica, siendo aquellos Agaricomycetes iniciales los antecesores de los actuales hongos degradadores de madera (Eastwood, 2014; Floudas *et al.*, 2012).

En general los hongos llegan hasta la madera a través del aire, masas de agua o animales que transportan las esporas o hifas de micelio (Brischke & Alfredsen, 2020; Huffman *et al.*, 2013; Jacobsen *et al.*, 2017). En ese momento, y si las condiciones de temperatura y humedad son propicias, las esporas o fragmentos de hifas se desarrollarán entrando dentro de la microestructura de la madera, donde son capaces de crecer y desarrollarse. Una vez el hongo ha crecido ya está listo para activar los distintos mecanismos para la degradación de la pared celular o para la producción de metabolitos secundarios cromogénicos. Esta primera fase es común a las diferentes formas de degradación de madera, pero en este punto los distintos mecanismos degradativos se diferenciarían según la maquinaria enzimática, los efectos y las consecuencias para la madera (Goodell *et al.*, 2020; Pournou, 2020).

Aunque se ha visto que las formas clásicas de distinción de las especies degradadoras de madera están actualmente en entredicho, y que existen ejemplos de mecanismos cruzados entre las distintas formas de degradación, la categorización clásica sigue siendo útil para el

entendimiento de los mecanismos involucrados en la descomposición de la madera (Riley *et al.*, 2014). Esta clasificación separa la degradación de la madera en tres formas: **degradación parda**, la **degradación blanca** y la **degradación blanda** (figura 1.14). Además, por su importancia en la industria maderera, se incluye un cuarto grupo en el cual no se produce descomposición de los elementos de la madera, en cambio, ésta se tiñe por acción de hongos cromógenos, denominándose **decoloración de la madera** (Schmidt, 2006).



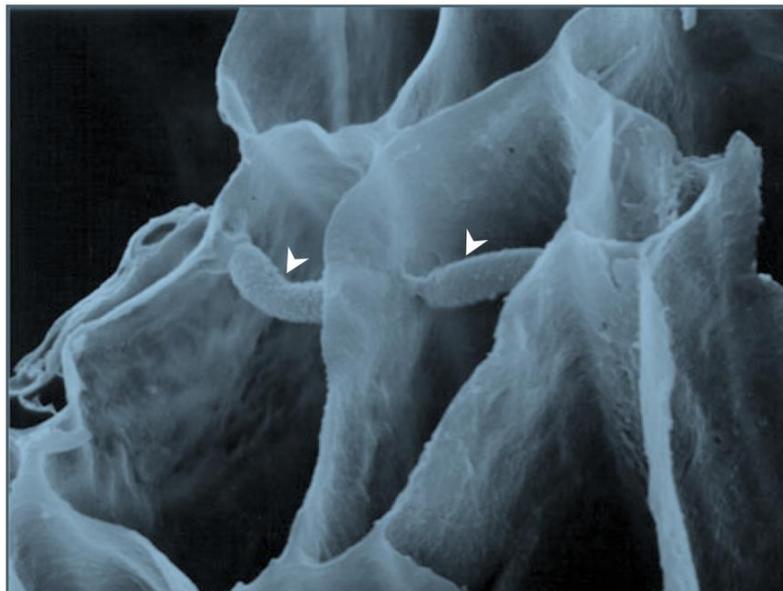
**Figura 1.14. Degradación de la madera por hongos.** **A)** Degradación blanda, la pérdida de la celulosa dentro de la madera la vuelve más frágil siendo proclive a despedazarse con facilidad. **B)** Degradación blanca, se aprecia el color blanco característico al eliminar todos los componentes de la pared celular. **C)** Degradación parda, la modificación de la lignina otorga a la madera degradada de un color parduzco. **D)** Decoloración de la madera, se puede observar los depósitos de sustancias cromógenas en el interior del lumen de la madera afectada. (Modificado de Srivastava, Kumar, & Singh 2013).

### 1.5.1. Degradación blanda

La degradación blanda de la madera está causada por más de 400 especies de hongos ascomicetos presentes en todo el mundo (Pointing & Hyde, 2000). Todos estos hongos tienen en común la capacidad de degradar tanto la celulosa como la hemicelulosa, mientras que la degradación de la lignina, aunque se da, es menos común. La capacidad de degradación de los elementos hidrocarbonados de la pared vegetal está mediada por sistemas de celulasas y hemicelulasas. Estos sistemas dan la capacidad a este tipo de hongos de entrar en regiones concretas de la pared celular y producir enzimas de forma controlada, siendo esto lo que les diferencia de la degradación blanca y parda.

La degradación blanda está muy condicionada por diversos factores como:

- **Humedad:** estos hongos están relacionados con ambientes muy húmedos. Gran número de hongos causantes de la degradación blanda se han encontrado en ambientes acuáticos, tanto marinos como fluviales. Además, suele estar relacionado con las capas superficiales del suelo, donde existe más humedad (Daniel, 2014).
- **Oxígeno:** los ascomicetos que causan la degradación blanda son capaces de crecer en condiciones de menor cantidad de oxígeno que los basidiomicetos causantes de la degradación blanca y parda. Por ello, son responsables de la degradación en condiciones de relativa anoxia, como por ejemplo en madera presente en las torres de refrigeración del agua (Singh & Wakeling, 1997).
- **Sustrato:** el tipo de madera, así como la especie y hasta la distribución de las fibras de celulosa dentro de la madera afectan a la capacidad que tienen estos hongos para degradarla. Las maderas duras son menos resistentes que las maderas blandas, esto responde a la cantidad y el tipo de lignina presente en cada tipo de madera. Se ha visto que una gran parte de los ascomicetos degradadores de madera únicamente son capaces de degradar las unidades de siringil dentro de la molécula de lignina. Además, la cantidad de lignina también afecta en la degradación, siendo las partes de la pared celular con mayor contenido en lignina, como la lámina media, las menos degradadas (Pournou, 2020).



**Figura 1.15. Imagen SEM de penetración activa.** La hifa penetra transversalmente en la célula adyacente a través de un *transpressorium*, señalado con punta de flecha blanca. (Modificado de Pournou 2020).

Los mecanismos de colonización son distintos entre especies y sobre todo entre maderas duras y maderas blandas, pero aun así los mecanismos de entrada son similares. Esta entrada y expansión se da a través de dos mecanismos. De forma **pasiva**, a través de las perforaciones

y de las punteaduras, y de forma **activa**, a través de un “*transpressorium*”, un mecanismo en el cual el hongo crea una micro-hifa que es capaz de atravesar la pared celular llegando a otra célula (figura 1.15). Una vez la micro-hifa emerge de la pared celular vuelve a su tamaño normal, empezando la colonización (Pournou, 2020).

Una vez el hongo ha entrado dentro de la madera, empieza a degradarla a través de tres mecanismos que varían dependiendo de la especie de hongo y del tipo de madera. Dentro de estos mecanismos de degradación se distinguen tres patrones distritos: **i) tipo 1** (cavidades cónicas), **ii) tipo 2** (erosión), y **iii) tipo 3** (cavidades difusas), que sería la combinación de los dos anteriores.

- **Tipo 1. Cavidades cónicas:** en este tipo de mecanismo se crean unas características cavidades cónicas por medio de la acción de las enzimas lignocelulósicas dentro de la capa S2 de la pared vegetal. Este proceso se da por la formación de una pequeña hifa que se colocaría en posición paralela a las fibras de celulosa dentro de la capa S2 y empezaría a segregar enzimas lignocelulósicas por toda su superficie, pero especialmente por el centro de la hifa, creando este tipo de estructura. Este mecanismo sigue un sistema de “*start-stop*” donde la degradación se da en momentos concretos y no es constante (Eaton & Hale, 1993; Pournou, 2020).
- **Tipo 2. Erosión:** durante este mecanismo de degradación el hongo crece dentro del lumen de la célula vegetal. Desde allí comienza la disolución de la matriz lignocelulósica que forma la pared vegetal. Esta degradación acaba al llegar a la capa S1 y la lámina media, donde al no ser capaz de degradarla, finaliza la degradación. En estados avanzados de este tipo de degradación únicamente sería visible una estructura esquelética de la madera, donde sólo permanece la capa S1 y la lámina media (Daniel, 2016a, 2016b).
- **Tipo 3. Cavidades difusas:** durante este tipo de degradación se da la entrada de las micro-hifas representativa del tipo 1 y la degradación extensiva representativa del tipo 2, con ello se da una destrucción progresiva de la pared celular (Daniel, 2016b).

---

### 1.5.2. Degradación blanca

La degradación blanca está causada por hongos basidiomicetos pertenecientes al subfilo Agaricomycotina y al orden Polyporales. No obstante, también existen ascomicetos de las familias Diatrypacea y Xylariaceae que causan este tipo de degradación (Eaton & Hale, 1993; Riley *et al.*, 2014; Schmidt, 2006). Al igual que en la degradación blanda, las condiciones de crecimiento de los hongos limitan su acción. La gran cantidad de especies y la diversidad de las mismas hacen que este tipo de degradación sea la más común, estando presente en numerosos procesos de degradación a nivel natural, como la descomposición de la madera de los bosques, y a nivel humano, encontrándose tanto en construcciones exteriores como interiores.

Aunque las condiciones de crecimiento de estos hongos son variadas y se pueden encontrar hongos que crezcan a una gran diversidad de temperaturas, es necesario una humedad relativa entre del 40-80% para el crecimiento de los basidiomicetos. En cuanto al sustrato, este tipo de degradación afecta principalmente a las maderas duras, estudios recientes demuestran que la degradación blanca está especializada en la descomposición de este tipo de madera (Krah *et al.*, 2018).

La característica principal de la degradación blanca es la capacidad de estos hongos para degradar todos los componentes de la pared vegetal, incluyendo la lignina y la celulosa cristalina. Esto es posible gracias a un gran arsenal de procesos enzimáticos distintos enfocados a cada uno de los componentes de la pared vegetal.

Para la degradación de la celulosa las enzimas involucradas se pueden dividir en dos grupos principales. Por un lado, aquellas comunes a los otros tipos de degradación, las glicósido hidrolasas donde se incluyen las mencionadas anteriormente en la figura 1.9, endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas (Manavalan *et al.*, 2015). Por otro lado, aquellas enzimas involucradas en la degradación de la celulosa a través de mecanismos oxidativos. Entre ellas se encuentran las oxidoreductasas, como la celobiosa deshidrogenasa, la cual se encuentra únicamente en hongos pertenecientes a la degradación blanca y es capaz de oxidar la celobiosa, manodextrina, celodextrina y la lactosa (Ramoni & Seiboth, 2016).

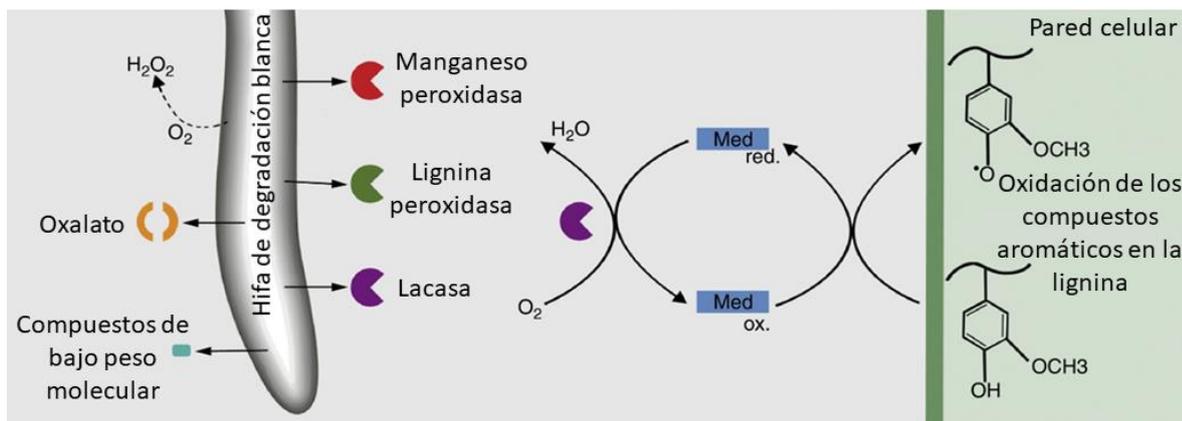
En la degradación de la hemicelulosa actúan dos tipos de enzimas: **i)** endoenzimas como mananasas o xilanasas, las cuales van descomponiendo la hemicelulosa en cadenas más cortas y **ii)** glicosidasas como manosidasas, xilosidasas y glucosidasas que degradarán estas cadenas más cortas a azúcares básicos (Highley & Dashek, 1998).

Por último, la degradación de la lignina es un proceso complejo por tres motivos: **i)** el gran tamaño de las moléculas de lignocelulosa hace que su degradación deba de ser extracelular; **ii)** la presencia de distintos tipos de uniones dentro de la molécula de lignina causa que su degradación tenga que ser realizada por mecanismos oxidativos en vez de hidrolíticos; y **iii)** su naturaleza heterogénea obliga a los sistemas degradativos a ser poco específicos (Kirk & Cullen, 1998). Por ello, los sistemas enzimáticos degradadores de lignina atacan a ésta a través de reacciones extracelulares oxidativas poco específicas donde están involucradas enzimas como peroxidasas de clase II y lacasas, estos sistemas se resumen en la figura 1.16.

Las peroxidasas de clase II se clasifican en lignina peroxidasas (LiP), peroxidasas dependientes de manganeso (MnP) o peroxidasas versátiles (VP) según su capacidad catalítica y sus sitios de unión. Este tipo de peroxidasas tienen un gran potencial rédox que les permite la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos, que componen el 90% de la estructura de la lignina (Manavalan *et al.*, 2015; Pollegioni *et al.*, 2015).

Las lacasas son capaces de oxidar directamente los anillos fenólicos y las aminas aromáticas a través de oxidaciones mediante la transferencia de un electrón. Su potencial rédox es menor que las peroxidasas teniendo que contar con mediadores para la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos (Pollegioni *et al.*, 2015).

Ambos tipos enzimáticos necesitan de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para producir estas reacciones de oxidación. Por ello, para la degradación de lignina se necesitan de otros tipos de enzimas auxiliares que produzcan este peróxido de hidrógeno, tales como glicoxal oxidasa, oxalato descarboxilasa, aryl-alcohol oxidasa o alcohol oxidasa que reducen el  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Además, la celobiosa hidrolasa, también está involucrada en la degradación de la lignina a través de la reducción de los radicales aromáticos, la producción de radicales hidroxilo por medio de la reacción de Fenton y la cooperación con las peroxidasas y lacasas haciendo más accesibles los enlaces fenólicos no aromáticos (Daniel, 2016a; Pournou, 2020).



**Figura 1.16. Degradación de la lignina por hongos de la degradación blanca.** Secreción de enzimas extracelulares como peroxidasas y lacasas con cofactores de bajo peso molecular generan especies de oxígeno reactivo que catalizan la oxidación de la lignocelulosa. La acción de las enzimas sobre los compuestos aromáticos de la lignina ocurre a través de mediadores. (Modificado de Cragg *et al.* 2015).

Por otro lado, todos estos mecanismos enzimáticos parecen ineficaces durante las primeras etapas de la degradación. Es por ello que se ha planteado la existencia de otro modelo mediado por moléculas de pequeño tamaño que inician la despolimerización de la pared celular. Estos mediadores serían moléculas oxidadas por las enzimas antes mencionadas creando una situación oxidativa difusible que es capaz de llegar hasta la matriz extracelular iniciando su despolimerización (Arantes *et al.*, 2011).

La degradación blanca puede destruir casi por completo la madera que degrada, perdiendo esta un 96-97% del peso. La degradación de la lignina puede darse de forma simultánea con el resto de componentes de la pared vegetal o de forma selectiva.

### 1.5.3. Degradación parda

La degradación parda está causada por hongos basidiomicetos que incluyen diferentes especies en los órdenes Boletales, Gloeophyllales, Dacrymycetales y sobre todo Polyporales (Riley *et al.*, 2014). Este tipo de degradación está considerada la más importante económicamente, sobre todo porque afecta a las construcciones realizadas en madera blanda en el hemisferio norte. El coste de la reparación de las estructuras dañadas se estima en 30 millones de euros anuales en Francia (Gabriel & Švec, 2017; Schmidt, 2007). Está causada por

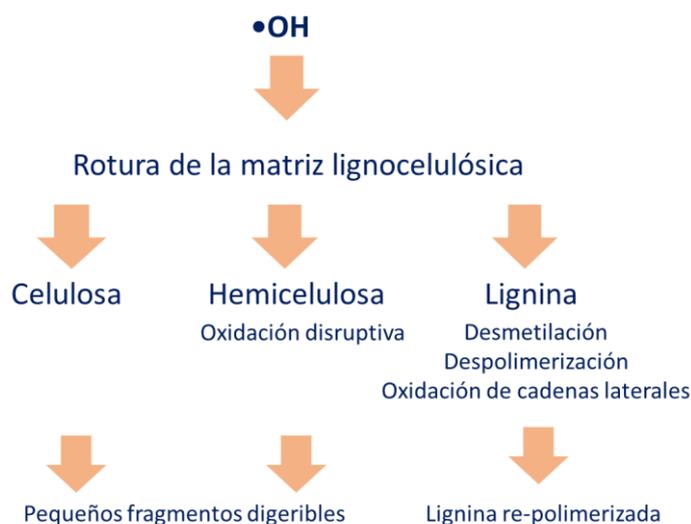
un centenar de especies distintas de las que las más importantes por su incidencia son *Coniophora puteana* y *Serpula lacrymans*, que por su agresividad y su amplia distribución se consideran la especies más destructivas en la degradación parda (Hess *et al.*, 2021; Schmidt, 2007)

Durante este tipo de degradación se da la descomposición preferencial de los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, mientras que la lignina es químicamente modificada permaneciendo en la madera degradada y dando a esta un color marrón característico (Schmidt, 2006). Esta capacidad de los hongos que causan la degradación parda de descomponer los polisacáridos de la pared vegetal dejando sin descomponer la lignina es la principal característica que los distingue del resto de tipos de degradación (Daniel, 2016a).

Análisis genómicos comparativos entre diferentes especies implicadas en la degradación parda y blanca demuestran que los primeros evolucionaron a partir de los segundos, perdiendo durante el proceso enzimas esenciales para la degradación de la lignina, como peroxidasas y lacasas, además de otras enzimas vinculadas a la degradación de los polisacáridos (Goodell *et al.*, 2020). La falta de estas enzimas para la degradación de la pared celular está subsanada a través de un sistema no enzimático, que permite polimerizar y despolimerizar la lignina para tener acceso a los carbohidratos de la pared y poder degradarlos. Este sistema denominado mecanismo quelante mediado por reacciones de Fenton (CMF) está basado en la generación de radicales libres hidroxilo (Pournou, 2020). Este mecanismo produce radicales hidroxilo a través de una reacción rédox donde están involucrados peróxidos y hierro en medio ácido ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ ). Estos radicales hidroxilo generados son los oxidantes más poderosos en los sistemas vivos y son capaces de penetrar dentro de la pared celular, romper los polisacáridos y modificar la lignina (Arantes *et al.*, 2011).

La modificación de la lignina se da a través de diferentes reacciones causadas por los radicales hidroxilo que se resumen en la figura 1.17. En la lignina se da la desmetilación, despolimerización y oxidación de las cadenas laterales, liberando los carbohidratos atrapados en la matriz lignocelulósica que pueden ser oxidados y fragmentados para, finalmente, conseguir fragmentos pequeños que pueden ser metabolizados.

Una vez los polisacáridos han sido fragmentados entra en juego el otro sistema de degradación presente en estos hongos, la degradación hidrolítica de la holocelulosa. Este proceso se da a través de endoglucanasas procesivas, la unión a la celulosa se da de forma prolongada realizando su acción catalítica múltiples veces, que suplen la función de las exoglucanasas, no presentes en las especies fúngicas causantes de la degradación parda. Además, la presencia de  $\beta$ -glucosidasas poco específicas permite la rotura no solo de la celobiosa, sino que también de otro disacáridos como xilosa, manosa y galactosa (Ringman, 2017).



**Figura 1.17. Rotura de la matriz lignocelulósica durante la degradación parda por medio de radicales hidroxilo.** Principales reacciones que suceden en la modificación de la lignina y la digestión de los polisacáridos presentes en la pared celular. (Modificado de Pournou 2020).

#### 1.5.4. Decoloración de la madera

La pérdida o el cambio de color en la madera está causada por una gran cantidad de motivos tanto abióticos como bióticos. Entre las causas abióticas encontramos algunas que se dan por motivos externos a la madera como la luz UV, o a motivos internos a esta como son los depósitos de minerales o la actividad enzimática propia del árbol.

Las causas bióticas se deben al crecimiento en la madera de diferentes especies de hongos, bacterias e incluso algas con capacidad de formar pigmentos que tiñen la superficie o zonas de albura de la madera, produciendo en muchos casos una pérdida importante del valor comercial de esta (Kumar *et al.*, 2022).

Este tipo de contaminación puede estar causado por los llamados mohos, término que describe a una gran variedad de hongos englobando unas 20.000 a 30.000 especies distintas pertenecientes dentro de los Ascomycota (Schmidt, 2006). Este tipo de hongos son capaces de crecer con rapidez y penetrar unos pocos milímetros en el parénquima de la madera donde la presencia de azúcares, almidones y proteínas permite su desarrollo. Muchas de estas especies son capaces de crear pigmentos que colorearían esa parte contaminada de la madera. En algunos casos, los mohos pueden considerarse causantes de la degradación blanda, ya que poseen las enzimas necesarias para la degradación de los polisacáridos de la madera, como ejemplo caben mencionar especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Phialophora* entre otros (Daniel, 2003).

Por otro lado, los principales hongos responsables de la decoloración de la madera son aquellos que causan la denominada coloración azul, en esta se engloban entre 100 y 250 especies diferentes de hongos ascomicetos y deuteromicetos que se agrupan en tres grupos:

**i)** los hongos de la coloración azul como *Ceratocystiopsis* spp.; **ii)** levaduras negras como *Aureobasidium pullulans*; y **iii)** mohos oscuros como *Alternaria alternata*.

Los mecanismos por los que estos hongos llegan a la madera pueden ser distintos. En algunos casos, como en de distintas especies de *Ceratocystiopsis* y de *Ophiostoma*, el contacto con la madera se realiza través de vectores artrópodos que transportan las esporas a la madera (Wingfield *et al.*, 2017). En otros casos, como en *A. pullulans* o *A. alternata*, esta colonización se daría por el transporte de las esporas a través del aire, lluvia o de material contaminado durante el manejo de la madera (Schmidt, 2006).

Una vez el hongo ha llegado a la madera es capaz de entrar en ella a través de grietas en su superficie colonizando el parénquima secundario, ya dentro estos hongos son capaces de usar los nutrientes que se encuentran dentro del parénquima y extenderse a través de las traqueidas y fibras hasta colonizar la mayor parte de la albura (Bruce *et al.*, 2003). Esta colonización de la madera no suele tener repercusiones en sus propiedades mecánicas, pero la producción de pigmentos reduce el valor de la madera por motivos estéticos (Humar *et al.*, 2008). Aunque también se han dado casos que esta nueva coloración aumente su valor, como es el caso de la modificación de la madera para obtener piezas veteadas, donde se vea el recorrido del hongo en el interior de la misma (Robinson *et al.*, 2014).

## 1.6. NUEVAS FUENTES DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos están presentes en todos y cada uno de los lugares del planeta, desde la palma de la mano hasta el fondo de las fosas marinas o en la superficie de los glaciares (Anesio *et al.*, 2017; Takami *et al.*, 1997). Constituyen la mayor fracción de la biomasa global, siendo los reservorios esenciales que sustentan la vida y estimando su número en  $2 \cdot 10^{30}$  células microbianas en el planeta Tierra (Bender *et al.*, 2019).

La sociedad está estrechamente relacionada con los microorganismos que la rodean, como se ha indicado en apartados anteriores, los microorganismos pueden ser usados para un sinnúmero de aplicaciones diferentes, desde la conversión de material lignocelulósico en combustible hasta la producción de moléculas antibióticas. La presencia de estos microorganismos puede ser descubierta a través de técnicas moleculares que permiten monitorizar todos los microorganismos que existen en un determinado lugar, o buscar uno en concreto (Austin, 2017). Para la utilización de estos microorganismos en procesos industriales es necesario su aislamiento en ambientes naturales o artificiales. Por ello, la búsqueda de microorganismos capaces de producir moléculas útiles para el desarrollo humano se ha convertido en el campo de estudio de numerosas investigaciones, así como de empresas dedicadas al procesado de muestras ambientales para el aislamiento y cultivo de estos microorganismos (Hosseini *et al.*, 2022; Rodrigues & de Carvalho, 2022). En la tabla 3 se resumen algunos ejemplos.

Tabla 3. Microorganismos productores de compuestos bioactivos aislados en la naturaleza.

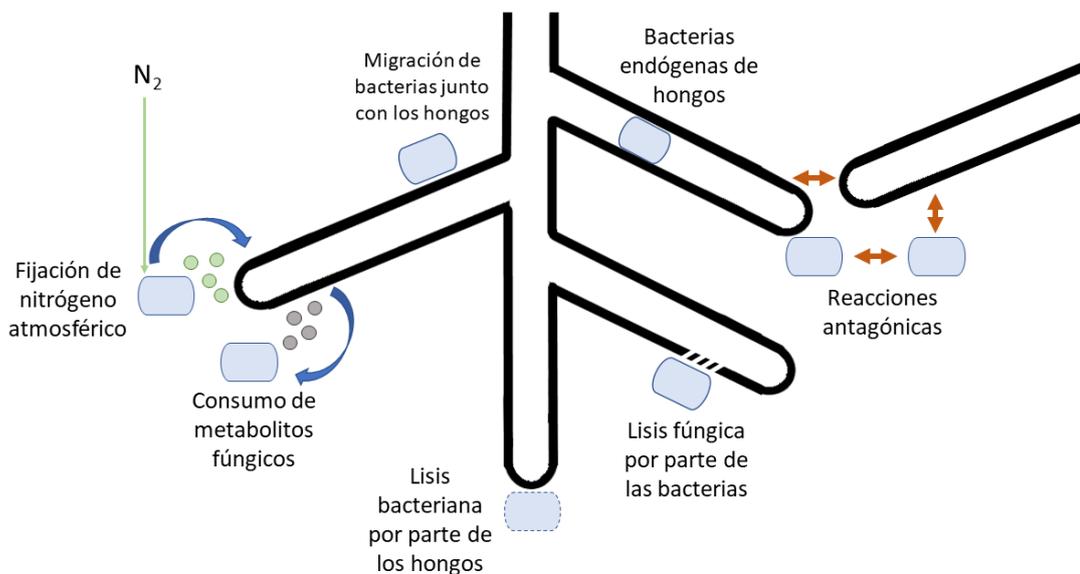
Microorganismo	Molécula	Origen	Actividad biológica	Referencia
<i>Streptomyces</i> sp. NTK 937	Caboxamycina	Cuenca de Canarias (3814 m de profundidad)	Antibacteriana, antifúngica y antitumoral	(Hohmann <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> M-169	Anthracimycina B	Mar Cantábrico (1500 m de profundidad)	Antibacteriana	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2018)
<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>	Chaxapeptina	Desierto de Atacama	Antitumoral	(Castro <i>et al.</i> , 2018)
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycina	Suelo, Lincon (Estados Unidos)	Antibacteriano y antimalárico	(Spížek & Řezanka, 2004)
<i>Sorangium cellulosum</i> So ce1871	Thuggacina	Suelo, Rhodos (Grecia)	Antituberculoso	(Steinmetz <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus</i> sp.	Kurstakina, surfactina, iturina, polymyxina y fengycina	Suelo, Salta (Argentina)	Antifúngico	(Sabaté <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aetherobacter fasciculatus</i>	Aetheramidas A y B	Suelo seco, Saarland (Alemania)	Antiviral	(García <i>et al.</i> , 2016; Plaza <i>et al.</i> , 2012)

La **búsqueda de microorganismos** útiles abarca desde ambientes extremos, como glaciares o fondos marinos, a ambientes mucho más corrientes, como microorganismos asociados a plantas (Qin *et al.*, 2009). Esta búsqueda no solamente tiene como objetivo el aislamiento e investigación de especies bacterianas o fúngicas capaces de producir moléculas antibióticas hasta ahora desconocidas, si no que también, el aislamiento de nuevas cepas de especies conocidas y productoras de compuestos o enzimas útiles, ya que se ha demostrado que la producción de sustancias antimicrobianas, así como enzimas, depende de la cepa de la que se aísle, siendo diferente en cepas de la misma especie aisladas de localizaciones distintas o incluso de una misma localización (Mould & Hogan, 2021; Sottorff *et al.*, 2019). En este trabajo se propone la madera en degradación como un nicho ambiental adecuado para la búsqueda de estos microorganismos productores de moléculas o enzimas valiosos para el ser humano.

### 1.6.1. La madera como nicho ecológico

La madera, como se ha comentado anteriormente, está compuesta principalmente por tres biomoléculas, celulosa, hemicelulosa y lignina, dentro de la misma madera existen otros componentes que pueden ser utilizados por las bacterias y hongos para su crecimiento. A su vez, la madera aun siendo rica en carbohidratos de difícil acceso para las bacterias, es deficiente

en nitrógeno, el cual es necesario para el crecimiento de los microorganismos. Esta ausencia de nutrientes implica la necesidad de **interacciones entre bacterias y hongos** presentes en la madera, este tipo de relaciones podrían ser de tres tipos: **i)** relaciones de competición por los nutrientes disponibles; **ii)** adoptar mutualismos que puedan ser beneficiosos para ambas partes; y **iii)** interacciones donde ninguna de las partes fuese perjudicada (Johnston *et al.*, 2016). Las principales interacciones entre hongos y bacterias se resumen en la figura 1.18.



**Figura 1.18. Interacciones a nivel de organismo entre hongos y bacterias dentro de la madera en degradación.** Estas interacciones pueden ser beneficiosas para uno de los organismos, para los dos, o perjudiciales para alguno de ellos. (Modificado de Johnston, Boddy, & Weightman 2016).

Estudios recientes demuestran la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la madera en degradación. Así, la detección de genes de nitrogenasa (*nifH*) permitió identificar algunos ordenes implicados como Rhizobiales, Rhodocyclales, Pseudomonadales, Rhodospirillales, Sphingomonadales y Burkholderiales (Hoppe *et al.*, 2014). Se plantea que estas bacterias están relacionadas con los hongos degradadores de la madera fijando el nitrógeno atmosférico necesario para el crecimiento de los hongos, mientras que estas bacterias se aprovecharían de la degradación de los carbohidratos para su propia nutrición (de Boer *et al.*, 2005). Otros ejemplos de posible **mutualismo entre bacterias y hongos** se da entre *Burkholderia terrae* BS001 y algunos hongos, siendo esta bacteria capaz de migrar junto a ellos y protegerles de compuestos tóxicos como la ciclohexamida (Nazir *et al.*, 2014).

Por el otro lado, también se han demostrado relaciones de **competencia entre hongos y bacterias** presentes en la madera en degradación. Un ejemplo es *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 aislado de alcornoque (*Quercus suber*), en Portugal, que ha demostrado tener capacidad inhibitoria contra distintos hongos, entre los que se encuentran cepas de los géneros, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Cephalosporium* (Caldeira *et al.*, 2008).

La capacidad de los hongos degradadores de la madera de influenciar la diversidad microbiana en la madera en degradación se ha comprobado en diferentes hongos, los cuales eran capaces de reducir, aumentar y modificar las especies bacterianas presentes (Rinta-Kanto *et al.*, 2016). Dicho efecto puede estar ocasionado por diferentes mecanismos que logran controlar la población microbiana, como son:

- **Descenso del pH:** la secreción de compuestos como el ácido oxálico reduciría el pH ambiental donde se encuentra el hongo, además la secreción de este tipo de ácidos orgánicos es perjudicial para las bacterias (de Boer *et al.*, 2010).
- **Secreción de radicales libres:** los radicales libres del oxígeno que se segregan durante la degradación parda son uno de los mayores oxidantes conocidos, siendo muy dañino para toda vida bacteriana (Tornberg & Olsson, 2002).

Por otro lado, también existen las **interacciones entre hongos** dentro de la madera en degradación. Las interacciones entre los hongos pueden ser de distinta naturaleza, mutualistas, neutras o combativas, dependiendo de muchos factores como las especies de hongos implicados, la temperatura o el sustrato. Dentro de la dinámica de poblaciones en la madera en degradación estas interacciones son sobre todo antagónicas y pueden darse de distinta forma:

- **Las interacciones a distancia:** mediadas por la excreción de moléculas orgánicas difusibles y la producción de compuestos orgánicos volátiles afectando a los hongos cercanos, inhibiendo o aumentando el crecimiento de ellos (Evans *et al.*, 2008). Otras maneras de interacción a distancia sería el cambio de pH del ambiente donde se encuentra el hongo (Hiscox & Boddy, 2017).
- **Las interacciones a nivel de hifas:** existen principalmente dos: **i)** el micro parasitismo, donde uno de los hongos tiene la capacidad de parasitar al otro, robándole parte de sus nutrientes; y **ii)** la interferencia hifal, donde el hongo tiene la capacidad de eliminar al otro. Durante este proceso el hongo secreta compuestos tóxicos y enzimas que producirían la muerte de las hifas con las que conecta, múltiples interacciones entre ambos hongos producirían la muerte del hongo atacado (Boddy & Hiscox, 2016).
- **Las interacciones a nivel de micelio:** cuando los hongos saprofitos se encuentran dentro de la madera deben de competir por el espacio que ocupan, ya que en ese espacio se encuentra su fuente de alimento, por ello en el momento en que se encuentran ambos micelios se dan una serie de cambios a nivel de crecimiento, expresión de genes y expresión de metabolitos que inician la etapa de antagonismo entre ambos hongos. Estas relaciones antagónicas pueden resolverse en punto muerto, cuando ninguno de los dos hongos es capaz de desplazar al otro, o en la victoria de uno de ellos. Entre ambos resultados existen

un sinnúmero de variaciones que regularían las interacciones de los hongos dentro de la madera (Hiscox *et al.*, 2018).

Todas estas interacciones que se han mencionado antes hacen de la madera en degradación un nicho ambiental único donde los microorganismos deben competir fieramente para poder sobrevivir y obtener nutrientes, esto la convierte en un nicho ecológico propicio para buscar microorganismos que puedan ser de utilidad ya sea por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos, por la producción de antibióticos o antifúngicos, o por la secreción de enzimas que ayuden a agilizar procesos industriales.

## 1.7. APLICACIONES DE LOS MICROORGANISMOS

### 1.7.1. Microorganismos productores de sustancias antimicrobianas

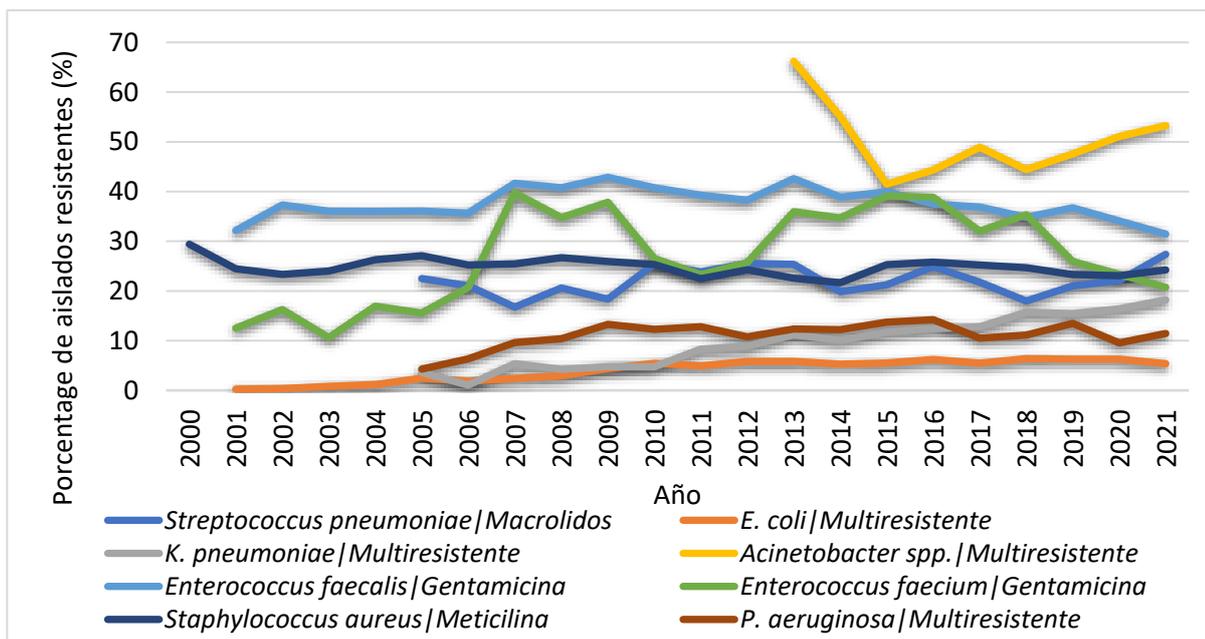
Los **antibióticos** son moléculas producidas por bacterias y hongos con la capacidad de matar (bactericidas) o inhibir (bacteriostáticos) el crecimiento de microorganismos, a través de reacciones que afectan a diferentes partes de la célula, como por ejemplo inhibiendo la replicación o la producción de proteínas. Las primeras moléculas con capacidad antibiótica fueron sintetizadas por Antoine Béchamp en 1859, cuando consiguió producir atoxyl, un derivado de la anilina. Usando este descubrimiento como base, Paul Ehrlich, Alfred Bertheim y Sahachiro Hata sintetizaron y probaron numerosos derivados del arsénico en 1907, dando como resultado el Salvarsan, que fue el primer agente terapéutico efectivo y seguro contra la sífilis hasta la llegada de la penicilina (Williams, 2009).

El “milagroso” descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 fue el primer paso en la producción de antibióticos por microorganismos. Pero no fue hasta 1939 cuando Howard Florey, Norman Heatly y Ernst Chain describieron un método para la purificación de suficiente penicilina como para poder empezar ensayos clínicos. Este método fue escalado cuando, debido a la Segunda Guerra Mundial, tuvieron que emigrar a Estados Unidos y Canadá donde, gracias a su labor, fue posible producir suficiente penicilina para las tropas del bando aliado (Barreiro & García-Estrada, 2019). Este trabajo de escalado dio lugar a la industria de las fermentaciones, que hoy en día es necesaria no únicamente para la producción de antibióticos, sino que también la obtención de otros compuestos como eritropoyetina o insulina.

En fechas próximas al descubrimiento de la penicilina Selman Waksman descubrió que unas bacterias aisladas del suelo, los actinomicetos, tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos y desarrolló un método de análisis de las posibles bacterias productoras de antibióticos, probando más de 10.000 cepas distintas. Este método se usó por más de 20 años, dando lugar a la edad dorada de los antibióticos, cuando se descubrieron la mayoría de las clases de antibióticos que se usan hoy en día (Ribeiro da Cunha *et al.*, 2019). Al mismo tiempo que se descubrían nuevos antibióticos, la modificación de los ya

descubiertos otorgo a estos de cualidades útiles para su producción, administración y comercialización. Estas modificaciones semi-sintéticas de antibióticos ya descubiertos han sido el método de creación de nuevas moléculas antibióticas más importante desde el fin de la era dorada de los antibióticos (Barreiro & García-Estrada, 2019).

Mientras que los avances científicos eran capaces de descubrir y desarrollar nuevos antibióticos, las bacterias eran capaces de adaptarse y hacerlos frente. La **resistencia a los antibióticos** se ha dado de forma natural en los microorganismos desde hace millones de años, pero la imprudencia de su excesivo uso ha aumentado la presión selectiva por parte de las bacterias para evolucionar en mecanismos de resistencia que cada vez dejan fuera de juego antes a las nuevas moléculas antibióticas que se desarrollan. En Europa se han registrado unas 33.000 muertes anuales a consecuencia de las bacterias resistentes a antibióticos, de hecho, el 15% de las enfermedades nosocomiales se deben a microorganismos resistentes a los antibióticos. Un estudio de la Organización Mundial de la Salud afirma que para 2050 se registrarán alrededor de 10 millones de muertes anuales por infecciones resistentes a los antibióticos, en España las bacterias resistentes a múltiples antibióticos como *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son un importante problema de salud pública, figura 1. 19 (Aminov, 2010; Barreiro & Barredo, 2021; Ribeiro da Cunha *et al.*, 2019).



**Figura 1.19. Bacterias resistentes a antibióticos en España.** Las cepas multiresistentes se refieren a *K. pneumoniae* y *E. coli* resistente a la tercera generación de cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, *Acinetobacter spp.* resistente a fluoroquinolonas y aminoglucósidos y carbapenems y *P. aeruginosa* resistente al menos a tres antibióticos entre piperacilina, tazobactam, fluoroquinolonas, cefalosporinas, aminoglucósidos y carbapenems (Datos extraídos del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades basado en datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud y los Ministerios de Sanidad).

Una de las maneras que existen para la luchar contra la resistencia a antibióticos es buscar nuevos o viejos microorganismos que sean capaces de producir moléculas antibióticas hasta

ahora desconocidas. Durante los últimos años numerosas investigaciones se han centrado en el aislamiento y la caracterización de microorganismos de los nichos ecológicos más diversos, como se muestran en la tabla 1.3, dando lugar a algunos descubrimientos importantes como la cifomicina, molécula con capacidad antibiótica y antifúngica producida por *Streptomyces*, aislada del tracto digestivo de una hormiga brasileña (*Cyphomyrmex* sp.) (Chevrette *et al.*, 2019). O la producción de manzamina A, un alcaloide con posibles usos para la lucha contra el cáncer, la tuberculosis y la malaria, por parte de un actinomiceto, *Micromonospora* sp., aislado de una esponja marina (Waters *et al.*, 2014).

Además, estos últimos años se ha hecho presente un problema ignorado durante años, las **resistencias fúngicas**. Las enfermedades mediadas por hongos varían entre infecciones dérmicas de poca severidad, hasta infecciones invasivas que ponen en riesgo la vida de los pacientes, de hecho, se calcula que hasta 1,6 millones de personas mueren al año como consecuencia de este tipo de infecciones. Esta situación se agrava en pacientes inmunodeprimidos donde este tipo de enfermedades son especialmente comunes (Brown *et al.*, 2012; «*Stop neglecting fungi*», 2017).

La severidad de las infecciones fúngicas sistémicas, unido con una falta de mecanismos para su detección y sobre todo por el limitado número de compuestos antifúngicos disponibles en la actualidad está disparando los datos de mortalidad a causa de este tipo de enfermedades, medrando los logros conseguidos en el tratamiento de otras como el cáncer o el VIH (Brown *et al.*, 2012). Además, la aparición de hongos potencialmente mortales resistentes a los tratamientos hasta ahora útiles, como *Candida auris* multirresistente o *Aspergillus fumigatus* resistente a los azoles, está dejando sin medios de acción para poder combatirlos en la práctica clínica (Forsberg *et al.*, 2019; Verweij *et al.*, 2020).

El problema de las infecciones fúngicas no solo tiene importancia en salud humana, las enfermedades mediadas por hongos han demostrado ser un verdadero dilema para otros campos como la biodiversidad en animales y plantas, donde este tipo de enfermedades han sido capaces de reducir poblaciones de anfibios, insectos, mamíferos y plantas tanto leñosas como no leñosas (Fisher *et al.*, 2012), o la agricultura, donde los fitopatógenos que afectan a cultivos pueden llegar a reducir las cosechas de grano en un 80% (Godfray *et al.*, 2016).

Todo ello requiere de la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos para poder hacer frente a las infecciones, de nuevas formas de tratamiento de los cultivos y de defensa de la biodiversidad, entre las que pueden entrar el uso de microorganismos como forma de biocontrol (Saxena *et al.*, 2020; Spadaro & Droby, 2016; Susi *et al.*, 2011; Wall & Lopez-Ribot, 2020).

La búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas puede enfocarse de diversas maneras, una de ellas es la búsqueda de aquellos genes responsables de la síntesis de moléculas con actividades interesantes para la industria, entre estos genes los más conocidos son: las **policétido sintetasas (PKS)** y las **sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS)** (Wright, 2017).

Las **policétido sintetasas (PKS)** sintetizan **policétidos**, moléculas con un amplio espectro de propiedades bioactivas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena o inmunosupresora, estando sintetizadas a partir de pequeñas unidades de acil-CoA (acil-coenzima A) (Risidian *et al.*, 2019). Estos grandes conjuntos enzimáticos están formados por dominios con funciones concretas que seleccionan, procesan y fusionan los residuos individuales hasta formar el policétido final. Para ello, los sustratos para el inicio y la extensión de la cadena de policétido son seleccionados y activados a través de un dominio acil transferasa (AT) que los trasfiere a una proteína acarreadora de acilos (ACP). El tercer dominio necesario sería un dominio cetosintasa (KS) que catalizaría la condensación tipo Claisen del sustrato y del policétido en crecimiento, formando una unión entre la unidad que se incorpora y el carbonil tioester de la cadena acil unida a ACP. Estos tres dominios serían los mínimos para que una PKS funcionase, pero, 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. La gran variación existente entre los diferentes dominios que se incorporan a la PKS, así como el nivel de reducción de la cadena genera una gran variedad de compuestos diferentes. Para la terminación y liberación de la cadena policética se necesita un dominio tioesterasa adicional, que catalizaría la macrolactonización y con ello la liberación de la cadena policética (Caulier *et al.*, 2019; Chen & Du, 2016; Wang *et al.*, 2020).

Las PKS se han clasificado dependiendo de la estructura canónica de sus dominios funcionales en tres grupos principales.

- **PKS I:** formado por grandes conjuntos enzimáticos con los dominios funcionales unidos entre sí de forma lineal. Presentes en hongos y bacterias, donde se suelen dividir entre los PKS I iterativos, principalmente fúngicos, y los PKS I no iterativos, bacterianos, dependiendo del uso o no de forma repetitiva de los dominios que forman el complejo enzimático (Chen & Du, 2016).
- **PKS II:** complejo multienzimático donde los las enzimas monofuncionales se unen en el momento de la síntesis de cadenas policéticas. Se encuentran principalmente en bacterias y dan lugar a policétidos aromáticos (Wang *et al.*, 2020).
- **PKS III:** utiliza directamente tioester de acil-coenzima A, sin la necesidad de usar el dominio ACP. Aunque se pueden encontrar en bacterias, este tipo de PKS es típico de plantas (Shimizu *et al.*, 2017).

Las **sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS)** al igual que ocurre con las PKS I, están formadas por grandes conjuntos enzimáticos en forma modular. En ellas se distinguen módulos de iniciación, elongación y terminación de la cadena polipeptídica. Dentro de cada módulo se situarían los dominios individuales con actividad de apoyo o catalítica. Estos dominios difieren de los encontrados en las PKSs y de ellos dependerá la estructura final del polipéptido sintetizado (Yang *et al.*, 2020). Debido a la gran flexibilidad que puede darse en la

síntesis de estos compuestos, tanto por su cadena polipeptídica, como por el nivel de ciclación de la misma, los productos finales encontrados pueden ser muy variados.

### 1.7.2. Microorganismos como antagonistas de hongos degradadores

Como se explicó en el apartado 1.3 los productos utilizados para la protección de la madera contra la degradación han estado compuestos históricamente de sustancias antifúngicas con efectos adversos para el medio ambiente y la salud humana, por lo que en los últimos años las regulaciones supraestatales han empezado a limitarlos o a prohibirlos, abriendo el mercado a otros compuestos menos contaminantes. Entre ellos se pueden encontrar aceites derivados de plantas con propiedades antifúngicas e insecticidas como el aceite de las hojas del árbol de canela taiwanés (*Cinnamomum osmophloeum*) (Broda, 2020). Pero también la utilización de microorganismos que sean capaces de inhibir, o competir por los nutrientes, con los hongos degradadores de madera esta ganado fuerza (Susi *et al.*, 2011).

La utilización de microorganismos como **agentes de biocontrol** contra hongos es un tema bien conocido en agricultura donde se llevan usando distintas especies de microorganismos desde hace años. Destacando la utilización tanto de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Streptomyces*, y de hongos como *Trichoderma* para el tratamiento de los cultivos contra el ataque de hongos fitopatógenos (Mishra *et al.*, 2015). El éxito de algunas de estas formulaciones ha conseguido comercializarlas, teniendo en este momento en el mercado productos como Taegro (Syngenta), un producto a base de *B. amyloliquefaciens* para controlar las plagas de la vid, como la podredumbre gris (causada por *Botrytis cinérea*) o el oídio (producido por varios géneros de hongos de la familia Erysiphaceae), o TrichoSym Bio (Symborg), un estimulante que contiene *T. harzianum* con efectos en biocontrol de patógenos.

Dentro de los beneficios del uso de microorganismos como agentes de biocontrol se pueden mencionar dos: **i)** las múltiples formas en las que los agentes de biocontrol pueden llegar a inhibir el crecimiento de los hongos, como son la competición, la secreción de agentes antifúngicos o el micro-parasitismo dificulta la aparición de resistencias, y **ii)** la utilización de estos agentes puede combinarse con el uso de recubrimientos protectores u otras formas de protección. De esta manera, las investigaciones llevadas a cabo por Ribera *et al.* (2017; 2017), han conseguido integrar *T. harzianum* en formulaciones menos contaminantes para el medioambiente aumentando su eficacia en la protección de la madera de la degradación por hongos.

La utilización del **género *Bacillus*** en la protección de la madera está siendo cada vez más importante, contando con ventajas que lo hacen indicado como agente de biocontrol. Por un lado, la capacidad de *Bacillus* para esporular hace que pueda resistir en gran cantidad de ambientes y facilita, por un lado, su supervivencia y su duración, y por otro, la formulación de los productos finales, así como las condiciones de almacenamiento y manejo (Albayrak, 2019). Por otro lado, el género *Bacillus* posee numerosos mecanismos distintos de inhibir el crecimiento de los hongos, es capaz producir sustancias antifúngicas como iturinas y fengicinas

(Caldeira *et al.*, 2006; Moita *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2007), producir compuestos orgánicos volátiles que inhibirían a los hongos a distancia e incluso, algunas especies, son capaces de producir enzimas capaces de degradar la pared de los hongos, como las quitinasas (Helistö *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2019). Además, algunas especies como *B. subtilis* o *Bacillus pumilus* están reconocidas como microorganismos GRAS (*generally recognized as safe*) y QPS (*qualified presumption of safety*) facilitando, de esta manera, su utilización (Panel *et al.*, 2019).

Este uso de bacterias para impedir la proliferación de hongos no solo se ha visto útil en la práctica agrícola, sino que también se ha usado en la protección de obras artísticas y materiales históricos y hasta como medio de desinfección en hospitales, investigaciones llevadas a cabo en Italia ponen en valor varias cepas de *Bacillus* para la protección de pinturas del siglo 17 (Caselli *et al.*, 2018) y en la utilización de cepas de *Bacillus* como tratamiento desinfectante probiótico para superficies hospitalarias (Vandini *et al.*, 2014).

### **1.7.3. Microorganismos productores de enzimas de interés industrial**

La industria de la biocatálisis engloba la utilización de células, o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones y obtener de esa manera un producto de interés. Esta industria ha tenido varias etapas históricas que comienzan hace más de un siglo, cuando se dieron cuenta de que era posible la utilización de componentes de las células, lo que ahora se conocen como enzimas, para la transformación química de moléculas, este periodo se denominó la primera ola de la biocatálisis (Hanefeld *et al.*, 2022). La segunda ola llegó, en el último cuarto del siglo XX, con el cribado de enzimas, medios de cultivo y sustratos y los inicios de la ingeniería de proteínas, donde se incluían la mutagénesis dirigida y las modificaciones químicas, que dieron lugar a la producción de compuestos que no se encontraban en la naturaleza (Hanefeld *et al.*, 2022). La tercera ola llegó, en los últimos años de la década de 1990, cuando se desarrollaron los métodos avanzados de biología molecular, que permitieron una rápida modificación de las enzimas biocatalizadoras, lo que se denominó más adelante evolución dirigida (Bornscheuer *et al.*, 2012). La cuarta ola de la biocatálisis está al llegar según numerosos autores, con las nuevas técnicas de genética molecular avanzada, metagenómica y herramientas bioinformáticas que permiten encontrar y hasta crear nuevas enzimas con funcionalidades distintas (Poppe & Vértessy, 2018).

Esta nueva ola, viene además precedida por una nueva regulación que está desbancando a la transformación de moléculas a través de reacciones químicas, que al ser estas más violentas, suelen ser más perjudiciales para el medio ambiente y los trabajadores que las desarrollan, que la transformación de los mismos productos de forma enzimática (Atalah *et al.*, 2019). Por ello, el mercado mundial de las enzimas está creciendo cada año, siendo de 7 billones de dólares en 2017, se espera que crezca a 10,5 billones para 2024 («*On advances & challenges in biocatalysis*», 2018). Dentro de este mercado las enzimas fúngicas agrupan más del 50% de la producción, siendo estas usadas en campos como la industria alimentaria, la industria del papel o la industria farmacéutica (El-Gendi *et al.*, 2021).

Las **celulasas** representan un gran nicho de mercado dentro de la industria de las enzimas representando el 20% de todas las enzimas producidas, están presentes en numerosos procesos industriales como la fabricación de papel, la industria textil y por supuesto en la generación de energía. La utilización de estas enzimas depende de su coste de producción, por ello, la investigación de nuevas formas de obtención o la búsqueda de especies o cepas más productivas puede ser clave para la utilización en masa del material lignocelulósico para conseguir energía (Verma *et al.*, 2021).

Uno de los puntos clave en la conversión del material lignocelulósico en energía es la degradación de las complejas cadenas lignocelulósicas en moléculas que puedan ser usadas para generar dicha energía. Para ello, como ya se explicó en el apartado 1.2.1, existirían dos vías distintas, la vía termoquímica y la vía bioquímica. En ambos procedimientos la búsqueda de microorganismos productores de enzimas es de utilidad.

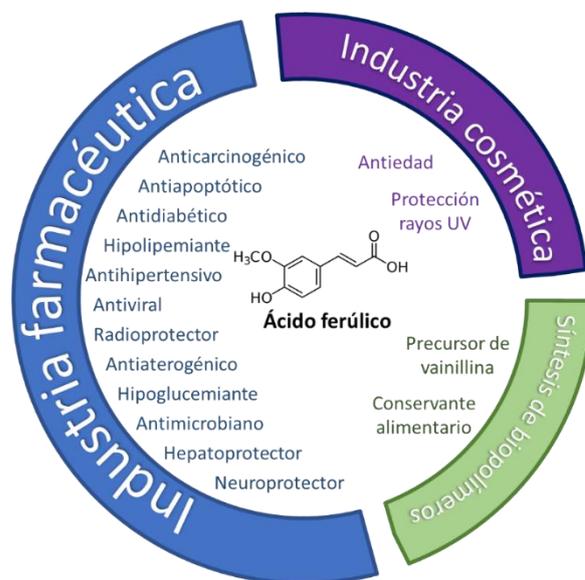
Uno de los primeros procesos que debe de ser realizado en ambas vías es el pretratamiento del material lignocelulósico para separar las moléculas de celulosa y hemicelulosa de la lignina, molécula muy recalcitrante y difícil de degradar. La capacidad de degradar la lignina por parte de los hongos de la degradación blanca ha abierto la búsqueda de especies o cepas más efectivas en la deslignificación del material lignocelulósico. Para encontrar estas cepas con alta capacidad deslignificante se han realizado estudios aislando distintas especies alrededor del mundo, algunos ejemplos son el parque nacional de Olimpia (Washington, Estados Unidos) o distintas fuentes de material en degradación en los bosques de Túnez (Dhouib *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2015). Uno de los motivos por lo que estas investigaciones son tan necesarias es que la capacidad de producción de enzimas lignocelulósicas parece depender de la especie fúngica, o incluso de la cepa aislada, por ello los experimentos de bioprospección de nuevas especies son necesarios para encontrar especies y cepas más competitivas (Elisashvili & Kachlishvili, 2009).

Una vez la celulosa y hemicelulosa ha sido liberada de la lignina, ambas deben de ser reducidas a sus moléculas más básicas, para que puedan ser convertidas en biocombustibles, tal y como se indica en la figura 1.9. Para ello, la **hidrolisis enzimática** por medio de hongos o bacterias es una alternativa a las hidrolisis químicas o físicas que, por un lado, utilizan productos altamente corrosivos, requiriendo una gran infraestructura y aporte de energía, y por otro, segregan compuestos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos necesarios en las últimas etapas (Hans *et al.*, 2019).

La hidrolisis enzimática utiliza las enzimas expresadas naturalmente por organismos capaces de degradar la celulosa para convertirla en moléculas más pequeñas y aprovechables para la producción de energía. Este proceso es llevado a cabo por bacterias, hongos e incluso macroorganismos, como insectos (*Tenebrio molitor* L. o *Hermetia illucens* L.)(Wang *et al.*, 2017), que cuentan con un arsenal de enzimas celulolíticas que pueden ser aprovechadas por la industria para la generación de energía de una forma más ecológica y sostenible. Por ello, es necesario la bioprospección de estos organismos y de sus enzimas en diferentes nichos ecológicos, algunos ejemplos son la búsqueda de hongos en manglares de la ciudad china de

Sanya o la búsqueda de hongos y bacterias de estómagos de larvas de coleópteros tropicales saprófagos en Costa Rica (Rojas-Jiménez & Hernández, 2015; Zeng *et al.*, 2019).

Por otro lado, dentro de la maquinaria celular necesaria para la degradación de la pared vegetal se encuentran otros grupos enzimáticos que también pueden ser aprovechados para generar productos de alto valor añadido, este es el caso de las **feruloil esterasas**. Estas enzimas son enzimas auxiliares dentro de la degradación de la pared vegetal, encargándose de la ruptura de los enlaces entre los ácidos hidroxicinámicos y los polisacáridos de la pared vegetal. Los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos más abundantes en la naturaleza, entre ellos existen los ácidos o-cumárico, p-cumárico, m-cumárico, cafeico, sinápico y ferúlico. Dentro de estos, el **ácido ferúlico** tiene numerosas aplicaciones dentro de la industria farmacéutica y cosmética, como antioxidante y también en la industria alimentaria, como precursor de compuestos de alto valor añadido, como la vainillina, las aplicaciones del ácido ferúlico se resumen en la figura 1.20 (Palani Swamy & Govindaswamy, 2015; Sova & Saso, 2020; Zduńska *et al.*, 2018).



**Figura 1.20. Aplicaciones del ácido ferúlico.** La mayoría de las aplicaciones del ácido ferúlico en los diferentes campos se debe a su gran efecto antioxidante. (Modificado de Srinivasan *et al.*, 2007).

Una de las formas de obtención de ácido ferúlico es la extracción a través de la hidrólisis del material lignocelulósico, que como en el caso de la extracción de celulosa y hemicelulosa, puede hacerse a través de hidrólisis ácida, alcalina y enzimática. La extracción a través de hidrólisis alcalina ha demostrado ser efectivo en numerosos residuos lignocelulósicos, pero los problemas medioambientales, de salud humana e industriales que genera la utilización de bases fuertes se contraponen a esta práctica. El uso de enzimas hidrolíticas como las feruloil esterasas derivadas de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* o *Trichoderma* ha demostrado ser una forma eficaz de extracción de ácido ferúlico, que además no daña los demás componentes de la matriz lignocelulósica que pueden tener valor (Faulds & Williamson, 1995; Gomes *et al.*, 2016; Juhneva-Radenkova *et al.*, 2021). La búsqueda de microorganismo con actividad feruloil esterasa es una de las formas de intentar encontrar especies, cepas o enzimas

con propiedades aumentadas o con una mayor producción o eficiencia (Antonopoulou *et al.*, 2019).

## 1.8. EL GÉNERO *BACILLUS*

El género *Bacillus* se encuentra dentro del filo Firmicutes, orden Bacillales y familia Bacillaceae incluyendo 419 especies distintas (según LPSN, consultado el 20 de Febrero de 2023). Son bacterias Gram +, con forma bacilar, formadoras de endosporas, aerobios o anaerobios facultativos. Este género suele dividirse en 17 clados distintos, siendo los clados de *Bacillus cereus* y *B. subtilis* los más importantes. Investigaciones llevadas a cabo los últimos años proponen la reclasificación de más de 200 especies en otros géneros dejando únicamente como *Bacillus* las especies pertenecientes a estos dos clados (Gupta *et al.*, 2020).

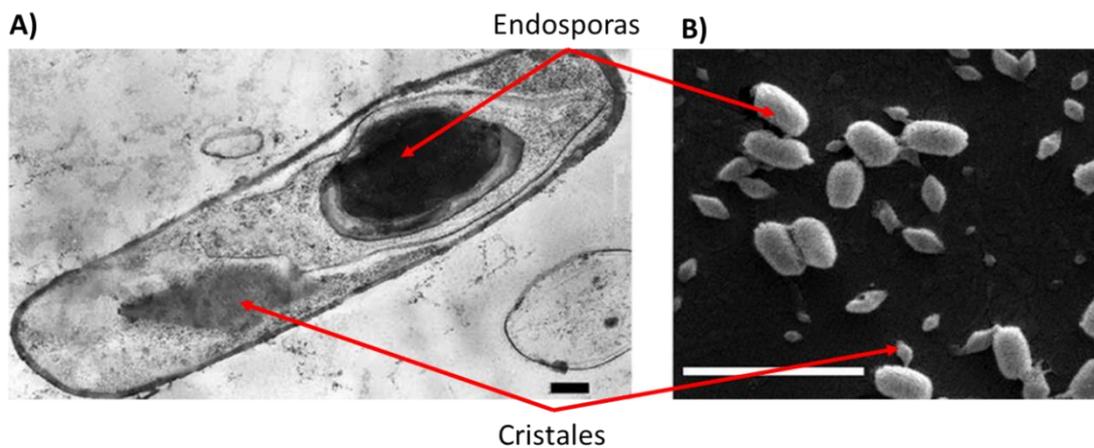
### 1.8.1. Clado *B. cereus*

En el clado de *B. cereus*, se encuentran especies como *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* y *Bacillus toyonensis*. El genoma de estas especies está altamente conservado con un tamaño entre 5,2 y 5,9 Mb y con secuencias del 16S muy similares. Esta alta conservación del genoma no implica una homogeneidad fenotípica de estas especies, siendo algunas grandes patógenos humanos, como *B. anthracis* o *B. cereus*, mientras que otras se consideran de las especies bacterianas más útiles para la protección de los cultivos frente a plagas, *B. thuringiensis* (Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

***B. anthracis*** es el agente etiológico del ántrax (carbunco), descubierto y caracterizado en el siglo 19 por Pasteur y Koch represento uno de los mayores avances en la microbiología y la vacunación, ya que fue usado para demostrar las leyes de Koch y además, una cepa atenuada de la misma especie fue la primera vacuna atenuada conocida (Bender *et al.*, 2019). La caracterización de esta especie ha sido realizada históricamente a partir de la presencia de los plásmidos que codifican para las toxinas que median la enfermedad, pero la especiación basada en plásmidos ha resultado en una clasificación complicada de las especies pertenecientes a este clado (Ehling-Schulz *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2020). Como enfermedad, el carbunco afecta tanto a humanos, como al resto de mamíferos, así como a algunas aves y reptiles, está causada por las toxinas sintetizadas por *B. anthracis*. En humanos existen tres manifestaciones posibles, la cutánea con poca tasa de mortalidad, la gastrointestinal y la pulmonar. Estas dos últimas manifestaciones son capaces de desembocar en la muerte de los afectados. La formación de esporas permite a este microorganismo sobrevivir largas etapas quedando latente en suelo desde donde es consumido por animales desarrollando la enfermedad gastrointestinal y con ello llegando hasta el ser humano (Carlson *et al.*, 2019; Ehling-Schulz *et al.*, 2019).

**B. cereus** es generalmente conocido por una causa común de intoxicación alimentaria. Este genero es capaz de sintetizar diferentes toxinas, como enterotoxinas, cereulida o citotoxina k, las cuales están asociadas a plásmidos, que contaminan comida produciendo diversas manifestaciones de diferentes gravedades, desde diarrea y vómitos, a daño hepático que hace peligrar la vida de los afectados. Además, ha sido caracterizado como un patógeno oportunista en personas inmunocomprometidas causando infecciones sistémicas y como causante de enfermedades oculares como endoftalmitis y queratitis (Ehling-Schulz *et al.*, 2019; Jovanovic *et al.*, 2021). La gran resistencia de las esporas generadas por esta especie hace que sea difícil la completa desinfección de los alimentos, causando brotes alrededor del mundo de poca intensidad. También, la gran variedad de fenotípica que presenta esta especie le permite sobrevivir y prosperar a diferentes temperaturas, altas concentraciones de NaCl y bajo pH, o que le permite contaminar comida en condiciones refrigeradas de almacenaje (Jovanovic *et al.*, 2021).

**B. thuringiensis** es un importante entomopatígeno, que afecta a diferentes especies de coleópteros o nematodos, siendo utilizado como biopesticida para proteger a los cultivos de distintas plagas. Esta especie se caracteriza por la formación de cristales paraesporales compuestas por proteínas con actividad toxica frente a un gran numero de especies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, y Hemiptera, así como para nematodos y ácaros, la figura 1.21 muestra dos imágenes por microscopia electrónica de las esporas y cristales proteicos. Estas toxinas, Cry, Cyt, Vip o Sip, son específicas, seguras y biodegradables, haciendo de los insecticidas basados en *B. thuringiensis* excepcionalmente efectivos, teniendo un mercado anual estimado 8 billones de dólares (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2020).



**Figura 1.21. Imágenes de microscopia electrónica de *B. thuringiensis*.** A) Imagen de microscopia electrónica de transmisión de una célula esporulada. Barra: 0,2  $\mu\text{m}$ . B) Imagen de microscopia electrónica de barrido de las endosporas y los cristales. Barra: 5,0  $\mu\text{m}$ . (Modificado de Sauka *et al.*, 2010).

Estas proteínas están clasificadas en 78 grupos, siendo algunas de ellas específicas frente a ciertos insectos, dando de esa manera una gran especificidad a su uso. Pero, en los últimos

años, el uso de estos insecticidas basados en *B. thuringiensis* ha generado resistencias entre los insectos, algunos mecanismos utilizados han sido, la mutación de receptores clave, de proteínas transmembrana, alteración de enzimas para el procesamiento de la protoxina, así como la producción de proteínas que secuestran la toxina o una mayor regeneración epitelial (Jurat-Fuentes *et al.*, 2021).

### 1.8.2. Clado *B. subtilis*

Dentro del clado de *B. subtilis* se encuentran numerosas especies de las que se destacan aquellas primeramente aisladas hace más de 40 años (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*) (Gordon, 1974; Priest *et al.*, 1987). La capacidad de producir sustancias bioactivas ha sido investigada con detenimiento dentro de este grupo, donde investigaciones recientes han identificado a través de programas informáticos predictivos más de 35 mil agrupaciones de genes biosintéticos en los genomas de especies pertenecientes a este grupo (Steinke *et al.*, 2021). La presencia de estos genes biosintéticos es mayor que en otros clados presentes en *Bacillus*, teniendo de media 13,1 genes biosintéticos en el genoma, mientras que en el clado de *B. cereus* o de *Bacillus megaterium* es de 11,7 y 7,4 de media (Xia *et al.*, 2022).

Dentro de este tipo de moléculas se pueden encontrar compuestos de diferentes naturalezas, los compuestos producidos por las bacterias del clado de *B. subtilis* se resume en la figura 1.22.

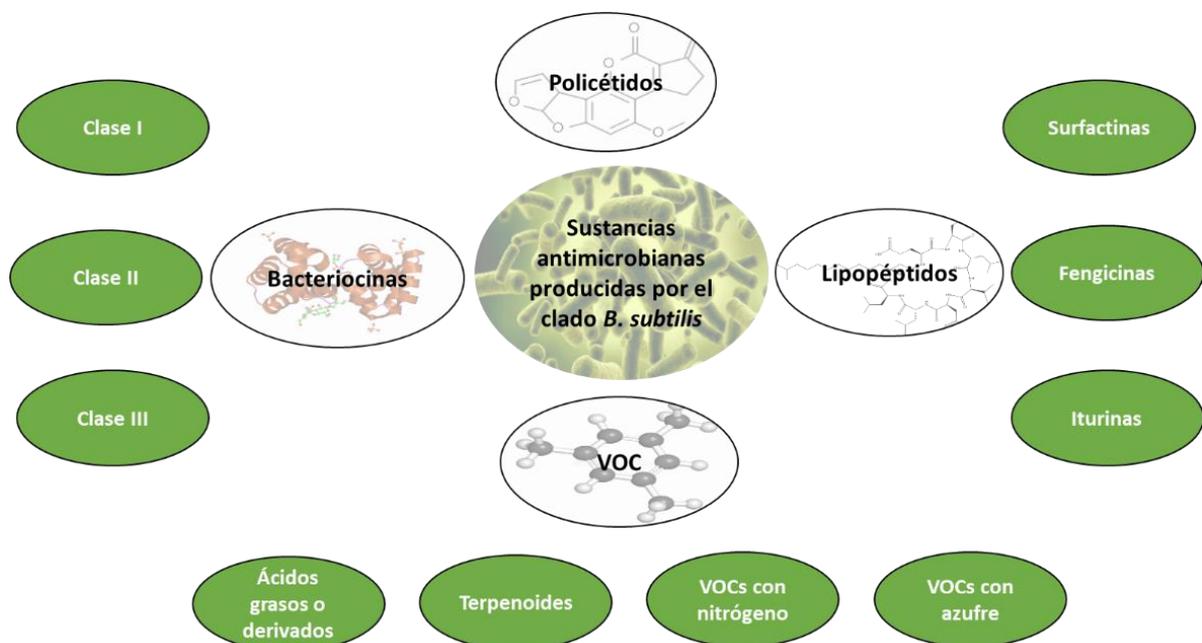


Figura 1.22. Compuestos antimicrobianos producidos por bacterias del clado de *B. subtilis*. Compuestos volátiles orgánicos (VOC).

Las **bacteriocinas** son péptidos de bajo peso molecular (entre 12 y 50 residuos aminoacídicos), con estabilidad al calor, modificaciones postraduccionales y típicamente

catiónicas. La gran cantidad de bacteriocinas sintetizadas, así como sus múltiples modos de acción y su variable composición las han clasificado en tres grupos principales (Caulier *et al.*, 2019; Mercado & Olmos, 2022).

- **Clase I:** también denominados lantibióticos son péptidos de bajo peso molecular, modificados post-traduccionalmente que contienen en su secuencia aminoacídica residuos de serina, treonina y cisteína, que serían necesarios para la formación de anillos lantionina y metilantionina, en los que reside, en algunos casos, su función. Dentro de este tipo de bacteriocinas se pueden dividir en cuatro grupos diferentes dependiendo de la su estructura secundaria, así como, por el mecanismo por el que actúan frente a otras células. La acción de este tipo de bacteriocinas suele estar mediada por la permeabilización de la membrana celular (clase I.1), inhibición de la síntesis de peptidoglicano (clase I.2 y clase I.3), inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN (clase I.2) o a través del cambio de polaridad de la membrana celular (clase I.4).
- **Clase II:** bacteriocinas con secuencias cortas, lineales, sin modificar post-traduccionalmente y con gran estabilidad a los cambios de pH y temperatura. Este tipo de bacteriocina se clasifican en tres grupos por unos motivos conservados en la zona N terminal que a su vez modifican su modo de acción, siendo las de clase II.1 tipo pediocina y actuando a través de la fosfoenolpiruvato manosa fosfotransferasa donde son capaces de inducir la muerte celular por medio de la apertura de un poro en esa enzima transmembrana, las de clase II.2 tipo turicina y produciendo la disipación del potencial de membrana y con ello la formación de poros y las de clase II.3 que no tienen ese dominio conservado y actúan por medio de la formación de poros transmembrana a través de una forma dependiente de la fuerza iónica.
- **Clase III:** son moléculas polipeptídicas, no modificadas y no resistentes a los cambios de temperatura que tienen actividad fosfolipasa causando alteraciones en la membrana celular.

Los **policétidos** son moléculas con una gran diversidad de funcionalidades posibles, sintetizadas por las **PKSs**. Existe una gran variedad de policétidos, que se distribuye entre bacterias, hongos y plantas. Dentro del clado *B. subtilis* se han encontrado únicamente tres bacillaena, difidina y macrolactina, con utilidad en la inhibición tanto de bacterias como de hongos (Caulier *et al.*, 2019).

Los **lipopéptidos** están formados por pequeñas cadenas cíclicas e hidrofílicas de péptidos unidas a cadenas hidrófobas de ácidos grasos. Debido a su naturaleza anfipática este tipo de molécula tiene numerosas aplicaciones, antibacteriana, antifúngico, antitumoral y antivírico. La síntesis de este tipo de moléculas viene dada por un complejo multienzimático, las **NRPSs**. Dentro del género *Bacillus* se distinguen 4 familias diferentes agrupadas debido a su cadena polipeptídica y a la cadena de ácidos grasos (Caulier *et al.*, 2019).

- **Surfactinas:** formadas por un heptapéptido con una secuencia proteica central característica, LLDLLDL, interconectada y unida a una cadena de beta-hidroxiácidos grasos formando una estructura de anillo lactona cíclico. Los diferentes tipos de surfactinas varían dependiendo de los residuos peptídicos en las posiciones 2, 4 y 7, así como en la longitud de las cadenas de ácidos grasos o su conformación final. Las surfactinas actúan a nivel de la bicapa lipídica a través de la solubilización de fosfolípidos, quelado de iones, modificación de la permeabilidad de membrana y la solubilización de la misma, teniendo efectos antibacterianos, antifúngicos y antivíricos (Caulier *et al.*, 2019; Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017).
- **Fengicinas:** formadas por decapeptidos unidos entre si a través de un anillo lactano, y a su vez unidos a una cadena de hidroxiácidos grasos. La actividad de estas moléculas se da a través de perturbaciones en la membrana y es principalmente antifúngica, siendo efectiva frente a numerosas especies diferentes de hongos y levaduras (Caulier *et al.*, 2019; Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017).
- **Iturinas:** formadas por un heptapéptido cíclico con una secuencia quiral LDDLLDL con un número restringido de aminoácidos (asparagina, glutamina, prolina, serina, treonina y tirosina) y unida por residuo  $\beta$ -aminoacídico a una cadena de ácidos grasos. Las iturinas presentan una gran actividad antifúngica (Caulier *et al.*, 2019; Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017).
- **Curstaquinas:** Es el último tipo de lipopéptido descubierto y se da, al contrario de lo anteriores, en especies pertenecientes al clado *B. cereus*. Formado por un heptapéptido con secuencia Thr-Gly-Ala-Ser-His-Gln-Gln, unido por enlace amino a una cadena de ácidos grasos y circularizado a través de un anillo de lactona. Su actividad se ha visto que es principalmente antifúngica (Béchet *et al.*, 2012; Caulier *et al.*, 2019).

El último grupo de compuestos de interés producidos por el clado *B. subtilis* son los compuestos volátiles, estos vienen dados como subproductos del metabolismo de la célula y están vinculados a numerosos procesos como los ciclos biogeoquímicos de elementos esenciales, comunicación célula-célula o mecanismos de defensa. Dentro de la gran variedad de compuestos volátiles producidos por las especies pertenecientes al clado *B. subtilis* estos se pueden empezar a clasificar entre compuestos volátiles inorgánicos (VIC) y compuestos volátiles orgánicos (VOC).

Los **compuestos volátiles inorgánicos (VIC)** están principalmente derivados del metabolismo primario de la bacteria, siendo compuestos carbonados, hidrogenados, sulfurados o nitrogenados como CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>, HCN, H<sub>2</sub>S, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> o NO. Estos compuestos han demostrado actividad antifúngica frente a numerosos patógenos de plantas y animales, además de inducir la respuesta sistémica adquirida en plantas, ayudando de esa forma a combatir enfermedades. Por otro lado, algunos de estos compuestos están vinculados a la resistencia de las bacterias a los antibióticos (Caulier *et al.*, 2019).

Los **compuestos volátiles orgánicos (VOC)** son compuestos de menos de 20 C, con baja masa molecular (50-100 Da), alta presión de vapor, baja temperatura de ebullición y con restos lipofílicos. Esto los convierte en sustancias fácilmente evaporables y con una alta capacidad de distribución, siendo su producción y distribución altamente dependiente de factores como temperatura, pH, estado fisiológico del microorganismo o nutrientes (Weisskopf *et al.*, 2021). La mayoría de los VOCs derivan del metabolismo de la glucosa, tanto en la glicolisis como en los procesos que la continúan, como el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), aunque también pueden ser derivados de otros procesos metabólicos como fermentaciones, degradación de aminoácidos, síntesis de terpenos o reducción de sulfuros. Entre ellos se pueden distinguir 5 categorías: **i)** ácidos grasos y derivados; **ii)** terpenoides; **iii)** VOC con nitrógeno; **iv)** VOC con azufre; y **v)** VOC con halógenos o metaloides.

Dentro del clado *B. subtilis* se ha demostrado la producción de todas las clases antes mencionadas, menos los VOC con halógenos y metaloides. La mayoría de ellos pertenecen a la primera clase, ácidos grasos y derivados, siendo a su vez clasificados según sea su naturaleza, hidrocarburos (alcanos, alquenos, alquinos) o carbohidratos (ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, furanos, quetonas, lactonas, bencenoides). Dentro de estos compuestos se han descrito actividad antibacteriana y antifúngica, así como la capacidad de estimular las defensas y la resistencia al estrés de las plantas (Tsotetsi *et al.*, 2022; Weisskopf *et al.*, 2021).

Entre las siguientes clases de VOCs, se conocen más de 2500 compuestos terpénicos que pueden ser secretados como VOCs siendo su función biológica hasta ahora desconocida. Dentro de *B. subtilis* se han descrito tres, isopreno, monoterpeno y  $\alpha$ -terpineol, teniendo actividad nematocida y frente a las cianobacterias. Los VOCs con nitrógeno pueden ser divididos entre compuestos ciclados (azoles, piracinas, piridinas, piridazinas y pirimidinas) y compuestos no ciclados (amidas, iminas y aminas), teniendo actividades antifúngicas y antibacterianas. Por último, se han descrito VOCs con azufre como disulfuro de dimetilo (DMDS), trisulfuro de dimetilo (DMTS), S-metil tioacetato o S-metil butanetioato con actividad antifúngica y nematocida en bacterias pertenecientes al clado de *B. subtilis* (Caulier *et al.*, 2019; Weisskopf *et al.*, 2021).

## 1.9. OBJETIVOS

Al inicio de esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.** Estudio del microbioma de la madera en degradación y caracterización de los microorganismos cultivables aislados.
- 2.** Análisis de las posibles aplicaciones industriales de los aislados microbianos.
- 3.** Caracterización ómica de los mejores candidatos seleccionados.



2. Material y métodos

Амапола.

Papaver rhoeas.



C. Urtubey

Amapola - *Papaver rhoeas*. Por: Carlos Urtubey. Archivo del Museo Nacional de Ciencias Naturales



## 2.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

### 2.1.1. Cepas bacterianas

En este apartado se describen las cepas bacterianas utilizadas durante esta tesis:

- ❖ ***Escherichia coli* DH5 $\alpha$** : cepa utilizada típicamente en la transformación por su alta eficiencia. Porta una deleción en el operón *LacZ*, permitiendo seleccionar transformantes a través de  $\alpha$ -complementación. Esta cepa se utilizó en los análisis de propiedades antibacterianas.
- ❖ ***Micrococcus luteus* ATCC 9341**: cepa sensible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, de estructura química penam, esta cepa se utilizó en los análisis de propiedades antibacterianas. En 2003 se reclasificó como *Kocuria rhizophila* (Tang & Gillevet, 2003).
- ❖ ***Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488**: principal especie productora del inmunosupresor tacrolimus. Su ADN se utilizó como control positivo en las PCR para la detección de genes biosintéticos (PKSs y NRPSs) en Actinobacterias.
- ❖ ***Bacillus pumilus* DEV1 (DEVA)**: cepa aislada de superficies metálicas de un puente de Madrid y caracterizada durante el proyecto BIOCORIN (<https://cordis.europa.eu/project/id/282881/es>).
- ❖ ***Bacillus pumilus* PsA(2)6 (PSA)**: cepa aislada de superficie metálica en la provincia de Pontevedra (España) y caracterizada durante el proyecto BIOCORIN.
- ❖ ***Bacillus pumilus* Meyer & Gottheil 1901 (DSM27)**: cepa de colección tipo para *B. pumilus* desde 1964 (Smith *et al.*, 1964).
- ❖ ***Bacillus pumilus* V17C11**: cepa aislada durante este trabajo desde madera en degradación de una muestra de Villavieja (León, España).
- ❖ ***Bacillus pumilus* P48C1**: cepa aislada durante este trabajo desde madera en degradación de una muestra de Brymarka (Trondheim, Noruega).

### 2.1.2. Cepas fúngicas

A continuación, se describen las cepas fúngicas utilizadas durante esta tesis:

- ❖ ***Aspergillus brasiliensis* Varga *et al* CECT 2700 (ATCC9642)** : cepa con actividad celulasa y xilanasas (Moran-Aguilar *et al.*, 2021), representativa de la degradación blanda de la madera (Hamed, 2013). Recomendada para análisis de soluciones preservadoras de la madera. Se utilizó en el análisis de actividad antifúngica frente a cepas degradadoras de la madera.

- ❖ ***Coniophora puteana* (Fries) Karsten DSM 3085 (ATCC 36336)**: cepa representativa de la degradación parda de la madera (Voda *et al.*, 2003). Se utilizó en el análisis de actividad antifúngica frente a cepas degradadoras de la madera.
- ❖ ***Trametes versicolor* (Linnaeus: Fries) Pilát DSM 3086**: cepa representativa de la degradación blanca de la madera (Tišma *et al.*, 2021). Se utilizó en el análisis de actividad antifúngica frente a cepas degradadoras de la madera.
- ❖ ***Aureobasidium pullulans* (de Barry) Arnaud (ATCC 9348)**: cepa representativa de coloración azul de la madera (M.-J. Kim *et al.*, 2020). Se utilizó en el análisis de actividad antifúngica frente a cepas degradadoras de la madera.
- ❖ ***Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (ATCC 9480)**: cepa de colección con alta producción de penicilina. Se utilizó en el análisis de actividad antifúngica frente a cepas degradadoras de la madera (Hamed, 2013). Fue reclasificada como *Penicillium rubens* por Houbraken *et al.* (2011).
- ❖ ***Penicillium chrysogenum* ASP-P-78**: cepa de alta producción de penicilina cedida por Antibióticos S.A. Su ADN se utilizó como control positivo en las PCR para la detección de genes biosintéticos en hongos.
- ❖ ***Penicillium rubens* B13**: cepa derivada de *P. rubens* Wisconsin 54-1255 con una mayor expresión de PrFaeA (García-Calvo *et al.*, 2023). Se utilizó como control positivo en los análisis de actividad enzimática.
- ❖ ***Fusarium oxysporum* PDA(2)2 (Colección de INBIOTEC)**: cepa aislada de superficies metálicas originarias de una zona costera de clima atlántico y caracterizada durante el proyecto BIOCORIN (La Coruña, España). Utilizada para analizar la capacidad antifúngica de cepas de *B. pumilus*.

## 2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron medios de cultivo para el crecimiento, cultivo y propagación de hongos y bacterias que fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 minutos como norma general. Las soluciones que no pudieron ser esterilizadas en autoclave, fueron filtradas (0,22 µm de diámetro de poro) (Millipore).

Seguidamente, se especifican las cantidades para la preparación de 1 L de cada uno de los medios. Todos los medios fueron elaborados con agua destilada.

### 2.2.1. Medios de cultivo bacterianos

- ❖ **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972). Utilizado tanto en sólido, en el mantenimiento de cepas aisladas de madera en degradación y en bioensayos de volátiles, como en líquido en el cultivo de *B. pumilus*.

Triptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g

Ajustar el pH a 7,5. Para su utilización como medio sólido (**LA**) añadir 20 g de agar.

- ❖ **Medio Terrific-Broth (TB)** (Tartoff & Hobbs, 1987). Utilizado en líquido para el cultivo de *B. pumilus*.

Extracto de levadura	24,0 g
Triptona	12,0 g
Glicerol	4,0 ml

Añadir agua destilada hasta 900 ml. Después de esterilizar añadir 100 ml de una solución esterilizada por filtración de:  $K_2HPO_4$  720 mM (12,54 g/100 ml) y  $KH_2PO_4$  170 mM (2,31 g/100 ml).

- ❖ **Medio Nutrient Broth (NB)** (Eaton *et al.*, 1988). Utilizado en medio sólido para el aislamiento de bacterias desde madera en degradación, cultivo de aislados y mantenimiento de cepas, y en medio líquido para el cultivo de cepas de *B. pumilus*.

Peptonas	10,0 g
Extracto de carne	1,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
NaCl	5,0 g

Ajustar el pH a 6,8. Para su utilización como medio sólido (**NA**) añadir 20 g de agar.

- ❖ **Medio Tryptic Soy Broth (TSB)** (Barnes & Shrimpton, 1958). Medio utilizado tanto en sólido como en líquido. En líquido para el cultivo de cepas bacterianas indicadoras (*M. luteus* y *E. coli*) y *B. pumilus*, en sólido para el cultivo y mantenimiento de cepas bacterianas de madera en degradación, *B. pumilus* y para la realización de bioensayos.

Peptona de caseína	17,0 g
NaCl	5,0 g
Peptona de soja	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glucosa	2,5 g

Ajustar el pH a 7,3. Para su utilización como medio sólido (**TSA**) añadir 20-25 g de agar para obtener una concentración final de 2,0%-2,5%. La cantidad de agar dependerá del uso, en aislamiento y mantenimiento de cepas al 2,0%, o en la elaboración de los bioensayos donde es recomendable utilizarlo al 2,5%.

- ❖ **Medio completo NYG** (Daniels *et al.*, 1984). Medio tradicionalmente utilizado para el cultivo del género *Xanthomonas*. Se utilizó como medio de testeo en el crecimiento de *B. pumilus*.

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g

- ❖ **Medio 2xTY** (Sambrook & Russell, 2001). Medio utilizado durante la puesta a punto del crecimiento de *B. pumilus*.

Triptona	1,6 g
Extracto de levadura	10,0 g
NaCl	5,0 g

Ajustar pH a 7,2.

- ❖ **Medio R2A** (Reasoner & Geldreich, 1985). Medio sólido utilizado para el aislamiento de bacterias de madera en degradación.

Extracto de levadura	0,5 g
Proteosa peptona nº3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Piruvato de sodio	0,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Agar	15 g

Ajustar el pH a 7,2.

- ❖ **Medio ISP4 (*International Streptomyces Project 4*)(Difco™)** (Shirling & Gottlieb, 1966a). Medio sólido comercial utilizado para la esporulación de *Streptomyces*. Durante este trabajo se probó para el aislamiento de bacterias de madera en degradación.

Almidón soluble	10,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub>	1,0 g
NaCl	1,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
CaCO <sub>3</sub>	2,0 g
Agar	20,0 g

Elementos traza: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mg. Medio preparado comercialmente donde solo es necesaria la disolución de 37 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH se ajusta a 7,2.

- ❖ **Medio *Sporulation Bacillus Media* (SBM)** (Donnellan *et al.*, 1964). Medio utilizado para promocionar la esporulación en *B. pumilus*.

FeCl <sub>2</sub>	0,046 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68,0 mg
MgSO <sub>4</sub>	4,8 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	96,5 mg
MnCl <sub>2</sub>	12,6 mg	CaCl <sub>2</sub>	0,219 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,535 g	Ácido L-glutámico	2,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,106 g	L-triptófano	20,0 mg

Ajustar el pH a 7,1.

### 2.2.2. Medios de cultivo fúngicos

- ❖ **Medio *Potato Dextrose Broth* (PDB)** (MacFaddin, 1985). Medio utilizado en líquido y en sólido. En líquido como medio de testeo en el crecimiento de *B. pumilus*. En sólido para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de hongos aislados de madera en degradación.

Infusión de patata	200,0 g
Dextrosa	20,0 g

Ajustar el pH a 5,6. Medio preparado comercialmente donde solo es necesaria la disolución de 39 g de mezcla sólida (Pronadisa) en 1 litro de agua destilada. Para su utilización como medio sólido (**PDA**) añadir 15 g de agar.

- ❖ **Medio Malt Extact Agar (MEA)** (Haley & Callaway, 1978). Medio utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Extracto de malta	13,0 g
Dextrina	2,5 g
Peptona de gelatina	5,0 g
Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 5,5. Medio preparado comercialmente (Scharlau) donde solo es necesaria la disolución de 35,5 g de la mezcla sólida en 1 litro de agua destilada.

- ❖ **Medio Complete Medium (CM)** (Moralejo *et al.*, 1999). Medio utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Glucosa	5,0 g
Extracto de malta	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Agar	20,0 g

- ❖ **Medio Malt Extract Broth Agar (EM)** (Rapp, 1974). Medio utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Maltosa	1,8 g
Extracto de malta	6,0 g
Glucosa	6,0 g
Extracto de levadura	1,2 g

Ajustar el pH a 4,7. Medio preparado comercialmente (CultiMed) donde solo es necesaria la disolución de 19 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. Para su utilización como medio sólido añadir 15 g de agar.

- ❖ **Medio Cornmeal Agar (CMA)** (Pollack & Benham, 1957). Medio utilizado para el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Extracto de harina de maíz	2,0 g
Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 6,0.

- ❖ **Medio *Water Agar* (WA)** (MacFaddin, 1985). Medio muy simple usado en el cultivo de algunos hongos. Utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Agar	20,0 g
------	--------

- ❖ **Medio *Plate Count Agar* (PCA)** (Oliver *et al.*, 2012). Medio normalmente utilizado para recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en placa. Utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 7,0.

- ❖ **Medio *Yeast Extract Malt Extract* (YEME)** (Haley & Callaway, 1978). Medio sólido utilizado en los bioensayos frente a hongos degradadores de la madera y para mantenimiento de levaduras aisladas de madera.

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	5,0 g
Extracto de malta	3,0 g
Glucosa	10,0 g
Agar	15,0 g

- ❖ **Medio *CHROMagar<sup>TM</sup> Candida* (CAC)**. Medio comercial utilizado para la detección e identificación de especies del género *Candida*. Se utilizo en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Mezcla cromogénica	22,0 g
Peptona	10,2 g
Cloranfenicol	0,5 g
Agar	15,0 g

Ajustar pH a 6,1. Medio preparado comercialmente (CHROMagar<sup>TM</sup>) donde solo es necesaria la disolución de 47,7 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada Para su preparación calentar hasta ebullición removiendo regularmente. No esterilizar en autoclave ni calentar más de 100 °C.

- ❖ **Medio *Mold inhibitory Broth Agar* (MIA).** Medio utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Caseína peptona	3,0 g	Dextrosa	5,0 g
Fosfato de sodio	2,0 g	Cloruro sódico	0,04 g
Peptona animal	2,0 g	Almidón soluble	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,8 g	Sulfato de manganeso	0,16 g
Extracto de lavadura	5,0 g	Dextrina	1,0 g
Sulfato ferroso	0,04 g	Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 6,7.

- ❖ **Medio *Czapek-Dox* (Cz-Dox) (Dox, 1910).** Medio de crecimiento para la propagación y aislamiento de hongos. Se utilizo en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Sacarosa	30,0 g
Nitrato sódico	2,0 g
Magnesio glicerofosfato	0,5 g
Potasio sulfato	0,35 g
Cloruro potásico	0,5 g
Sulfato ferroso	0,01g
Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 6,8. Medio preparado comercialmente (MERCK) donde solo es necesaria la disolución de 50 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada.

- ❖ **Medio PMMY (Fierro *et al.*, 1996).** Medio utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación, y para el cultivo y mantenimiento cepas de *Penicillium*.

Glucosa	40,0 g
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
KCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g

Ajustar el pH a 6,0.

- ❖ **Medio Sabouraud Dextrose Broth (SDB)** (MacFaddin, 1985). Medio no selectivo para cultivo de hongos, en especial dermatofitos. Utilizado en medio sólido y líquido. En sólido en el aislamiento de hongos de madera en degradación y en líquido como medio de testeo en el crecimiento de *B. pumilus*.

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Dextrosa	40,0 g

Ajustar el pH a 5,6. Medio preparado comercialmente (Labkem) donde solo es necesaria la disolución de 65 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. Para su utilización como medio sólido (SDA) añadir 20 g de agar.

- ❖ **Medio Glucose Yeast Peptone Broth (GPY)** (Kurtzman *et al.*, 2011). Medio normalmente utilizado para el aislamiento de levaduras. Se utilizó como medio de verificación en el crecimiento de *B. pumilus*.

Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	20,0 g

Ajustar el pH a 7,0.

- ❖ **Medio Malt Agar (MA)**. Medio desarrollado por MICROKIT para el cultivo de hongos y levaduras (DMT077).

Extracto de malta	30,0 g
Agar	15,0 g

Ajustar pH a 5,5.

- ❖ **Medio Sabouraud Agar (SA)** (MacFaddin, 1985). Utilizado en el aislamiento de hongos de madera en degradación.

Digerido pancreático de caseína	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Glucosa	40,0 g
Agar	15,0 g

Ajustar el pH a 5,8. Medio preparado comercialmente (Bio-Rad) donde solo es necesaria la disolución de 42 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada.

- ❖ **Medio Ethyl Ferulate Medium (EF) con purpura de bromocresol** (García-Calvo, 2018). Medio sólido empleado para la búsqueda de nuevas actividades feruloil esterasas (FAE) en cepas fúngicas. Se compone de dos soluciones que se esterilizan por separado. La solución A por autoclave.

<b>Solución A</b>	
Bacto-Agar	10,0 g
Solución concentrada de purpura de bromocresol <sup>I</sup>	1,5 mL

La **solución B** (etil ferulato 0,5 g en 10 mL de etanol absoluto) se esteriliza mediante filtros de 0,22 µm (Millipore).

Para su preparación, atemperar **la solución A** a 50 °C y añadir 3,75 mL de la **solución B** por cada 100 mL de **solución A**. El color del medio debe ser púrpura, si es anaranjado, ajustar el pH con 7,5-15,0 µL de NaOH 2 N por cada 100 mL de medio.

- ❖ **Medio Cellulose Basal Medium (CBM)** (Abreham *et al.*, 2016). Medio con celulosa soluble en el para la caracterización de la actividad celulasa en cepas de hongos.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,0 g
KCl	0,5 g
KHPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Celulosa	15,0 g
Pentosa	0,2 g
Agar	20,0 g

- ❖ **Medio Yeast Extract Peptone Dextrose Broth (YPD)** (Kurtzman *et al.*, 2011). Se utilizo como medio de testeo en el crecimiento de *B. pumilus*.

Bacto-peptona	20,0 g
Extracto de levadura	10,0 g

Disolver los componentes en 900 mL y añadir 100 mL de solución concentrada de dextrosa (D 10x)<sup>2</sup>, previamente esterilizada por filtración.

---

<sup>I</sup> Solución concentrada de púrpura de bromocresol: 0,4 % (p/v) púrpura de bromocresol en agua destilada.

<sup>2</sup> Solución concentrada de dextrosa (D 10x): 20% (p/v) dextrosa (D-dextrosa), agua destilada.

- ❖ **Medio Carboximethylcellulose 1 (CMC)** (Abreham *et al.*, 2016). Medio con carboximetilcelulosa soluble, usado en la caracterización de la actividad endoglucanasa en cepas de hongos.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,0 g
KCl	0,5 g
KHPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Carboximetilcelulosa (CMC)	10,0 g
Pentosa	0,2 g
Agar	20,0 g

### 2.2.3. Aditivos de medios de cultivo.

Los aditivos fueron antibióticos, antifúngicos o compuestos que retrasaban el crecimiento de los hongos más invasivos. Los antibióticos y antifúngicos se esterilizaron por medio de filtración (0,22 µm) (Fisherbrand, Millipore).

- ❖ **Cloranfenicol.** Antibiótico preparado en etanol absoluto como solución concentrada de 50 mg/mL. En el aislamiento desde madera en degradación se utilizó a una concentración final de 100 µg/mL.
- ❖ **Pimaricina.** Antifúngico preparado en agua MQ como solución concentrada a 10 mg/mL. En el aislamiento desde madera en degradación se utilizó a una concentración final de 60 µg/mL.
- ❖ **Rosa de Bengala.** Colorante bifuncional que inhibe el crecimiento bacteriano a la vez que retrasa el crecimiento de hongos invasivos. Concentración final utilizada en los medios de cultivo 5 mg/mL.

## 2.3. EQUIPAMIENTO

### 2.3.1. Equipamiento para microbiología

- ❖ **Cabinas de flujo laminar:** Todo el manejo de microorganismos se realizó en cabinas de flujo laminar vertical es Telstar AV-100 (Telstar Life Sciences, Terrassa, España) para evitar contaminaciones.
- ❖ **Agitadores orbitales.** Para el cultivo líquido de microorganismos se utilizaron agitadores orbitales como:
  - Agitador orbital INNOVA 4230 (New-Brunswick Scientific).

- Agitador orbital FORMA 480 (Thermo Electron Corporation, actualmente ThermoFisher Scientific).

### 2.3.2. Equipamiento para biología molecular.

- ❖ **Termocicladores.** La realización de las PCR en la detección de genes biosintéticos se llevó a cabo en termocicladores tipo:
  - Termociclador Biometra Thermocycler T Gradient ThermoBlock (Biometra, Goettingen, Alemania).
  - Termociclador Biometra TProfessional Basic Gradient PCR Thermocycler (Biometra).
- ❖ **Equipos de electroforesis.** Para la realización de electroforesis en geles de agarosa se emplearon:
  - Fuente de alimentación PowerPac 300 (Bio-Rad).
  - Cubeta de electroforesis horizontal Sub-cell® GT (Bio-Rad).
  - Cubeta de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad).
  - Cubeta de electroforesis horizontal Wide Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad).
- ❖ **Transiluminador de UV.** La visualización de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio fue posible gracias a:
  - Transiluminador de luz UV ECX-26-M ( $\lambda = 312$  nm. Vilber Lourmat. Francia).
  - Sistema de documentación de geles VWR Smart3 (VWR). Equipamiento para la visualización de los geles teñidos con bromuro de etidio en tiempo real a través de un transiluminador de luz UV ( $\lambda = 302$  nm). Incluye equipo fotográfico y software de modificación simple de las imágenes obtenidas.
- ❖ **Equipamiento para cuantificación y análisis de calidad de ácidos nucleicos.** Para el análisis y cuantificación del ADN extraído de las muestras se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.3.3. Equipamiento para estudios de proteómica.

- ❖ **Sistema para homogenización y ruptura de células:** SAVANT BIO 101 FastPrep FP120 (ThermoSavant).
- ❖ **Electroforesis monodimensional de proteínas:**
  - Fuente de alimentación PowerPac 300 (Bio-Rad).

- Cámara de electroforesis y sistema de polimerización de geles Mini-Protean II (Bio-Rad).
- ❖ **Electroforesis bidimensional:**
  - Unidad para separación de proteínas por isoelectroenfoque (IEF) EttanIPGphor II.
  - Sarcófagos (*strip holders*) para tiras Immobiline™ DryStrip y Sistema de IEF EttanIPGphor II.
  - Tiras Immobiline™ DryStrip de 7 cm y de 18 cm, con gradiente de pH inmovilizado de 4,0 a 7,0 no lineal.
  - Sistema de electroforesis Ettan DALTsix (GE Healthcare): permite la preparación y polimerización de geles; cámara de electroforesis para separación de proteínas (segunda dimensión); fuente de alimentación/unidad de control EPS 601.
  - Refrigerador por circulación MultiTemp III Thermostatic Circulator, 230 VAC (GE Healthcare).
  - Ettan™ DIGE Imager (GE Healthcare) con filtros *CyDye* y software para el análisis de imágenes de geles bidimensionales de proteínas *DeCyder™ differential analysis v.7.0* (GE Healthcare).
  - ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences). Escáner para obtener imágenes de los geles en el espectro visible.
- ❖ **Espectrometría de masas.** Para la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas. Espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (AB Sciex).

#### 2.3.4. Equipamiento de uso general.

- ❖ **Centrífugas:**
  - Centrífuga Sorvall RC-5B Plus (Sorvall, Newtown, Connecticut, EEUU), rotor tipo GSA y tipo SS34.
  - Centrífuga de mesa ALLEGRA 21R (Beckman Coulter). Refrigerada, tubos 50 mL.
  - Centrífuga de mesa ALLEGRA X22R (Beckman Coulter). Refrigerada, tubos 10 mL.
  - Centrífuga de mesa 5810R (Eppendorf). Refrigerada, tubos 10 mL y Falcon 50 mL.

- Centrífugas de mesa 5415R (refrigerada), 5415C y 5415D (Eppendorf). microtubos de 1,5 y 2,2 mL.
- ❖ **Espectrofotómetros de luz UV-Visible** U-2900 y U-2001 (Hitachi. Tokio, Japón). Para medir la densidad óptica de cultivos, así como realizar la cuantificación por el método de Bradford.
- ❖ **Centrífugas evaporadoras de solventes (*Speedvac*):**
  - SVC-100H Speedvac SC-110 (Savant Instruments Inc. Hicksville, Nueva York, EEUU).
  - RC10.10 (Jouan SA. Saint-Herblain, Pays de la Loire, Francia).
- ❖ **Termobloque.** Thermomixer Comfort, 1,5 ml (Eppendorf).
- ❖ **Microscopios:**
  - Microscopio óptico Olympus BX60 (Olympus).

## 2.4. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

### 2.4.1. Cepas bacterianas

El cultivo de la mayoría de las cepas bacterianas se realizó en medio sólido (NA, TSA o LA) a 25 °C. El cultivo en medio líquido se realizó en las cepas de *B. pumilus* y en las cepas indicadoras *E. coli* y *M. luteus*. El cultivo de estas dos últimas se realizó en 100 mL de medio TSB en matraces de 500 mL a 37 °C y 200 rpm.

Para el cultivo de las cepas de *B. pumilus* se utilizaron diferentes medios de cultivo (apartado 2.2), las temperaturas que oscilaron entre los 20-35 °C y la agitación varió entre 150 rpm a 250 rpm.

Para la conservación de las cepas bacterianas cortos periodos de tiempo se utilizaron placas de cultivo con medio (NA, TSA o LA) protegidas por Parafilm y conservadas a 4 °C. Estos cultivos fueron resembrados periódicamente para su utilización. Para la conservación de largos periodos de tiempo las cepas fueron suspendidas a una concentración final de 20% de glicerol y guardadas en viales de criogenización a -20 °C y -80 °C. Además, algunas de las cepas fueron liofilizadas para una mejor conservación en el tiempo.

El control del crecimiento en medio líquido se determinó por método turbidimétrico, midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm en espectrofotómetro (densidad óptica).

## 2.4.2. Cepas fúngicas

El cultivo de los hongos filamentosos aislados de madera en degradación se realizó en medio sólido PDA. Las cepas indicadoras para los análisis de antagonismo se cultivaron en medio sólido TSA (*A. brasiliensis*, *A. pullulans* y *P. chrysogenum*) y YEME (*C. puteana* y *T. versicolor*). El cultivo para la obtención de los caldos fermentativos de las diferentes cepas analizadas de *Penicillium* se realizó: **i)** siembra en medio sólido Power 2 a 25 °C durante una semana, **ii)** recogida del micelio e inóculo en 50 mL de medio PMMY en matraces de 250 mL, **iii)** incubar 96 horas a 25 °C y 250 rpm.

Para la conservación cortos periodos de tiempo se utilizaron placas de Petri con medio sólido PDA selladas con Parafilm y conservadas a 4 °C. Para la conservación largos periodos de tiempo se recogieron esporas y/o micelio que fue suspendido en glicerol 40% y congelado a -20 °C y -80 °C. Algunas cepas fueron liofilizadas para su mejor conservación largos periodos de tiempo.

## 2.5. REACTIVOS QUÍMICOS

### 2.5.1. Reactivos para biología molecular

#### Enzimas

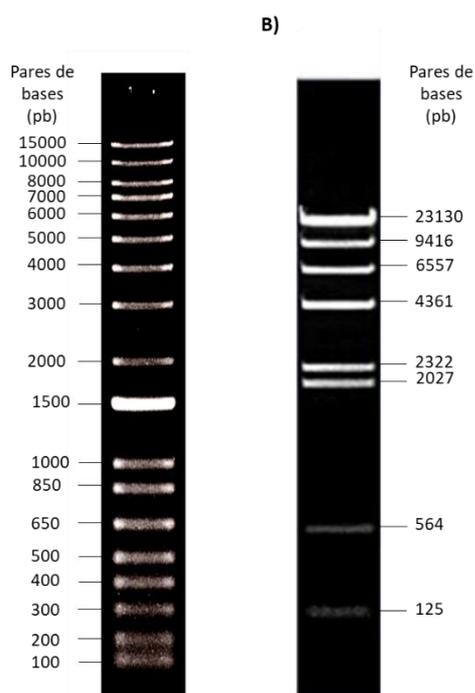
- ❖ **ADN polimerasa GoTaq® G2 Flexi (Promega).** Para la realización de las reacciones de PCR.
- ❖ **RNase A (Promega).** Para eliminar el ARN en las muestras de ADN, usando durante en la extracción de ADN.

#### Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular permitieron conocer el tamaño de las bandas de ADN amplificadas, así como una estimación de la cantidad de genoma en algunos casos. Los marcadores utilizados durante este trabajo se exponen en la figura 2.1.

- ❖ **1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).** Marcador comercial preferentemente utilizado en los geles de electroforesis. Presenta bandas que van desde 100 pb a 15000 pb. Para su utilización el marcador se diluye en tampón TE<sup>3</sup> a una concentración de 50 ng/μL, del que se emplean 8 μL por gel.
- ❖ **λH DNA Molecular Weight Marker.** Marcador procedente de la digestión del ADN bacteriófago λ con la enzima de restricción *HindIII*. Presenta bandas desde 125 pb a 23130 pb.

**3 Tampón TE.** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mM, pH 8,0; agua destilada.



**Figura 2.1. Marcadores de peso molecular usados en biología molecular.** Las líneas indican el peso en pares de bases (pb). **A)** 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). **B)** λH DNA Molecular Weight Marker.

### Cebadores

Durante esta tesis se utilizaron cebadores con pares de bases degenerados, las notaciones de nucleótidos según Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC: *Union of Pure & Applied Chemistry*) se resumen en la tabla 2.1. Los cebadores utilizados para la secuenciación de las cepas obtenidas de madera y en el análisis metagenómico se agrupan en la tabla 2.2 y los usados para la búsqueda de genes biosintéticos en Actinobacterias y *Penicillium* se agrupan en las tablas 2.3 y 2.4.

**Tabla 2.1. Representación de los pares de bases degeneradas o “ambiguas” según IUPAC.**

Descripción	Símbolo	Bases representadas			
		A	C	G	T
Débil	W	A			T
Fuerte	S		C	G	
Amino	M	A	C		
Ceto	K			G	T
Purine	R	A		G	
Pyrimidina	Y		C		T
No es A	B		C	G	T
No es C	D	A		G	T
No es G	H	A	C		T
No es T	V	A	C	G	
Cualquier base	N	A	C	G	T
Cero	Z				

**Tabla 2.2: Cebadores utilizados para la identificación de especies. A)** Cebadores usados para la generación de amplicones en librerías de secuencias metagenómicas de bacterias (16S) o de hongos (ITS2). **B)** Cebadores usados durante la secuenciación tipo Sanger para identificar los microorganismos cultivables (bacterias: 27F/192R y hongos: ITS1/ITS4).

<b>A)</b>			
Cebadores	Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
16S-1	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GA~T GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3'	(Klindworth <i>et al.</i> , 2013)	~402-427 bp
16S-2	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'		
ITS2-1	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	(Ihrmark <i>et al.</i> , 2012)	~200-300 bp
ITS2-2	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGT GAA TCA TCG AAT CTT TG-3'		
<b>B)</b>			
Cebadores	Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	(Lane, 1991)	1000-1500 bp
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	(Turner <i>et al.</i> , 1999)	
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	(White <i>et al.</i> , 1990)	400-600 bp

**Tabla 2.3: Grupos de cebadores degenerados para la búsqueda de PKSs y NRPSs en Actinobacterias.** Los cebadores generados siguen las indicaciones IUPAC.

Cebadores	Policétido sintasas (PKSs) Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
K1F	5'-TSA AGT CSA ACA TCG GBC A-3'	(Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005)	(1200-1400 pb) PKSI
M6R	5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3'		
KSF	5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3'	(Metsä-Ketelä <i>et al.</i> , 1999)	(600-650 pb) PKSII
KSR	5'TGG AAN CCG CCG AAB CCT CT-3'		
Cebadores	Sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
A3F	5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS G-3'	(Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005)	(700-800 pb) NRPS
A7R	5'-SAS GTC VCC SGT SCG GTA S-3'		

Tabla 2.4: Grupos de cebadores degenerados para la búsqueda de PKSs y NRPSs en *Penicillium*. Los cebadores generados siguen las indicaciones IUPAC.

Cebadores	Policétido sintasas (PKSs) Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
<u>Serie KA (cetosintasa-aciltransferasa)</u>			
<b>KAF1F</b>	5'-GAR KSI CAY GGI ACI GGI AC-3'	(Amnuaykanj anasin <i>et al.</i> , 2005)	(700-800 pb). PKS altamente reducidos tipo lovastatina ( <i>HR-PKS</i> )
<b>KAR2R</b>	5'-CCA YTG IGC ICC YTG ICC IGT RAA-3'	(Amnuaykanj anasin <i>et al.</i> , 2005)	
<b>KAF2F</b>	5'-GAR GCI CAY GCI ACI TCI AC-3'	(Amnuaykanj anasin <i>et al.</i> , 2005)	(700 pb). PKS parcialmente reducido tipo ácido metilsacílico ( <i>MSAS-type</i> )
<b>KAR1R</b>	5'-CCA YTG IGC ICC RTG ICC IGA RAA-3'	(Amnuaykanj anasin <i>et al.</i> , 2005)	
<u>Serie LC PKS</u>			
<b>LC3F</b>	5'-GCI GAR CAR ATG GAY CCI CA-3'	(Bingle <i>et al.</i> , 1999)	(680 pb) PKS parcialmente reducido tipo ácido metilsacílico ( <i>MSAS-type</i> )
<b>LC5R</b>	5'-GTI GAI GTI GCR TGI GCY TC-3'	(Bingle <i>et al.</i> , 1999)	
<b>LC1F</b>	5'-GAY CCI MGI TTY TTY AAY ATG-3'	(Bingle <i>et al.</i> , 1999)	(720 pb) PKS no reducido tipo wA ( <i>wA-type</i> )
<b>LC2R</b>	5'-GTI CCI GTI CCR TGC ATY TC-3'	(Bingle <i>et al.</i> , 1999)	
Cebadores	Sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) Secuencia	Ref.	Fragmento de PCR
<b>AUG003F</b>	5'-CCG GCA CCA CCG GNA ARC CHA A-3'	(Slightom <i>et al.</i> , 2009)	(1100 pb) NRPS
<b>AUG007R</b>	5'-GCT GCA TGG CGG TGA TGS WRT SNC CBC C-3'	(Slightom <i>et al.</i> , 2009)	

## 2.5.2. Reactivos para proteómica

Para el análisis de las proteínas diferencialmente expresadas en las distintas cepas/tiempos en *B. pumilus* se utilizaron los siguientes reactivos.

- ❖ **Marcador de masa molecular.** Para conocer el peso de las proteínas en los geles de SDS-PAGE se utilizó el marcador comercial *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad). Este contiene proteínas pre-teñidas de tamaños entre 10 y 250 kDA.

❖ **Otros reactivos compartidos:**

- **Cóctel de Inhibidores de Proteasas cOmplete™ (Roche).** Inhibir la acción de diversos tipos de proteasas en los pasos de extracción de proteínas.
- **Reactivo para la cuantificación de proteínas basado en el método de Bradford (Bio-Rad).** Colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 que se une a las proteínas y permite de esta manera su cuantificación.
- **Buffer IPG (PlusOne, GE Healthcare).** Tampón usado para la realización del isoelectroenfoque en tiras *Immobiline™ DryStrip*.
- **Glicina (PlusOne, GE Healthcare).** Parte del tampón SDS-PAGE.
- **Persulfato de amonio (PlusOne, GE Healthcare).** Catalizador de la reacción de polimerización de la acrilamida/bis-acrilamida para la preparación de los geles de SDS/PAGE.
- **Tetrametiletilendiamina (TEMED) (PlusOne, GE Healthcare).** Compuesto polimerizador de la acrilamida/bis-acrilamida para la preparación de los geles de SDS/PAGE.
- **SDS (PlusOne, GE Healthcare).** Detergente aniónico que distorsiona la conformación de las proteínas permitiendo que linealicen y migren únicamente por su masa. Parte del tampón SDS-PAGE.
- **Iodoacetamida (PlusOne, GE Healthcare).** Agente alquilante que se une de forma covalente a los tioles de las proteínas impidiendo la formación de puentes disulfuro.
- **Tris (PlusOne, GE Healthcare).** Tris(hidroximetil)aminometano, utilizado ampliamente en la formulación de tampones.
- **Urea (PlusOne, GE Healthcare).** Agente desnaturizante que forma parte de algunos tampones usados.
- **CHAPS (PlusOne, GE Healthcare).** Detergente zwitteriónico especialmente adecuado para proteger el estado nativo de las proteínas.
- **Ditiotreitol (DTT) (PlusOne, GE Healthcare).** Agente reductor utilizado para romper puentes disulfuro.
- **Azul de bromofenol (PlusOne, GE Healthcare).** Colorante usado en los tampones de rehidratación para poder ver el avance en la carrera proteica dentro del gel SDS-PAGE durante el isoelectroenfoque.
- **Aceite de cobertura mineral (PlusOne, GE Healthcare).** Aceite que minimiza la evaporación evitando la deshidratación de las muestras durante el isoelectroenfoque de los DryStrip.

- **N,N-dimetilformamida anhidra (99,8%) (Sigma Aldrich)**. Solvente orgánico utilizado en la solubilización de los marcadores de fluorescencia *CyDye*.
- **Acetonitrilo (AcN)**. Disolvente polar usado durante la digestión de los puntos proteicos.
- **Ácido trifluoroacético (TFA)**. Usado en la extracción de péptidos tras la digestión y su estabilización.
- **Tripsina (*sequencing grade modified trypsin*, Promega)**. Serín proteasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis en sitios concretos. Después de lisina (K) o arginina (R) si no van precedidas de prolina (P), para formar péptidos de menor tamaño y/o aminoácidos.

### 2.5.3. Conjuntos de reactivos (kits)

Muchos de los procedimientos durante este trabajo se realizaron con ayuda de “kits” comerciales como lo que se presentan a continuación.

- ❖ **Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega)**. Usado para la extracción de ADN.
- ❖ **2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare)**. Usado para la purificación de las proteínas extraídas de *B. pumilus* antes de su marcaje.
- ❖ **CyDye DIGE Fluor Minimal Dye Labeling Kit (GE Healthcare)**. Usado para el marcaje de las muestras de proteómica.

## 2.6. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE MADERA EN DEGRADACIÓN

El primer objetivo de este estudio fue el aislamiento y la identificación de microorganismos procedentes de la madera en degradación. Dentro de ésta se intentó, siempre que fue posible, el aislamiento de microorganismos desde las tres zonas que la componen, la corteza externa, el *cambium* (o corteza interna) y el *duramen*, tal y como se muestran en la figura 3.1.

Todos los materiales utilizados fueron esterilizados con antelación, bien por autoclave, flameado o con etanol, y todo el procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar a temperatura ambiente.

### 2.6.1. Recogida de muestras

Recoger piezas, troncos, palos de madera en degradación de diferentes especies arbóreas, distintas partes del bosque (regiones húmedas y soleadas) y con distintos estados de

degradación, anotar toda la información con respecto a las muestras recogidas (lugar, fecha, estado de degradación, especie de árbol) para poder realizar una base de datos. Para cortar aquellas piezas de madera demasiado grandes para su análisis y transporte es aconsejable utilizar un hacha o una sierra, hay que tener en cuenta que únicamente se analizará una pequeña parte de la madera, por lo que el tamaño debe oscilar entre los 10 cm y 30 cm.

Para poder realizar un aislamiento de las tres zonas (corteza, cambium y duramen) es necesario que las piezas recogidas las contengan. Por ello, prestar atención a fragmentos de madera con corteza y duramen. Las muestras de duramen muy degradadas pueden no contener alguna de las otras zonas, buscar en lugares cercanos a las muestras por si se hubiera desprendido. Las muestras deben de ser recogidas en bolsas de plástico individuales con un código inequívoco asignado y llevar inmediatamente al laboratorio para su análisis, deben de ser procesadas lo antes posible para impedir el sobrecrecimiento de hongos, siempre que se pueda antes de un mes. Hasta su procesado las muestras se guardarán a 4 °C.

## 2.6.2. Aislamiento de microorganismos desde muestras de madera

El aislamiento de microorganismos se realizó con algunos cambios dependiendo de las zonas de la madera analizada.

### Análisis de las muestras de corteza externa y cambium

- Diferenciar la zona donde se quiera hacer la extracción. Para el análisis de la **corteza** seguir el protocolo. Para el análisis del **cambium** retirar con cuidado y con ayuda de un bisturí, previamente esterilizado a la llama, una zona de la corteza para poder acceder al cambium.
- Elaborar una plantilla con medidas 2 x 5 cm (superficie de 10 cm<sup>2</sup>) en un material fácilmente esterilizable, o al menos desinfectable, como plástico.
- Esterilizar la plantilla en alcohol 96%.
- Colocar la plantilla en la zona que se quiera analizar con ayuda de pinzas previamente esterilizadas a la llama. La plantilla acotará la zona que se quiere analizar para poder tener un análisis homogéneo en todas las muestras.
- Mojar un hisopo en NaCl 0,9% y con él raspar la superficie analizada hasta los límites definidos por la plantilla.
- Resuspender el contenido del hisopo en 1 mL de NaCl 0,9% mediante agitación con ayuda de un vórtex durante 3-4 min.
- Realizar diluciones seriadas con NaCl 0,9% hasta que las placas contengan un número contable de microorganismos, con el que se pueda trabajar cómodamente. Se recomienda realizar diluciones seriadas hasta  $1.10^{-4}$ .

### Análisis del duramen

- Encontrar un lugar en la pieza de madera con acceso directo al duramen, si es posible, una zona donde no se tenga que atravesar la corteza. En una rama la zona ideal será el lateral de la misma.

- Limpiar cuidadosamente la zona donde se va a extraer el serrín con ayuda de alcohol 96% para eliminar la máxima cantidad de microorganismos que estuvieran presentes en la capa exterior de la madera.
- Limpiar la broca del taladro sumergiéndola en alcohol 96%.
- Colocar una placa de Petri previamente pesada para recoger el serrín.
- Taladrar la superficie antes esterilizada con alcohol hasta una profundidad entre 2-5 cm y recoger el serrín generado de esta manera.
- Pesar de nuevo el elemento destinado para recoger el serrín, para conocer la cantidad recogida.
- Transferir el serrín a un tubo estéril de 50 mL con 10 mL de NaCl 0,9% estéril.
- Mezclar por agitación con vórtex durante al menos 5 minutos.
- Dejar reposar la solución al menos 30 minutos, para que las partículas más pesadas puedan hundirse y las más ligeras se acumulen en la parte superior.
- Recoger el sobrenadante evitando tanto las partículas precipitadas al fondo como las fibras que puedan estar flotando.
- Realizar diluciones seriadas para su cultivo. En el serrín suele haber menos cantidad de microorganismos que en el resto de zonas, por ello diluciones seriadas hasta  $1 \cdot 10^{-3}$  son suficiente.

### 2.6.3. Cultivo de microorganismos aislados de madera en degradación

- Sembrar 100  $\mu$ L de cada dilución en los medios de cultivo para bacterias y para hongos. Dispersar la solución por toda la placa de cultivo con ayuda de un asa de Digrafsky.
- Incubar las placas de cultivo en oscuridad a 25 °C de 2 a 10 días (*nota 1*).
- Contar y seleccionar las diferentes morfologías encontradas en las placas de cultivo (*nota 2*).
- El aislamiento de las diferentes morfologías encontradas se realizará con un palillo previamente esterilizado en autoclave. Estos aislamientos se sembrarán en placas de Petri únicas con medios de crecimiento generales, PDA para hongos y TSA para bacterias.
- Nombrar con un código inequívoco a cada aislado, este código representa la muestra de madera de donde viene y la zona de donde se ha aislado.
- Incubar en oscuridad a 25 °C durante 1-7 días.
- Comparar las morfologías aisladas y descartar las repetidas.
- Mantener los microorganismos aislados en placas de Petri selladas con Parafilm a 4 °C, si se procesaran en un periodo de 1 mes o realizar gliceroles de los aislados y guardarlos a -80 °C.

**Nota 1.** El número de días de incubación será distinto dependiendo de las especies bacterianas y fúngicas que puedan crecer. Por ello, es necesario mirar el crecimiento diariamente, ya que, muchas especies son capaces de crecer los primeros días impidiendo el crecimiento de otras. Si esto ocurriera intentar

encontrar el mismo tipo de morfología en placas con mayor dilución o aislar los microorganismos durante los primeros días y más tarde comparar por si estuviesen repetidos.

**Nota 2.** Será necesario realizar una diferenciación de las distintas colonias creciendo en los medios de cultivo por morfología. Para ello, prestar atención a detalles como el brillo, la forma de la colonia, la textura, el color o la presencia de esporas, todo ello deberá ser anotado para la descripción futura de esa colonia.

## 2.7. AISLAMIENTO DE ADN

El aislamiento de ADN total de bacterias y de hongos se realizó para: **i)** la identificación por medio de la secuenciación del 16S en bacterias y la región ITS en hongos, **ii)** para obtener el genoma de los aislados pertenecientes a Actinobacterias y *Penicillium* para el cribado de genes biosintéticos, y **iii)** para obtener el ADN total de las diferentes cepas de *B. pumilus* con el fin de obtener su secuencia (Romanelli *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2008).

Para todo ello, se utilizó el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Siguiendo el protocolo del fabricante como:

### 2.7.1. Aislamiento de ADN de bacterias ambientales

- Resembrar las bacterias a identificar en medio sólido de crecimiento TSA o NA, dependiendo de la especie.
- Incubar 12-16 horas a 25 °C (*nota 3*).
- Inocular un palillo una colonia de la cepa a identificar en 1 mL de medio TSB en microtubos de 2 mL.
- Crecer en agitación suave (150 rpm) durante 12-24 horas.
- Centrifugar a 13000–16000 ×g, 2 minutos y desechar sobrenadante.
- En este punto el protocolo se separa entre Gram + y Gram -, al desconocer que bacterias se obtendrían, seguir el protocolo para Gram +.
- Resuspender las células en 480 µL de EDTA 50 mM.
- Añadir lisozima (10 mg/mL) en un volumen máximo de 120 µL.
- Incubar a 37 °C durante 30-60 minutos. Centrifugar a 13000-16000 ×g. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 600 µL de la *Nuclei Lysis Solution*. Resuspender el precipitado con ayuda de la pipeta.
- Incubar a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células. Dejarlo reposar a temperatura ambiente.
- Añadir 3 µL de la solución *RNase Solution*<sup>4</sup> al lisado celular. Invertir suavemente el tubo 2-5 veces para mezclar la solución con el lisado celular.

<sup>4</sup> **RNase Solution.** Disolver la RNAasa A a 4 mg/ml en *DNA Rehydration Solution*, hervir 10 minutos para eliminar las ADNasas y guardar en alícuotas a -20 °C. Puede ser comprada en Promega.

- Incubar a 37 °C durante 15-60 min y después enfriar la muestra a temperatura ambiente.
- Añadir 200 µL de la solución *Protein Precipitation Solution* al lisado celular y agitar con ayuda de un vórtex durante 20 segundos.
- Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar a 13000–16000 ×g, 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 mL que contiene 600 µL de isopropanol.
- Mezclar ambas soluciones por inversión.
- Seguir mezclando por inversión hasta que la masa de ADN sea visible.
- Centrifugar a 13000–16000 ×g, 2 minutos.
- Descartar el sobrenadante con cuidado, es importante que este paso se realice con mucha precaución para no soltar el precipitado de ADN del fondo del tubo. Dejar secar el isopropanol sobrante 30 minutos.
- Lavar la solución con 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13000–16000 ×g, 2 minutos. Descartar el etanol con cuidado para no romper el precipitado de ADN.
- Dejar secar el microtubo boca abajo en papel absorbente durante 10-15 min para eliminar el etanol restante.
- Añadir 100 µL de *DNA Rehydration Solution*<sup>5</sup> y dejar rehidratar el ADN a 65 °C durante 1 hora. Mezclar cada 10 minutos el contenido golpeando ligeramente la base del tubo con el dedo para ayudar a la completa solubilización del precipitado de ADN. También, se puede dejar la muestra a temperatura ambiente o a 4 °C toda la noche para su rehidratación. En vez de tampón RE se puede usar agua MQ (ultrapura).
- Conservar las muestras a 2-8 °C, o congeladas a -20 °C.

**Nota 3.** La mayoría de las bacterias aisladas son capaces de crecer en medio sólido a las 24 horas, si no fuera así dejarlas más tiempo.

### 2.7.2. Aislamiento de ADN de hongos ambientales

- Resembrar el aislado fúngico en medio sólido PDA.
- Cultivar el aislado durante 7-14 días a 25 °C.
- Cuando se vea que el micelio ha cubierto completamente la placa de cultivo recogerlo por raspado con ayuda de una espátula metálica estéril.
- Recolectar el micelio y pasarlo a un mortero de porcelana.
- Lavar el mortero con alcohol 96 % (*nota 4*).
- Congelar el micelio añadiendo nitrógeno líquido por encima del mismo y pulverizarlo en el mortero hasta obtener un polvo homogéneo.

**5 DNA Rehydration Solution (RE).** 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA (pH 8.0). Con el kit.

- Añadir el micelio pulverizado a un tubo de 2 mL.
- Seguir el protocolo anterior desde la adición de 600  $\mu$ L de la *Nuclei Lysis Solution*.

**Nota 4.** Es importante limpiar a conciencia el mortero con alcohol 96%, ya que al ser usado para pulverizar el micelio con nitrógeno líquido el uso de agua la congelaría al tocar el mortero previamente enfriado.

## 2.8. MANIPULACIÓN DEL ADN

### 2.8.1. Determinación de la cantidad y calidad del ADN extraído

La concentración de ADN se cuantificó a través de un espectrofotómetro tipo Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para estimar el grado de pureza del ADN se utilizó la relación  $A_{260}/A_{280}$ , que mide la absorbancia de las proteínas (280 nm) frente a la absorbancia del ADN (260 nm). Una relación entre 1,7-2,0 se considera aceptable (*ND-1000 Spectrophotometer. V3.8 User's Manual*).

Además, para comprobar que el ADN no había sido degradado se visualizó una alícuota del mismo en un gel de agarosa. Este método también permite estimar la cantidad de ADN a través de la comparación de la intensidad de fluorescencia con el marcador de peso molecular.

### 2.8.2. Identificación de microbiana mediante secuenciación

Una vez se han extraído el ADN de las cepas aisladas de madera en degradación, este se secuenció en el Área de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Para la amplificación inicial previa a la secuenciación se utilizaron los cebadores anotados en la tabla 2.2B.

Para ello, se utilizó el kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) y la secuenciación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

El análisis y procesamiento de las secuencias se realizó a través de herramientas bioinformáticas, permitiendo la identificación de la especie aislada por la comparación con bases de datos. Las herramientas bioinformáticas y bases de datos usados se resumen en el apartado 2.17 (Aslam *et al.*, 2017; Clarridge 3rd, 2004; Woo *et al.*, 2008).

### 2.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Procedimiento inicialmente descrito por Mullis *et al.* (1986) que permite la amplificación de ácidos nucleicos. Esta técnica se basa en la capacidad de la ADN polimerasa de reconocer y amplificar regiones bicatenarias dentro de una molécula de ADN. Este método permite la

amplificación de regiones específicas dentro del genoma. Durante este trabajo, sirvió para la detección de genes biosintéticos en Actinobacterias y *Penicillium*.

Las cantidades de los distintos componentes, así como las temperaturas finales durante la reacción de PCR deben de ser ajustados en función de la ADN polimerasa y el tipo de región a amplificar. Los componentes y las condiciones típicas de reacción de PCR se describen en las tablas 2.5 y 2.6. Durante este trabajo se utilizó la ADN polimerasa GoTaq® G2 Flexi (Promega).

**Tabla 2.5. Componentes típicos en una reacción de PCR.**

<b>ADN molde</b>	10-50 ng ADN
<b>Cebadores (12-24 pb)</b>	0,1-1,0 µM
<b>ADN polimerasa</b>	0,5-2,5 unidades
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,0-2,0 mM
<b>dNTPs</b>	50-500 µM
<b>Tampón 10X</b>	1x
<b>Aditivos</b>	Betaina, seroalbúmina, detergentes...
<b>Agua destilada</b>	Hasta completar volumen (20 µL)

**Tabla 2.6. Temperaturas y tiempos típicos de una reacción de PCR.**

Desnaturalización inicial	94-98 °C, 5 min	1 ciclo
Amplificación	Desnaturalización	94-98 °C, 30 seg
	Anillamiento	Temperatura según cebadores, 30-45 seg
	Extensión	72 °C, variable según ADN polimerasa
Extensión final	72 °C, 10 min	1 ciclo

#### 2.8.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis de ADN en gel de agarosa se realizó para comprobar la integridad de los ADN purificados y para comprobar los resultados de las PCR realizadas. Para ello se utilizó agarosa (Pronadisa) al 0,8% y Tris-Acetato-EDTA (TAE)<sup>6</sup> como tampón de electroforesis.

- Disolver agarosa del tipo D1-Electroendosis Media (Pronadisa) en tampón TAE 1x, en un porcentaje apropiado para la separación de las bandas de ADN y calentar en microondas hasta disolver. Pesarse la solución antes y después de introducirla en el microondas para compensar el peso perdido por evaporación con agua destilada.
- Dejar enfriar la solución de agarosa sin que esta llegue a solidificarse.

<sup>6</sup> TAE (50x): 242 g de Tris base (2 M); 57,1 mL de ácido acético glacial (5,7 %); 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM); agua destilada hasta completar 1 L

- Verter sobre el molde para la realización del gel.
- Eliminar con cuidado las posibles burbujas que se hayan formado y colocar el peine para la formación de los pocillos.
- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con tampón TAE 1x hasta cubrir el gel.
- Mezclar las muestras de ADN con tampón de carga (10x)<sup>7</sup> en una proporción 1/10. Dispensar suavemente el ADN con el tampón de carga en los pocillos asignados.
- Desarrollar la electroforesis con una diferencia de potencial de entre 1 y 5 V/cm de distancia entre electrodos.
- Teñir el ADN dentro del gel por inmersión en una solución de bromuro de etidio (BrEt)<sup>8</sup> que actúa como agente intercalante que permite la visualización del ADN al exponerlo a luz ultravioleta.
- Los geles se visualizan y fotografían empleando el sistema de documentación de geles VWR Smart3 (VWR), si se quiere manipular el gel de alguna manera, por ejemplo, para cortar una banda, se utilizó un transiluminador de luz UV ECX-26-M.

## 2.9. OBTENCIÓN DE ADN TOTAL PARA ESTUDIOS METAGENÓMICOS.

El aislamiento y procesamiento de ADN para las muestras de metagenómica fue realizado en las instalaciones y por el personal de de SINTEF (Trondheim, Noruega).

### 2.9.1. Aislamiento de ADN para metagenómica

El aislamiento y procesamiento de ADN para las muestras de metagenómica fue realizado en las instalaciones de SINTEF (Trondheim, Noruega).

#### 1.1.1 2.9.1. AISLAMIENTO DE ADN PARA METAGENÓMICA

El ADN se aisló mediante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) mediado por extracción con cloroformo-alcohol isoamílico. En resumen:

- Transferir 0,1 g de muestra de madera homogeneizada a un tubo batidor de perlas de 2 ml que contiene perlas de vidrio (Æ 0,5 mm).
- Añadir 0,5 ml de tampón de extracción ADN [Tris-HCl 100 mM, EDTA sódico 100 mM, fosfato sódico 100 mM (pH 8,0), NaCl 1,5 M, CTAB al 1 %].

<sup>7</sup> **Tampón de carga (10x).** 0,25 % azul de bromofenol, 40 % sacarosa; 0,25 %, xilén-cianol; en solución acuosa. Se esteriliza en la olla a presión a 120°C durante 20 minutos. Se conserva a 4°C o a temperatura ambiente

<sup>8</sup> **Solución de bromuro de etidio.** Bromuro de etidio (EtBr): Se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml en agua y se conserva a 4°C protegido de la luz. Para un litro de agua destilada se añaden 200 µl de la solución concentrada. Conservar a temperatura ambiente

- Incubar las muestras en un *VórtexGenie 2.0* al máximo de velocidad 5 min a temperatura ambiente. A continuación, aplicar un batido de perlas (1 min, 30 Hz) en un *Tissuelyser II* (Qiagen, Hilden, Alemania).
- Agregar 10 µL de Proteínasa K (10 mg/mL) e incubar en un agitador horizontal (125 rpm, 37 °C, 30 min).
- Agregar 0,05 mL de SDS (20%) y se incubará a 65 °C durante 2 h mezclando suavemente al menos cada 15 min.
- Precipitar los tejidos por centrifugación.
- Extraer el ADN con volúmenes iguales de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), repetir este proceso dos veces.
- Precipitar la fase superior que contenía el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol frío.
- Recuperar el ADN por centrifugación y se lavarlo con etanol helado (70%).
- Resuspender el ADN en 100 µL de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5).

### **1.1.2 2.9.2. PROCESAMIENTO DE DATOS METAGENÓMICOS**

Las bibliotecas de amplicones de secuenciación se generaron mediante el protocolo 16S *Metagenomic Sequencing Library Preparation, Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System protocol* (Illumina part number 15044223 rev. B) con cebadores dirigidos a bacterias u hongos, respectivamente (tabla 2.2A). En resumen, las partes internas del ARN ribosomal 16S (rRNA) que cubre las regiones variables V3 y V4 de bacterias, o el gen espaciador transcrito interno (ITS2) de hongos fueron amplificados por PCR con usando *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EE. UU.). Los productos de PCR se purificaron con el kit *Agencourt Kit AMPure XP* (Beckman Coulter Genomics, Newton, MA, EE. UU.). Para agregar los adaptadores de secuenciación y los índices de multiplexación se utilizó el kit *Nextera XT Index Kit*. Las bibliotecas de ADN agrupadas fueron secuenciadas en un secuenciador MiSeq (Illumina, Eindhoven, Países Bajos) usando el kit *MiSeq Reagent Kit v3* en el modo de extremo emparejado de 2300 pb (2300 bp *paired end mode*). Las lecturas de secuenciación se desmultiplexaron en *MiSeq reporter v. 2.3* (Illumina).

El procesamiento de los datos obtenidos se realizó a través de *CLC Genomics workbench v. 21.0.2* (Qiagen). Las lecturas fueron recortadas por el adaptador, filtradas y clasificadas como unidades taxonómicas operativas (OTU), para ello se utilizó el flujo de trabajo de agrupamiento de OTUs y control de calidad de datos del Módulo de Genómica Microbiana con parámetros predeterminados. Excepto uno, se estableció como corte el 10% de la cobertura mediana para el filtrado de muestras basadas en su número de lecturas.

Para la clasificación de los OTU se usaron las bases de datos *The Greengenes v.13\_5* (97%) para bacterias y *UNITE v.7.2 (2017-06-28)* (97%) para hongos. Las tablas OTU resultantes se filtraron para eliminar todas las lecturas desconocidas. Además, las lecturas clasificadas como

“cloroplasto” a nivel de clase en el 16S se omitieron de los análisis de datos, ya que representan secuencias de plantas y/o algas.

### 2.9.3. Evaluación de la diversidad microbiana

La diversidad microbiana de las muestras procesadas se estableció usando índices de diversidad alfa y beta. La **diversidad alfa** describe la diversidad media de especies en un sitio a escala local, mientras que la **diversidad beta** describe la relación entre la diversidad de especies regionales y locales.

El **índice de Shannon** (Dušek & Popelková, 2012), proporciona una medida de la incertidumbre asociada con variables seleccionadas y puede ser calculado mediante la ecuación:  $H = \sum_{i=0}^n p_i \log_2 p_i$

El **índice de Simpson** (Jost, 2006), proporciona una medida del encuentro interespecífico donde  $n$  es el número de características y  $p_i$  es la fracción de lecturas que pertenecen a cada característica  $i$ :  $SI = 1 - \sum_{i=0}^n p_i^2$

La **distancia Bray-Curtis** (Beals, 1984), es una medida que describe la disparidad entre dos poblaciones donde  $n$  es el número de OTU, y  $x_i^A$  y  $x_i^B$  son las abundancias de OTU  $i$  en las muestras A y B, respectivamente:  $B = \frac{\sum_{i=0}^n |x_i^A - x_i^B|}{\sum_{i=0}^n |x_i^A + x_i^B|}$

Las diversidades alfa y beta se calcularon a partir de las tablas de clasificación de OTU utilizando el software *Estimate Alpha & Beta Diversities workflow* del *CLC Genomic Workbench* (Qiagen). Para la estimación del valor alfa se utilizaron profundidades máximas de 10000 y 5000 para la rarefacción de las bacterias y hongos respectivamente, y el número de puntos se ajustó a 20. El método de rarefacción a una técnica que permite realizar la comparación de la diversidad existente en dos colecciones que fueron recogidas a través de muestreos de intensidad diferente. La rarefacción, en este caso, consiste en reducir el número de individuos de la muestra más grande, pero conservando la proporción advertida entre las especies.

## 2.10. ENSAYO DE COMPETENCIA

El ensayo de competencia entre las cepas asiladas de madera en degradación y los hongos indicadores representantes de la degradación de la madera se realizó para valorar la actividad antifúngica presentada por las cepas aisladas. Para la realización del ensayo se siguieron las indicaciones de García-Ortiz *et al.* (2017). Como especies indicadoras se utilizaron *A. brasiliensis*, *A. pullulans*, *C. puteana*, *P. chrysogenum* y *T. versicolor*.

Preparación de las especies indicadoras

### Para especies que generan esporas:

- Sembrar la especie indicadora en medio general o de esporulación.
- Crecer *P. chrysogenum* en medio PW2, *A. brasiliensis* en medio CM y *A. pullulans* en medio PDA en oscuridad a 25 °C hasta su esporulación, entre 7-10 días.
- Añadir 5 mL de NaCl 0,9% y raspar la superficie de la placa con ayuda de una micropipeta de 1 mL cortada previamente. Recoger el micelio raspado en un tubo de 50 mL.
- Filtrar a través de filtro de nylon Nyltal (30 µm de poro) para eliminar el micelio y recoger el filtrado que contendrían las esporas.
- Medir la concentración de esporas a través de la siembra de diluciones seriadas o por conteo directo al microscopio con cámara Neubauer.
- Centrifugar durante 15 min a 4500 xg y descartar el sobrenadante.
- Añadir glicerol al 40% y resuspender con suavidad las esporas.
- Ajustar a la concentración de trabajo deseada ( $1 \cdot 10^6$  esporas/mL) y dividir la solución de esporas en tubos individuales para ser conservados a -20 °C.

### Para especies que **no** generan esporas:

- Cultivar las cepas indicadoras, *C. puteana* y *T. versicolor*, en medio PDA durante 7 días a 25 °C. Hasta que haya la suficiente biomasa para realizar el ensayo.

### **Bioensayo**

- Preparar el número apropiado de placas de cultivo donde se realizará el ensayo. En este caso se realizó en medio TSA y YEME según el crecimiento de la especie indicadora.
- Inocular el hongo indicador en el centro de la placa.
- Si se tienen esporas: inocular 10 µL de la solución de trabajo de esporas y esperar hasta que se seque. *A. brasiliensis*, *P. chrysogenum* y *A. pullulans* en medio TSA.
- Si no se tienen esporas: realizar con la ayuda de un sacabocados esterilizado a la llama agujeros en el centro de las placas donde se va a realizar el ensayo. A su vez, realizar agujeros en la placa que contiene la especie indicadora no esporulada. Traspasar el trozo de agar con micelio al pocillo realizado en la placa del bioensayo con ayuda de un palillo. *C. puteana* y *T. versicolor* en medio YEME.
- Inocular el microorganismo antagonista a ambos lados del indicador con ayuda de un palillo, un asa de siembra o un hisopo, dependiendo de la naturaleza del microorganismo.
- Preparar la placa de control de crecimiento del hongo indicador, sembrando el hongo en su medio correspondiente sin presencia del microorganismo antagonista.
- Preparar las placas de control de crecimiento del microorganismo antagonista, sembrándolo en todos los medios usados en el bioensayo.
- Incubar los ensayos a 25 °C durante 5 días.
- Comparar con las placas control.
- Si el hongo indicador ha crecido tanto como en el control de crecimiento del hongo indicador se evaluará como "0".

- Si el hongo indicador ha crecido menos que en el control se evaluará como “1”.
- Si el hongo indicador casi no ha crecido, o no ha sido capaz de crecer se evaluará como “2”.

## 2.11. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ENZIMÁTICA EN CEPAS DE *PENICILLIUM*

La capacidad enzimática de las cepas aisladas de madera en degradación se testó para la degradación de la celulosa y para la actividad feruloil esterasa. Se realizaron ensayos cualitativos para comprobar la capacidad enzimática de las cepas testadas (García-Calvo, 2018).

### 2.11.1. Determinación de actividad celulolítica

Para la hidrólisis de celulosa es necesario la acción conjunta de tres grupos enzimáticos, endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas.

La capacidad endoglucanasa y celulasa general se probó a través de un ensayo cualitativo donde se testó la capacidad de degradar carboximetilcelulosa y celulosa por parte de las cepas investigadas.

- Sembrar las cepas a testar de *Penicillium* en medio sólido PW2.
- Incubar las placas en oscuridad a 25 °C durante 7 días.
- Raspar micelio con 3-4 mL de solución estéril de NaCl 0,9%.
- Transferir el micelio recogido a 50 mL de medio líquido PMMY en matraces de 250 mL y dejar crecer 96 horas a 25 °C y 250 rpm.
- Centrifugar 10 min a 10000 xg y recoger el sobrenadante. Se usará para el ensayo enzimático.
- Con ayuda de un sacabocados estéril realizar pocillos en las placas de medio CMC y CBM.
- Inocular 50  $\mu$ L de sobrenadante del cultivo de las cepas de *Penicillium*.
- Incubar 48 horas a 25 °C.
- Teñir la placa con 5 mL de solución de rojo Congo 0,1%<sup>9</sup> durante 15 min.
- Lavar la placa con NaCl 0,9% dos veces, durante 15 min en agitación suave.
- La actividad enzimática se correlacionó con la aparición de un halo más claro alrededor de los pocillos.

<sup>9</sup> Solución rojo Congo 0,1%: 10 g rojo Congo en 1 L de agua destilada. Guardar a 4 °C.

### 2.11.2. Determinación de actividad feruloil esterasa (FAE)

La actividad FAE de las cepas de *Penicillium* se comprobó a través de un ensayo cualitativo donde la transformación de etil ferulato a ácido ferúlico da lugar a una bajada del pH que se detecta mediante el indicador de pH colorimétrico púrpura de bromocresol.

- Realizar placas de 16 cm con 50 mL de medio EF suplementado con púrpura de bromocresol.
- Con ayuda de un sacabocados estéril obtener pocillos en las placas.
- Inocular 50  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo de cepas de *Penicillium* obtenido como se indica en el apartado 2.11.1.
- Incubar a 30  $^{\circ}$ C durante 6 horas.
- La actividad FAE se relacionó con el halo amarillo detectado alrededor de las cepas positivas.

### 2.12. ESPORULACIÓN DE *B. PUMILUS*

Se estableció un protocolo para mejorar la esporulación de *B. pumilus* y obtener el mayor número de endosporas en el menor tiempo posible.

- Crecer *B. pumilus* en placa de TSA durante 10-12 horas a 25  $^{\circ}$ C.
- Inocular un matraz de 500 mL con 100 mL de TB con *B. pumilus*.
- Cultivar 24 horas a 30  $^{\circ}$ C y 200 rpm.
- Medir densidad óptica del cultivo mediante espectrofotómetro a 600 nm ( $OD_{600}$ ).
- Recoger la cantidad de cultivo necesaria para inocular un matraz de 500 mL con 100 mL de LB a una  $OD_{600}$  inicial de 0,5.
- Cultivar durante 72  $^{\circ}$ C a 30 $^{\circ}$ C y 200 rpm.
- Recoger el cultivo y centrifugar a 5450 xg durante 15 min a 4  $^{\circ}$ C.
- Descartar el sobrenadante con cuidado para no romper el precipitado celular y las esporas.
- Resuspender el precipitado con agua ultra pura (tipo MQ) y pasarlo a tubos de 10 mL.
- Cerrar los tubos y asegurarlos con ayuda de Parafilm.
- Realizar un choque térmico a 80  $^{\circ}$ C durante 20 minutos.
- Dejar reposar a 4  $^{\circ}$ C al menos 30 minutos y centrifugar para concentrar las endosporas a 5450 xg durante 15 min a 4  $^{\circ}$ C.

### 2.12.1. Tinción de esporas (Schaeffer-Fulton)

La visualización de las esporas de *B. pumilus* se realizó al microscopio óptico. Aunque las esporas son visibles sin necesidad de tinción, cuando se quiso facilitar su visualización en la preparación estas se tiñeron con verde malaquita siguiendo el protocolo de Shaeffer y Fulton (1933).

- Desde cultivo líquido de *B. pumilus* esporulado, recoger 20 µL del cultivo y depositarlos en un portaobjetos
- Desde cultivo sólido de *B. pumilus*, recoger una pequeña cantidad de muestra con ayuda de un asa de siembra, diluirla en 50 µL de agua destilada y recoger 20 µL para colocar en el portaobjetos.
- Fijar las muestras con ayuda de una llama, pasando repetidas veces de forma rápida el portaobjetos con cuidado sobre la llama para que se evapore el exceso de agua y las células queden fijadas al cristal.
- Añadir la solución de verde malaquita<sup>IO</sup> en exceso.
- Fijar la solución de verde malaquita pasando repetidas veces de forma rápida el portaobjetos con cuidado sobre la llama durante 5 minutos. Ir añadiendo más cantidad de verde malaquita en exceso a las muestras y continuar fijando la solución por 10 minutos.
- Lavar las muestras con abundante agua corriente. Hasta que se haya eliminado el exceso de verde malaquita.
- Teñir las muestras con la solución de safranina<sup>II</sup> durante 2 minutos como tinción de contraste.
- Lavar las muestras en abundante agua y dejar secar antes de su visualización al microscopio.

## 2.13. ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta facilita determinar los factores que más afectaban al crecimiento de *B. pumilus*. Para ello, se realizaron una serie de experimentos utilizando el diseño de Box Behnken de 3<sup>4</sup> con cuatro variables, cada una con tres niveles y tres réplicas en el punto central (Box & Behnken, 1960). Para la realización de este diseño se eligieron como variables la concentración de: glucosa, peptona, temperatura y agitación, tal y como se puede ver en la tabla 2.7.

**Tabla 2.7. Variables y niveles del Diseño Box Behnken.**

<sup>IO</sup> Solución verde malaquita. Verde malaquita al 5% en agua MQ.

<sup>II</sup> Solución de safranina. Safranina al 1% en agua MQ.

Niveles	Temperatura	Suplementación con glucosa	Suplementación con peptona	Agitación
+1	30 °C	4,0%	5,0%	250 rpm
0	25 °C	2,0%	2,5%	200 rpm
-1	20 °C	0,0%	0,0	150 rpm

Mediante el diseño Box Behnken se redujo el número de experimentos a realizar a 27. Para lo cual se utilizó el software *The Statgraphics Centurion XVI version 16.1.11* (Warrenton, VA, USA).

## 2.14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### 2.14.1. Determinación de capacidad antifúngica por volátiles

La capacidad de las diferentes cepas de *B. pumilus* para secretar compuestos orgánicos volátiles (VOCs) fue testada a través del ensayo descrito por Arrebola *et al.* (2010) en el que enfrentan dos placas de Petri entre sí conteniendo una de ellas la especie antagonista a testar y la otra el hongo indicador.

- Crecer *B. pumilus* 12-14 horas en medio TSA a 25 °C.
- Resembrar el cultivo en el medio que se quiera probar en superficie cubriendo bien toda la placa de 9 cm de diámetro con ayuda de un asa de Digralsky.
- Desde cultivo fresco de hongos no esporulados, con ayuda de un sacabocados estéril hacer un agujero en la placa del cultivo con el hongo creciendo y otro agujero en el centro de una placa de PDA del mismo tamaño que la placa de TSA donde se sembró *B. pumilus*.
- Traspasar el trozo de micelio al agujero con ayuda de un palillo estéril.
- Desde esporas recogidas de hongos esporulados, pipetear en el centro de la placa de PDA del mismo tamaño que la placa donde se cultiva *B. pumilus* 10 µL de la solución de esporas.
- Retirar las tapas de ambas placas y situarlas enfrentadas por las zonas de cultivo. La placa de arriba será la placa que contenga el antagonista y la placa de abajo será la que contenga el hongo indicador.
- Sellar la unión entre ambas placas con ayuda de cinta plástica elástica (Parafilm®).
- Como control de crecimiento de los hongos indicadores realizar placas donde el hongo este creciendo solo, porque en la placa de arriba únicamente haya medio estéril.
- Cultivar a 25 °C durante 7 días. Hasta que se vea un crecimiento adecuado en la placa de control de crecimiento.
- Medir el crecimiento de los hongos en todas las placas diariamente con ayuda de una regla.

- El resultado se expresará como el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio siguiendo la siguiente fórmula.  $IC\% = \left[ \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \right] \times 100$ . Siendo  $R_1$  el radio de crecimiento del hongo en la placa control y  $R_2$  el radio de crecimiento del hongo en la placa con el antagonista.

### 2.14.2. Determinación de capacidad antifúngica por sustancias solubles

Para determinar la capacidad antifúngica de las sustancias solubles de las cepas analizadas de *B. pumilus* se testó el sobrenadante de los cultivos de *B. pumilus* añadiéndolo al medio de cultivo de los hongos filamentosos.

- Desde un cultivo líquido de *B. pumilus*.
- Recoger el medio de cultivo en tubo de 50 mL.
- Centrifugar a 5450 xg durante 15 min a temperatura ambiente.
- Recoger el sobrenadante libre de células.
- Esterilizar aquella cantidad que se vaya a utilizar para el bioensayo por filtración a través de filtros con 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, y posteriormente con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (nota 5).
- Fundir el medio de cultivo donde se realizar el bioensayo: YEME al 2% de agar para *C. puteana* y *T. versicolor*, y TSA al 2% de agar para *A. brasiliensis* y *P. chrysogenum*.
- Dejar el medio de cultivo enfriar sin que llegue a solidificarse hasta 50 °C.
- Distribuir el sobrenadante filtrado (estéril) del crecimiento de *B. pumilus* en tubos de 10 mL añadiendo 1 mL a cada uno de ellos. Para el control de crecimiento añadir 1 mL del medio estéril donde ha sido cultivado *B. pumilus*.
- Añadir 4 mL del medio de cultivo a 50 °C (nota 6).
- Mezclar ambas soluciones cuidadosamente volteando el tubo de 10 mL con precaución de no generar burbujas.
- Añadir la mezcla a las placas de Petri de 6 cm de diámetro.
- Realizar también placas para el control de crecimiento de los hongos indicadores.
- Sembrar los hongos indicadores como gota de esporas, si las hubiera, o como parche en el centro de la placa. Ver apartado 2.10.
- Dejar crecer durante 7 días controlando el diámetro de crecimiento de los hongos en los controles de crecimiento.
- Medir el crecimiento de los hongos en todas las placas diariamente con ayuda de una regla.
- El resultado se expresará como el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio siguiendo la siguiente fórmula.  $IC\% = \left[ \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \right] \times 100$ . Siendo  $R_1$  el radio de crecimiento del hongo en la placa control (con medio de cultivo de *B. pumilus* estéril) y  $R_2$  el radio de crecimiento del hongo en la placa con el antagonista.

**Nota 5.** Esta doble filtración es necesaria en cultivos de *B. pumilus* donde la viscosidad celular sea alta.

**Nota 6.** Dejar reposar unos minutos hasta que no queme al contacto con la mano, pero sin que solidifique.

### 2.14.3. Determinación de capacidad antibacteriana

Para determinar la capacidad antibacteriana de las cepas de *B. pumilus* testadas se realizó un bioensayo en doble capa, donde se colocaba una fina capa de las cepas bacterianas indicadoras en la parte superior de un cultivo de *B. pumilus*.

#### Preparación de las bacterias indicadoras.

- Crecer las especies indicadoras (*M. luteus* y *E. coli*) individualmente en medio sólido (TSA) durante 12-14 horas a 37 °C.
- Con ayuda de un asa de siembra, recoger varias colonias individuales de las especies indicadoras e inocular con cada una de ellas 100 mL de medio TSB en un matraz de 500 mL.
- Cultivar 12-14 horas a 37 °C y 200 rpm.
- Medir densidad óptica de los cultivos (OD<sub>600</sub>).
- Recoger los cultivos y conservarlos en a 4 °C. Estos cultivos pueden mantenerse hasta 1 mes.

#### Preparación de especies antagonistas (*B. pumilus*)

- Crecer las especies antagonistas en medio sólido (TSA) durante 12-14 horas a 25 °C.
- Recoger varias colonias con ayuda de un asa de siembra e inocular 100 mL de medio TSB en matraz de 500 mL.
- Incubar durante 12-14 horas a 25 °C y 250 rpm.
- Medir densidad óptica (OD<sub>600</sub>).

#### Realización del bioensayo

- Preparar suficientes placas de medio TSA para realizar el bioensayo.
- Depositar 10 µL de *B. pumilus* a una concentración de OD<sub>600</sub> de 0,5 a un lado de la placa de Petri.
- Depositar al otro lado de la placa de cultivo 5 µL de cloranfenicol (1,6 mg/mL).
- Dejar secar durante 30-40 minutos hasta se vea que ambas gotas se han secado completamente.
- Fundir medio de cultivo LA 2,0% y mantener a 50 °C en baño con agua para que no solidifique.
- Preparar 2,5 mL de LB con la concentración al 0,8 (OD<sub>600</sub>) del cultivo de las bacterias indicadoras.
- Dispensar en tantos tubos de 10 mL como ensayos se vayan a realizar.
- Atemperar durante 3 minutos el medio con la solución con las bacterias indicadoras a 50 °C.

- Mezclar los 2,5 mL con las bacterias indicadoras al 0,8 (OD<sub>600</sub>) con 7,5 mL del medio LA al 2,0%, para obtener un cultivo en LA al 1,5% con las bacterias indicadoras a una concentración inicial de 0,2 (OD<sub>600</sub>).
- Cubrir las placas donde se había depositado *B. pumilus* y el antibiótico con esta solución, con cuidado para que la solución no desplace las gotas puestas con antelación.
- Dejar hasta que la capa superior solidifique completamente.
- Incubar a 37 °C durante 12-14 horas.
- Medir el halo de inhibición que han generado las cepas de *B. pumilus* con actividad antimicrobiana en el cultivo de las especies indicadoras.

## 2.15. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL GENOMA DE *B. PUMILUS*

La secuenciación de las diferentes cepas de *B. pumilus* fue realizada en y por el personal de SINTEF (Trondheim, Noruega), para ello se aisló el ADN de las diferentes cepas secuenciadas (V17C11, P48C1 y DSM27) a través del kit *Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega), detallado en el apartado 2.7.1, y fue enviado a SINTEF para su secuenciación.

Las cepas fueron secuenciadas a por medio de *Illumina MiSeq shotgun* y *Oxford nanopore MinION* (Coil *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2016).

Para la secuenciación por *Illumina MiSeq shotgun* las librerías fueron realizadas usando el kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina cat. FC-131-1024) junto con kits para la adición de marcadores de secuenciación e índices de multiplexado. Las bibliotecas agrupadas se secuenciaron usando un *Illumina Miseq* utilizando el *MiSeq Reagent Kit v3* (Illumina cat. MS-102-3003) en el modo de extremos emparejados de 2300 pb (se secuenciaron 300 pb de cada extremo de las moléculas de ADN).

Para la secuenciación por *Oxford nanopore MinION* se generaron bibliotecas de secuenciación de lectura larga mediante el kit *Ligation Sequencing Kit* (Oxford Nanopore cat. SQKLSK109). Se agregaron índices de multiplexado usando el kit *Native Barcoding Kit* (Oxford Nanopore cat. SQK-NBK004) y se secuenció a través del equipo *R9.4 flowcell* (Oxford Nanopore cat. FLO-MIN106) por aproximadamente 41 horas.

Los datos obtenidos de la secuenciación por *Oxford nanopore MinION* fueron desmultiplexados, asignados a bases y convertidos en archivo tipo fastq en utilizando el software *Guppy version 3.2.1*.

Para el ensamblaje de genomas híbridos *de novo* las secuencias de estos genomas se generaron en *Unicycler* de la instalación informática de *Norwegian e-Infrastructure for Life Sciences* (NeLS) *Galaxy* en Tromsø, utilizando la versión *Unicycler version 0.4.4*. *Unicycler* usa *Bowtie2* y *Pilon* para pulir el ensamblaje con los datos de *Illumina MiSeq* de alta calidad, lo que reduce la tasa de error (Wick *et al.*, 2017).

La anotación de los genomas se realizó usando RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz *et al.*, 2008), y el análisis filogenético de las cepas se llevó a cabo mediante el servidor *Type (Strain) Genome Server* (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019).

El análisis de las diferentes funcionalidades basadas en el genoma fue realizado a través de softwares, servidores y bases de datos para la búsqueda de secuencias concentradas en el genoma, las utilizadas durante este trabajo se recogen en el apartado 2.17.

## 2.16. ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO

La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) permite la separación de proteomas celulares complejos dando la oportunidad de compararlos entre ellos para conocer la expresión diferencial de las proteínas. A través de esta técnica se pueden separar las proteínas utilizando dos propiedades **i) primera dimensión por isoelectroenfoque (EIF)** donde las proteínas se separan atendiendo a su punto isoeléctrico; **ii) segunda dimensión por geles SDS-PAGE** donde se separan atendiendo a su masa molecular en geles de acrilamida utilizando agentes desnaturizantes como dodecil-sulfato sódico (SDS).

### 2.16.1. Obtención de las muestras

Las muestras fueron sometidas a rotura para liberar las proteínas citoplasmáticas que se querían analizar. Durante el proceso es importante la inactivación de las proteasas celulares, por ello, se trabajó en frío durante todo el proceso, y además, se utilizó inhibidor de las proteasas.

#### Rotura de las muestras

- Crecer las cepas en medio sólido (TSA) durante 12-14 horas a 25 °C.
- Recoger varias colonias aisladas con ayuda de un asa de siembra e inocular matraces de 500 mL con 100 mL de medio líquido TB e incubar 20 horas a 250 rpm a 30 °C.
- Medir la densidad óptica del cultivo ( $OD_{600}$ ) para inocular una concentración conocida (0,5) de las cepas de *B. pumilus* en matraces con 100 mL de TB. Cultivar a 30 °C y 250 rpm.
- Medir la densidad óptica regularmente hasta que alcance una  $OD_{600}$  entre 4-5 (punto de recogida).
- Recoger el cultivo y centrifugarlo a 5450 xg durante 15 min a 4 °C.
- Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado dos veces con 10 mL de agua destilada a 4 °C. Centrifugar 5450 xg durante 15 min a 4 °C y retirar el sobrenadante. En este punto las muestras pueden ser conservadas a -80 °C.

- Resuspender el precipitado con 5 mL de tampón de lavado<sup>12</sup>. Centrifugar 7 minutos a 4 °C y 5450 xg. Descartar sobrenadante.
- Resuspender en 1,0 mL de tampón de rotura<sup>13</sup> y transferir la mezcla a un tubo de *Lysing Matrix B* (MP Biomedicals).
- Aplicar 3 pulsos de velocidad 6,5 m/s durante 30 segundos en Fastprep FP120 (BIO101/Savant). Dejar 1 minuto en hielo entre los pulsos para evitar el calentamiento y con ello la acción proteásica.
- Centrifugar durante 10-20 minutos a 4 °C a 16000 xg.
- Trasvasar el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL y añadir 1,25 µL de Benzoasa (Merck) (preparado comercial con ARNasa I y ADNasa I).
- Incubar 30 minutos a 37 °C.
- Centrifugar durante 20 minutos a 4 °C a 16000 xg y recoger sobrenadante. Las proteínas presentes en el sobrenadante serán precipitadas con acetona para concentrarlas y limpiarlas.

#### Precipitación por acetona

- Añadir en un tubo de 10 mL a 1 mL del sobrenadante y entre 4-9 volúmenes de acetona pura previamente enfriada a -20 °C.
- Mantener a -20 °C al menos 30 minutos, preferiblemente toda la noche.
- Centrifugar a 5450 xg a 4 °C durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
- Añadir 5 mL de acetona al 80% (en agua), resuspender y volver a centrifugar a 5450 xg durante 10 minutos a 4 °C. Descartar la acetona sobrante con cuidado, si es necesario ayudarse con una micropipeta para poder descartar el máximo posible sin perturbar el precipitado.
- Dejar secar durante 1 hora en una cabina de extracción. Hasta que no se perciba el olor a acetona en las muestras.
- Resuspender el precipitado con entre 100-300 µL del tampón de resuspensión (RB)<sup>14</sup>, suplementado en el momento de usar con 60 mM DTT y 1% IPG buffer.
- Para su completa resuspensión agitar las muestras en un termo bloque agitador a 1400 rpm durante 1 hora.
- Centrifugar durante 30 segundos a 16000 xg y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, descartando las partículas no resuspendidas.
- Las proteínas pueden ser cuantificadas o someterse a una nueva limpieza a través del kit *2-D Clean-Up Kit*, atendiendo a las condiciones del fabricante.

<sup>12</sup> **Tampón de lavado.** Tris 10 mM; EDTA 10 mM, pH 7.5. Conservar a 4 °C.

<sup>13</sup> **Tampón de rotura.** Tampón de lavado suplementado con 1 pastilla de COMPLETE (inhibidores de proteasas) por cada 20 mL de tampón. Preparar justo antes de utilizarse.

<sup>14</sup> **Tampón de resuspensión (RB).** 8 M Urea; 2 % CHAPS; 0,02 % azul de bromofenol. Filtrar con filtros de 0,45 µm (Millipore). Conservar congelado a -20 °C. Cuando se va a usar añadir 60-100 mM DTT y 0,5-1% IPG buffer (3-11 NL).

### 2.16.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó a través del método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm del azul de Comassie al reaccionar con proteínas. Para ello, es necesario elaborar una recta patrón con cantidades conocidas de proteína [seroalbúmina bovina (BSA)], desde una concentración maestra de 0,25 mg/mL. Para realizar la cuantificación se usó el reactivo de *Bio-Rad Dye Reagent* (BioRad).

- Preparar una solución maestra de BSA a 0,25 mg/mL en agua.
- Dispensar los volúmenes indicados en la tabla 2.8 en tubos de 1,5 mL y completar con agua destilada hasta 800  $\mu$ L. Realizar la recta patrón por duplicado.
- Distribuir la muestra a cuantificar en microtubos de 1,5 mL por duplicado. Para ello, dispensar una dilución 1/2000 llevada hasta 800  $\mu$ L con agua destilada.
- Añadir 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (*Bio-Rad Dye Reagent*) a los tubos de la recta patrón y de las muestras a cuantificar. Cerrar los tubos con cuidado, agitar con ayuda de un agitador vórtex y dar un pulso de centrifuga. Dejar reposar 5 minutos en oscuridad.
- Mezclar nuevamente los viales con ayuda de un agitador vórtex y medir su absorbancia a 595 nm.
- La concentración de las muestras se calcula a partir de la ecuación de la recta patrón formada por las concentraciones conocidas de BSA y las absorbancias cuantificadas.
- Finalmente, para expresar la concentración en  $\mu$ g/ $\mu$ L se deberá multiplicar el valor obtenido por 2,5.

**Tabla 2.8. Volúmenes para la realización de la recta patrón en la cuantificación de proteínas por el método Bradford.**

$\mu$ g de proteínas	0,00	0,50	1,25	2,50	3,75	5,00	6,25	7,50	8,75	10,00
$\mu$ l solución de BSA (0,25 mg/ml)	0	2	5	10	15	20	25	30	35	40
$\mu$ l de agua destilada	800	798	795	790	785	780	775	770	765	760

### 2.16.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Una vez cuantificadas las proteínas se realizó un gel de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) a modo de control de calidad e integridad de las mismas.

Los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) constan de dos zonas diferenciadas, una fase superior destinada a concentrar las muestras y una fase inferior para que las muestras se separen por masa y tamaño.

- Limpiar todos los componentes del sistema con agua destilada y etanol absoluto.

- Montar la cubeta para la polimerización de geles de acrilamida con el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad) para geles de 6 x 8 cm según las indicaciones del fabricante, utilizando espaciadores de 0,75 mm.
- Colocar el peine y realizar una marca 0,5 cm debajo de este.
- Preparar 10 mL de la fase separadora (tabla 2.9), son suficientes para preparar dos geles de 0,75 mm de grosor. Lo último que se debe añadir a la mezcla es el TEMED y el persulfato de amonio, ya que estos dos componentes catalizan la reacción de polimerización.
- Mezclar con cuidado y depositar entre los cristales la fase separadora hasta la marca antes realizada con ayuda de una pipeta de 5 mL. Evitando la formación de burbujas dentro del gel.
- Añadir inmediatamente isopropanol sobre la solución y dejar polimerizar 30-45 minutos.
- Preparar 5 mL de la fase concentradora (tabla 2.10), los 5 mL son suficiente para la preparación de 2 geles.
- Colocar el peine para formar los pocillos entre los cristales y depositar la mezcla con cuidado con ayuda de una pipeta de 5 mL. Dejar polimerizar alrededor de 15-30 minutos.
- Diluir las muestras al menos 1:1 con tampón de muestra desnaturalizante<sup>15</sup>.
- Hervir las muestras 5 minutos para desnaturalizarlas y depositarlas inmediatamente en hielo.
- Retirar el peine, colocar los geles dentro de la cámara de electroforesis y llenarla con el tampón de electroforesis 1x<sup>16</sup>.
- Dispensar las muestras en los pocillos.
- Como referencia de tamaño incluir el marcador de peso molecular para proteínas *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad) (rango de tamaños 250-10 kDa).
- Llevar a cabo el desarrollo de la electroforesis a un voltaje constante de 80-90 V, hasta que la muestra se encuentre en la fase separadora y después de 120-140 V hasta que el frente correspondiente al colorante comience a salir por la parte inferior.
- Transferir el gel a una placa de Petri de 15 cm con la solución de fijación<sup>17</sup>. Fijar en agitación suave durante 30 minutos.
- Lavar 3 veces durante 10 minutos en agitación suave con agua destilada.
- Sumergir el gel en la solución de tinción<sup>18</sup> y dejar en agitación suave toda la noche (12-14 horas).

**15 Tampón de muestra desnaturalizante.** Tris-HCl 350 mM, pH 6,8; 10 % SDS; 30 % glicerol; 0,02 % azul de bromofenol y DTT 0,6 M.

**16 Tampón de electroforesis de Laemmli 10x:** Tris base 250 mM, glicina 2 M y 1 % SDS. El pH debe ser de 8,3 ( $\pm$  0,2).

**17 Solución de fijación.** 7 % ácido acético glacial, 7 % metanol; en agua destilada. Preparar en el momento de usarse.

**18 Solución de tinción Coomassie coloidal (método Blue Silver):** 10 % ácido fosfórico; 10 % sulfato de amonio; 0,12 % *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 20 % metanol en agua destilada. Conservar a temperatura ambiente y agitar 1 hora antes de su uso.

- Eliminar la solución de tinción y lavar repetidas veces con agua destilada en agitación suave hasta que el fondo del gel aparezca transparente.

**Tabla 2.9. Composición para 10 mL de fase separadora de geles SDS-PAGE.** Se detallan las cantidades para diferentes porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida, según del peso molecular de las proteínas de interés: 7,5 % entre 50 y 250 kDa; 10 % entre 37 y 150 kDa; 12 % entre 20 y 100 kDa; 15 % entre 10 y 60 kDa para preparar 10 mL.

	Concentración de acrilamida			
	7,5%	10,0%	12,0%	15,0%
Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1	2,50 mL	3,33 mL	4,00 mL	5,00 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL	2,50 mL
SDS 20 %	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Persulfato de amonio 10 %	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Agua Milli-Q	4,90 mL	4,02 mL	3,40mL	2,40 mL

**Tabla 2.10. Composición para fase concentradora de geles SDS-PAGE 4%.** Se detalla la composición para la elaboración de 5 mL.

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1	650 µL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,250 mL
SDS 20 %	25 µL
Persulfato de amonio 10 %	25 µL
TEMED	5 µL
Agua Milli-Q	3,045 mL

#### 2.16.4. Electroforesis bidimensional fluorescente (DIGE)

La técnica DIGE emplea colorantes fluorescentes como son el Cy3, Cy5 y Cy2 para el marcaje diferencial de las muestras antes de la electroforesis. Esta técnica permite comparar las proteínas de diferentes muestras para analizar las diferencias de expresión.

Para el marcaje de las proteínas es necesario que estén lo más limpias de impurezas y de residuos amida superfinos posible. Para ello se utilizó kit *2-D Clean-up Kit*<sup>TM</sup> (GE Healthcare).

**Protocolo 2-D Clean-up Kit™**

- Transferir un volumen no superior a 200 µL y que contenga 200 µg de proteínas a un tubo de 1,5 mL.
- Añadir 600 µL de la solución precipitante, mezclar con ayuda de un agitador tipo vórtex y dejar en hielo 15 minutos.
- Añadir 600 µL de la solución co-precipitante y mezclar brevemente con ayuda de un agitador tipo vórtex.
- Centrifugar a 16000 xg durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante y colocar de nuevo en la centrifuga para dar un pulso y eliminar todo el sobrenadante con ayuda de una micropipeta.
- Añadir 40 µL de la solución co-precipitante sobre el precipitado sin tocarlo y dejarlo 5 minutos en hielo.
- Centrifugar a 16000 xg durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante y colocar de nuevo en la centrifuga para dar un pulso y eliminar todo el sobrenadante con ayuda de una micropipeta.
- Añadir 25 µL de agua destilada sobre el precipitado y resuspender con ayuda de un agitador tipo vórtex.
- Añadir 1 mL de tampón de lavado refrigerado a -20 °C y 5 µL del aditivo de lavado. Agitar para que se disperse el precipitado (no se disuelve).
- Dejar a -20 °C durante al menos 30 minutos, se puede dejar toda la noche.
- Mezclar 30 segundos con ayuda de un agitador tipo vórtex cada 10 minutos.
- Centrifugar a 16000 xg durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante y colocar de nuevo en la centrifuga para dar un pulso y eliminar todo el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Dejar secar por 20 segundos.
- Se debe eliminar completamente el tampón de lavado, ya que acidificaría la muestra.
- Resuspender el precipitado con 20-25 µL de solución RB-2<sup>19</sup>. Agitar con ayuda de un termobloque a 25 °C y 1400 rpm hasta que el precipitado este completamente disuelto.
- Centrifugar a 16000 xg durante 5 minutos, para retirar materiales insolubles y eliminar las posibles burbujas generadas durante la homogenización.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL.
- La muestra deberá ser cuantificada de nuevo por el método Bradford y para ser marcada con *CyDye*.
- Se requiere al menos 75 µg de proteína total para el marcaje con una concentración final entre 5-10 µg/µL.

**19 Solución RB-2:** 8 M Urea; 4 % CHAPS; Tris 30 mM (añadir antes de usar). Filtrar con filtros de 0.45 µm (Millipore). Conservar a -20 °C

## Marcaje de muestras con fluoróforos

Una vez se ha verificado que se tiene la cantidad requerida para el marcaje con las cianinas *CyDye*, al menos 75 µg de proteína total, se prosigue con su marcaje. Este marcaje está compuesto por tres fluoróforos distintos: Cy3 (rojo), Cy5 (azul) y Cy2 (amarillo), todos ellos forman parte de los kits *CyDye DIGE Fluor Minimal Dye Labeling Kit* (GE Healthcare).

Las cianinas: Cy3 y Cy5 se utilizarán para el marcaje de las muestras (50 µg de muestra), mientras Cy2 se usará como marcaje del estándar interno (25 µg de todas las muestras).

### Preparación de los fluoróforos y de las muestras

- Medir el pH de las muestras usando 1 µL de las mismas y tira indicadora de pH.
- Acondicionar el pH para el marcaje de las muestras a 8,5-9,0 con NaOH 100 mM.
- Atemperar los fluoróforos a temperatura ambiente al menos durante 10 minutos para evitar la condensación de agua en el interior de los fluoróforos al abrirlos.
- Evitar la luz directa del sol sobre los fluoróforos.
- Preparar la **solución de trabajo** para 12 geles, añadiendo 12,5 µL de N,N-dimetilformamida anhidra (99,8%) a una cantidad de 5 nanomoles de fluoróforo, quedando estos a una concentración final de 0,4 nmol/µL. Esta solución Pueden almacenarse hasta 2 semanas a -20 °C.
- Homogenizar con ayuda de un agitador tipo vórtex durante 30 segundos y centrifugar 16000 xg durante 30 segundo.

### Marcaje de las muestras

- Añadir el volumen correspondiente a 50 µg de proteínas a un microtubo de 1,5 mL. Adicionar 1 µL de la solución de trabajo del fluoróforo correspondiente (400 pmoles de colorante cada 50 µg de proteínas). Evitar la luz del sol directa durante estos pasos.
- Homogenizar con ayuda de un agitador tipo vórtex y dar un pulso de centrifuga para recoger las muestras en el fondo del microtubo.
- Incubar las muestras en hielo durante 30 minutos en oscuridad para que se marquen las proteínas.
- Detener el marcaje adicionando 1 µL de L-lisina 10 mM (*nota 7*).
- Homogenizar con ayuda de un agitador tipo vórtex y dar un pulso de centrifuga.
- Dejar en hielo 10 minutos, para eliminar el exceso de colorantes que pueda haber en las muestras.

### Marcaje de control interno

- Recolectar en un microtubo de 1,5 mL el volumen correspondiente a 25 µg de cada una de las réplicas de cada muestra.
- Añadir 12 µL de fluoróforo Cy2.
- Homogenizar con ayuda de un vórtex y dar un pulso de centrifuga.
- Incubar las muestras en hielo 30 minutos en oscuridad.

- Detener el marcaje adicionando 12  $\mu\text{L}$  de L-lisina 10mM. Homogenizar con ayuda de un agitador tipo vórtex y dar un pulso de centrifuga.
- Dejar en hielo 10 minutos, para eliminar el exceso de Cy2 que pueda haber.
- El control interno estaría listo, se puede mezclar y congelar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o se puede desarrollar la primera dimensión.

**Nota 7.** Solución que secuestra el exceso de fluoróforos después del marcaje.

### Primera dimensión (isoelectroenfoque)

El isoelectroenfoque (IEF) se basa en la separación de las proteínas mediante un gradiente de pH inmovilizado al ser sometidas a un campo eléctrico. Las proteínas depositadas en la tira con pH inmovilizado presentaran una carga neta positiva o negativa que condiciona su punto isoeléctrico, de esta manera estas proteínas migrarán hasta que el pH de la zona de la tira sea igual a su punto isoeléctrico, donde se volverán con carga neta cero y se detendrán.

Durante este trabajo se utilizó un sistema *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare), utilizando tiras de 18 cm y pH inmovilizado de 4,0 a 7,0 y sarcófagos (*strip holders*) para tiras *Immobiline™ DryStrip*.

- Combinar las muestras marcadas con Cy3 y Cy5. Perteneciendo cada una de ellas a réplicas biológicas de distintas condiciones.
- Añadir 50  $\mu\text{g}$  del control interno a cada combinación de muestras. De esta manera se tendrían 12 combinaciones distintas, todas ellas junto con el control interno.
- Añadir tampón de rehidratación<sup>20</sup> (suplementado con 1 % de IPG buffer y 60 mM de DTT) hasta llegar a los 350  $\mu\text{L}$ .
- Mezclar y dar un pulso de centrifuga.
- Depositar los 350  $\mu\text{L}$  en un sarcófago para tiras del sistema *IPGphor Isoelectric Focusing System* evitando la formación de burbujas.
- Retirar el plástico de protección de la tira con el pH inmovilizado (*Immobiline™ DryStrip* de 18 cm) y con ayuda de pinzas colocarla con el lado con el gel deshidratado en contacto con las proteínas. Evitar la formación de burbujas.
- Cubrir la tira con 2,0-2,5 mL de aceite mineral para tiras *Immobiline™ DryStrip*.
- Inicial el programa de IEF  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un máximo de 85  $\mu\text{A}$ /tira El programa empleado fue: **i)** 1 hora a 0 V y 12 horas a 30 V (rehidratación); **ii)** 2 horas a 60 V; 1 hora a 500 V; 1 hora a 1000 V; **iii)** un gradiente de 30 minutos hasta 8000 V; y **iv)** 7 horas a 8000 V hasta alcanzar a los 50 kVh (kV/h totales acumulados).
- Una vez acabado el IEF, retirar las tiras de los sarcófagos y eliminar el aceite de cobertura con papel de filtro.
- Recoger las tiras y conservar en tubos de vidrio a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o continuar el proceso.

**20 Tampón de rehidratación.** Urea 8 M; 2 % CHAPS; 0,01 % azul de bromofenol. Filtrar a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Almacenar en alícuotas de poco volumen, congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Segunda dimensión (SDS-PAGE)

En la segunda dimensión se separarán las proteínas en función de su masa. Previamente a este paso se tratan las proteínas con DTT e iodoacetamida para romper los puentes disulfuro y que no se puedan volver a formar, además la presencia de SDS desnaturaliza las proteínas y les otorga carga negativa para que únicamente migren en función de su masa hacia el mismo polo.

La composición de los geles de acrilamida es semejante a la anteriormente descrita, aun así, la diferencia en tamaño de estos hace que se tengan que manejar de forma ligeramente distinta. Su composición se resume en la tabla 2.11.

**Tabla 2.11. Composición para los geles de acrilamida SDS-PAGE 12,5% para la segunda dimensión.** Se detalla la composición para la elaboración de 400 mL lo que equivaldría a 6 geles en el sistema *Ettan DALT Six* (GE Healthcare).

Acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1	166,8 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	100,0 mL
SDS 20 %	2,0 mL
Persulfato de amonio 10 %	2,0 mL
TEMED	132 $\mu$ L
Agua Milli-Q	129,2 mL

### Elaboración de los geles

- Limpiar a conciencia todos los componentes, pero especialmente los cristales usados en el sistema *Ettan DALT Six* con agua destilada y etanol absoluto.
- Mezclar todos los componentes para la elaboración de 6 geles en un kitasato, excepto el persulfato de amonio.
- Desgasificar la mezcla conectando el kitasato a una bomba de vacío, durante 10 minutos (*nota 8*).
- Montar el molde (*Gel caster*) para la preparación de los geles del sistema *Ettan DALT Six* que permite la elaboración de 6 geles de 1 mm de grosor simultáneamente.
- Añadir el persulfato de amonio a la solución y mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas.
- Dispensar la mezcla entre los geles, hasta llegar a 5-10 mm del borde superior de los cristales.
- Cubrir los geles con isopropanol y dejar polimerizar 30 minutos.
- Eliminar el isopropanol y añadir buffer de electroforesis 1x<sup>21</sup>.

**21 Tampón de electroforesis.** Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; glicina 1,92 M; 1 % (p/v) SDS. Para una electroforesis en el sistema *Ettan DALTsix*, preparar 1 L de tampón de electroforesis 5x para la cámara inferior (15,2 g Tris base; 72 g glicina; 5 g SDS) y 1,4 L de tampón de electroforesis 2x para la cámara superior (8,5 g Tris base; 40,3 g glicina; 2,8 g SDS), cada uno en una probeta limpia, incluyendo una barra de agitación magnética en la del tampón de la cámara superior.

- Proteger contra la evaporación con film transparente y dejar polimerizar toda la noche (12-14 horas).
- Los geles se pueden almacenar un máximo de 48 horas a 4 °C.
- Eliminar el buffer de electroforesis 1x y lavar con agua destilada el frente del gel.

**Nota 8.** Este paso se realiza para la eliminación de todas las burbujas que puedan interferir en la polimerización de los geles.

### Equilibrado de las tiras

- Descongelar las tiras si estaban guardadas a -80 °C dejándolas a temperatura ambiente unos minutos.
- Añadir 4,87 mL de tampón de equilibrado al tubo con la tira, el tampón de equilibrado deberá estar suplementado con 130 µL de DTT 2,5 M.
- Colocar el tubo en horizontal, dejando el lado del plástico de la tira de IEF en contacto con el tubo (no la acrilamida) e incubar 15 minutos a temperatura ambiente en leve agitación.
- Retirar el tampón de equilibrado, y añadir 5 mL de tampón de equilibrado nuevo suplementado con 200 mg de iodoacetamida.
- Colocar el tubo en horizontal, dejando el lado del plástico en contacto con el tubo (no la acrilamida) e incubar 15 minutos a temperatura ambiente en leve agitación.
- Lavar las tiras a través de inmersión en agua MQ.
- Depositar las tiras sobre papel Whatman 3MM con la parte de la acrilamida hacia arriba.
- Retirar 5 mm de los extremos de cada tira con ayuda de unas pinzas.
- Colocar las tiras entre los cristales que contienen los geles. Tener en cuenta en la colocación de la tira la posición de los polos (positivo a la izquierda).

### Electroforesis SDS-PAGE

- El sistema *Ettan DALT Six* consta de dos cámaras, en la superior se depositará el tampón de electroforesis a una concentración 2x, mientras que en la inferior se depositará a una concentración 1x.
- Añadir a la cámara de electroforesis inferior 1 litro de una solución 5x del tampón de electroforesis y 4 L de agua MQ. El mismo sistema de electroforesis es capaz de mezclar la solución a través de la bomba que lleva incorporado.
- Fijar el sistema *MultiTemp III* de control de temperatura 20-25 °C.
- Con ayuda de un vaso de precipitados recoger 700 mL de la solución 1x de la cámara de abajo.
- Introducir los geles en la cámara de abajo del sistema *Ettan DALT Six* e introducir el separador que proporciona el sistema que separa la cámara superior de la inferior. Añadir de los 700 mL la cantidad necesaria para llenar la cámara de abajo.
- Añadir 1,4 L de tampón de electroforesis 2x en la cámara superior.

- Para incluir el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad), pipetear 5 µL en un papel Whatman 3MM de 10-15 mm de largo y 2 mm de ancho, introducirlo en el extremo izquierdo de la tira (extremo positivo).
- Realizar la electroforesis a 25 °C, en dos etapas: **i)** 3-5 W/gel, durante 30 min; y **ii)** 15-20 W/gel (180 W máximo) durante 3,5-4,0 h (hasta que el frente del colorante esté a 1 mm del final del gel).
- Una vez finalizada, desmontar el sistema y proceder a la detección de proteínas.

### 2.16.5. Detección y análisis mediante 2D-DIGE

- Sacar los geles que se encuentran entre los cristales dentro de la cámara de electroforesis.
- Limpiar los cristales con agua del grifo y aclararlos con agua ultrapura (MQ).
- Secar los cristales con papel sin polvo.
- Colocar los cristales con el gel en su interior en el escáner *Ettan™ DIGE Imager* (GE Healthcare).
- Escanear los geles con filtros con filtros *CyDye* usando un tamaño de pixel de 100 µm.
- Una vez se han escaneado los geles, sacarlos de los cristales con ayuda de una espátula para separar con cuidado los dos cristales que cubren el gel.
- Fijar y teñir tal y como se indica en el apartado 2.16.3, pero con mayores cantidades de las soluciones. 250-300 mL de solución de fijación y de solución de tinción Coomassie coloidal.
- Una vez los geles están teñidos, escanearlos con el equipo *ImageScanner III* (GE Healthcare Life Sciences).

Las imágenes generadas por el escáner fueron analizadas a través del software *DeCyder™ differential analysis v7.0* (GE Healthcare), dentro de este análisis se pueden encontrar.

- ❖ El módulo DIA (*Differential in Gel Analysis*) detecta y define el contorno de cada punto proteico dando un volumen normalizado del mismo. Es capaz de detectar y comparar las tres imágenes generadas a través de los tres fluoróforos usando algoritmos que compararan ese volumen en una condición y el mismo volumen en el control interno. La comparación de cada punto proteico con su control interno hace que sea más sencillo y preciso la comparación entre geles evitando variaciones.
- ❖ El módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) detecta y cuantifica estadísticamente la varianza existente entre el mismo punto en los diferentes geles. Esto otorga una significación estadística a la variación existente entre condiciones distintas. La varianza entre los distintos geles fue corregida apareando y

normalizando los puntos proteicos a través del control interno, el gel con mayor número de puntos proteicos se designa como el “gel maestro”.

- ❖ Estos análisis estadísticos permiten la selección de los puntos diferencialmente expresados cuya varianza entre los geles de la misma condición no fuera estadísticamente significativa, para ello el módulo BVA realiza una serie de pruebas estadísticas como el promedio de proporciones, distribución t-student, test ANNOVA. También se aplicó el análisis estadístico FDR (*False Discovery Rate*) para evitar la detección de proteínas detectadas como expresadas diferencialmente de forma errónea.
- ❖ Para la selección de los puntos proteicos de interés se aplicaron una serie de criterios:
  - Cambio lineal de la abundancia entre dos condiciones mayor o menor a 1,5 veces.
  - Significación estadística con valor p menor de 0,05.
  - Presencia del punto proteico al menos en el 70% de las imágenes analizadas.
- ❖ El módulo EDA (*Extended Data Analysis*) que permite el análisis estadístico multivariante con los datos generados a través del módulo BVA. De esta manera se realizó en análisis de los componentes principales (PCA) y se definieron los perfiles de expresión proteicos para cada una de las condiciones.

### 2.16.6. Extracción de puntos proteicos y digestión triptica

Durante el escaneado de los geles usando el equipo *ImageScanner III* (GE Healthcare Life Sciences) se elige el gel maestro como base para localizar los puntos dentro del gel. Si la cantidad proteica en los geles usados no fuera suficiente para poder encontrar la mayoría de los puntos proteicos diferencialmente expresados y detectados por fluorescencia se puede realizar unos geles preparativos, con una mezcla de todas las muestras y sin marcar con fluoróforos, utilizando una mayor cantidad de proteínas para poder visualizarlas dentro de los geles. Estos geles “preparativos” deberán ser escaneados de la misma manera y los puntos diferencialmente expresados localizados dentro de ellos. Una vez se han situado los puntos proteicos dentro de los geles que se usarán para su aislamiento estos deberán de ser extraídos y digeridos con tripsina para su posterior identificación.

#### Extracción de puntos proteicos

- Desde geles teñidos y con los puntos localizados.
- Con ayuda de una punta de pipeta cortada extraer el punto donde se encuentra la proteína y depositarlo en un microtubo Eppendorf de 1,5 mL original de Eppendorf sin autoclavar.

- Añadir agua ultrapura (MQ) hasta que cubra el trozo de acrilamida con el punto proteico en su interior. Guardar a 4 °C hasta que se procesen las muestras.

### Limpieza y preparación de las muestras

- Eliminar el agua ultrapura (MQ) y deshidratar los puntos añadiendo 50 µL de acetonitrilo. Agitar con ayuda de un termobloque a 25 °C y 1400 rpm 5 minutos.
- Dar un pulso de centrifuga y retirar el acetonitrilo. Añadir 50 µL de agua ultrapura (MQ) y agitar con ayuda de un termobloque a 25 °C y 1400 rpm 5 minutos.
- Recoger en la parte inferior todo el contenido del microtubo mediante un pulso de centrifuga y retirar el agua ultrapura (MQ).
- Repetir los pasos anteriores hasta que se haya eliminado el azul de Comassie y los trozos de acrilamida tengan un color blanquecino.
- Retirar el acetonitrilo y secar los puntos utilizando una centrifuga de vacío (*speed-vac*) durante 10-15 minutos. Alternativamente, si se elimina el acetonitrilo del todo se pueden dejar evaporar los restos.
- Preparar una solución de bicarbonato amónico<sup>22</sup>.
- Suplementar 990 µL de la solución con bicarbonato de amonio 25 mM con 10 µL de DTT 1M (solución DTT 10 mM).
- Suplementar 1 mL de la solución de bicarbonato de amonio 25 mM con 10 mg de iodoacetamida (solución iodoacetamida 55 mM). Proteger de la luz.
- Con los puntos proteicos completamente secos. Añadir la solución de DTT 10 mM hasta cubrir el trozo de acrilamida. Incubar a 56 °C y 300 rpm durante 30 minutos.
- Eliminar la solución de DTT 10 mM y añadir acetonitrilo hasta cubrir los puntos proteicos para deshidratarlos, que se retirara inmediatamente después.
- Añadir la solución de iodoacetamida 55 mM hasta cubrir el punto proteico e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad.
- Retirar la solución de iodoacetamida 55 mM, añadir acetonitrilo hasta cubrir el punto e incubarlo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Retirar el acetonitrilo.
- Añadir 50 µL de la solución de bicarbonato de amonio 25 mM e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Sin eliminar la solución de bicarbonato de amonio, añadir 50 µL de acetonitrilo (relación bicarbonato de amonio: acetonitrilo siempre 1:1). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar el sobrenadante y secar los puntos proteicos en la centrifuga de vacío (*speed-vac*) hasta su la completa deshidratación (15-30 minutos).

### Digestión trípica

- Añadir tripsina a una concentración final de 12,5 ng/µL en bicarbonato de amonio 25 mM. (30 µL de tripsina en 300 µL de bicarbonato de amonio para 24 puntos proteicos).
- Añadir la solución de bicarbonato de amonio con tripsina en las muestras hasta cubrir los puntos. Recoger en el fondo del microtubo mediante un pulso de centrifuga e incubar en hielo 45 minutos.

**22 Solución bicarbonato de amonio 25mM.** 160 mg de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en 80 mL de agua Milli-Q.

- Dar un pulso de centrifuga y eliminar los restos de la solución que no se hayan introducido en el punto de acrilamida.
- Cubrir los puntos con 50  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amonio 25mM e incubar preferiblemente toda la noche a 37  $^{\circ}\text{C}$ , al menos 6 horas.
- Tras la digestión, dar un pulso de centrifuga para recoger las proteínas digeridas al fondo del tubo.
- Pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo Eppendorf de 1,5 mL, donde se recogerá las extracciones de péptidos.

#### Extracción de péptidos

- Añadir 10  $\mu\text{L}$  a los puntos de la solución de extracción<sup>23</sup> y sonicar 5-10 minutos.
- Dar un pulso de centrifuga y recuperar todo el sobrenadante que se transferirá al microtubo Eppendorf de 1,5 mL en el que ya estaban las extracciones de péptidos.
- Repetir esta operación tres veces recogiendo el sobrenadante generado.
- Secar el contenido del microtubo Eppendorf de 1,5 mL donde se ha recogido las extracciones de péptidos en centrifuga de vacío (*speed-vac*) a 30  $^{\circ}\text{C}$  (2-4 horas).
- Una vez seco, resuspender el contenido en 4  $\mu\text{L}$  de solución de resuspensión<sup>24</sup>. Los tubos pueden guardarse a 4  $^{\circ}\text{C}$  con el precipitado proteico o con la solución de resuspensión.
- Cargar 1  $\mu\text{L}$  en la placa de MALDI TOF/TOF.
- Dejar secar completamente la gota proteica y añadir sobre esta la 0,5  $\mu\text{L}$  de la solución matriz<sup>25</sup>. Introducir en el MALDI TOF/TOF.

### 2.16.7. Identificación proteica mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas asociada a detector MALDI TOF/TOF permite el análisis de biomoléculas a través de la ionización suave de estas, con su detección a través del tiempo que tardan en atravesar un campo eléctrico (tiempo de vuelo: TOF).

Para la detección de proteínas se usó un espectrómetro de masas *4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF* (AB Sciex). Para calibrar el espectrómetro se usó la mezcla de calibración 4700 (Cal Mix 5; AB Sciex). Se utilizó a su vez una calibración interna con los espectros derivados de la auto digestión de la tripsina.

Los péptidos observados en cada punto proteico (hasta 65 por puntos) fueron adquiridos como una lista de masas moleculares mono-isotrópicas con una relación señal/ruido superior de 20, utilizando el programa *4000 Series Explorer v.3.5.3* (AB Sciex). Los contaminantes conocidos fueron descartados del análisis por MS/MS. A partir de cada espectro los 10 precursores más intensos fueron seleccionados para su fragmentación (tándem MS) mediante

**23 Solución de extracción.** 50% acetonitrilo (AcN) con 0.5 % ácido trifluoroacético (TFA), en agua destilada.

**24 Solución de resuspensión:** 50 % AcN con 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA), en agua destilada.

**25 Solución matriz:** Saturar una solución 50 % acetonitrilo, 50 % agua Milli-Q y 0,1 % TFA, con ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinámico. Proteger de la luz. Esta solución puede almacenarse a 4  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante varios días.

disociación inducida por colisión (CID) empleando gas atmosférico y utilizando un tamaño de ventana de precursor de  $\pm 7$  Da y en modo reflector de iones de 2-KV. Todo ello, genero para cada punto proteico una huella peptídica (PMF) y una serie de espectros de tándem MS que se usaran para la identificación de las proteínas.

Con el objetivo de identificar las proteínas se comparó la huella peptídica y los espectros tándem MS con bases de datos de proteínas generadas a partir de las secuencias. Para ello, se utilizó todo género *Bacillus*, además de los genomas de las cepas secuenciadas, mediante una licencia local de Mascot v.2.2 (Matrix Science), a través del servidor Global Protein v.3.6 (Applied Biosystems).

Para la búsqueda de las proteínas se establecieron los siguientes criterios: **i)** se consideraron modificaciones fijas y variables (s-carbamidometilación de las cisteína y metionina oxidada como metionina), **ii)** se permitió la pérdida de un sitio de corte por péptido (*misclearage*), **iii)** se permitió una tolerancia de 50-100 ppm para el ion precursor en PMP (*peptide mass fingerprint*), **iv)** se permitió una tolerancia de 0,3 Da para los fragmentos generados por MS/MS, y **v)** se consideró que la carga de los péptidos es +1, y **vi)** se especificó el uso de tripsina como enzima de digestión.

Las identificaciones fueron dadas por validas cuando la puntuación global (score) de Mascot fue mayor de 83, como indicaba la base de datos según el funcionamiento de la misma, con un nivel de significación  $p < 0,05$ . Además, debía de tener al menos un 20% de cobertura de la secuencia de la proteína o más de 2 péptidos por tándem MS.

## 2.17. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS UTILIZADAS

### 2.17.1. Análisis estadísticos

- ❖ The Statgraphics Centurion XVI version 16.1.11 (Warrenton, VA, USA).

### 2.17.2. Análisis de genomas

- ❖ DNASTAR Lasergene v.7.1.0 (DNASTAR).
- ❖ KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).
- ❖ COGs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).
- ❖ Clustal W2 ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)).
- ❖ antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>).
- ❖ BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>).
- ❖ RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

- ❖ **Multiple Sequence Alignment Viewer** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msviewer/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msviewer/)).
- ❖ **dbCAN2** (<https://bcbl.unl.edu/dbCAN2/>).
- ❖ **Resistance Gene Identifier** (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>).

---

---

### 2.17.3. Bases de datos

- ❖ **GenBank** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)).
- ❖ **BioCyc** (<http://biocyc.org/>).
- ❖ **EMBL-EBI** ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)).
- ❖ **Mascot server** ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)).
- ❖ **BLAST** ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).
- ❖ **CAZymes** (<http://www.cazy.org/>).

---

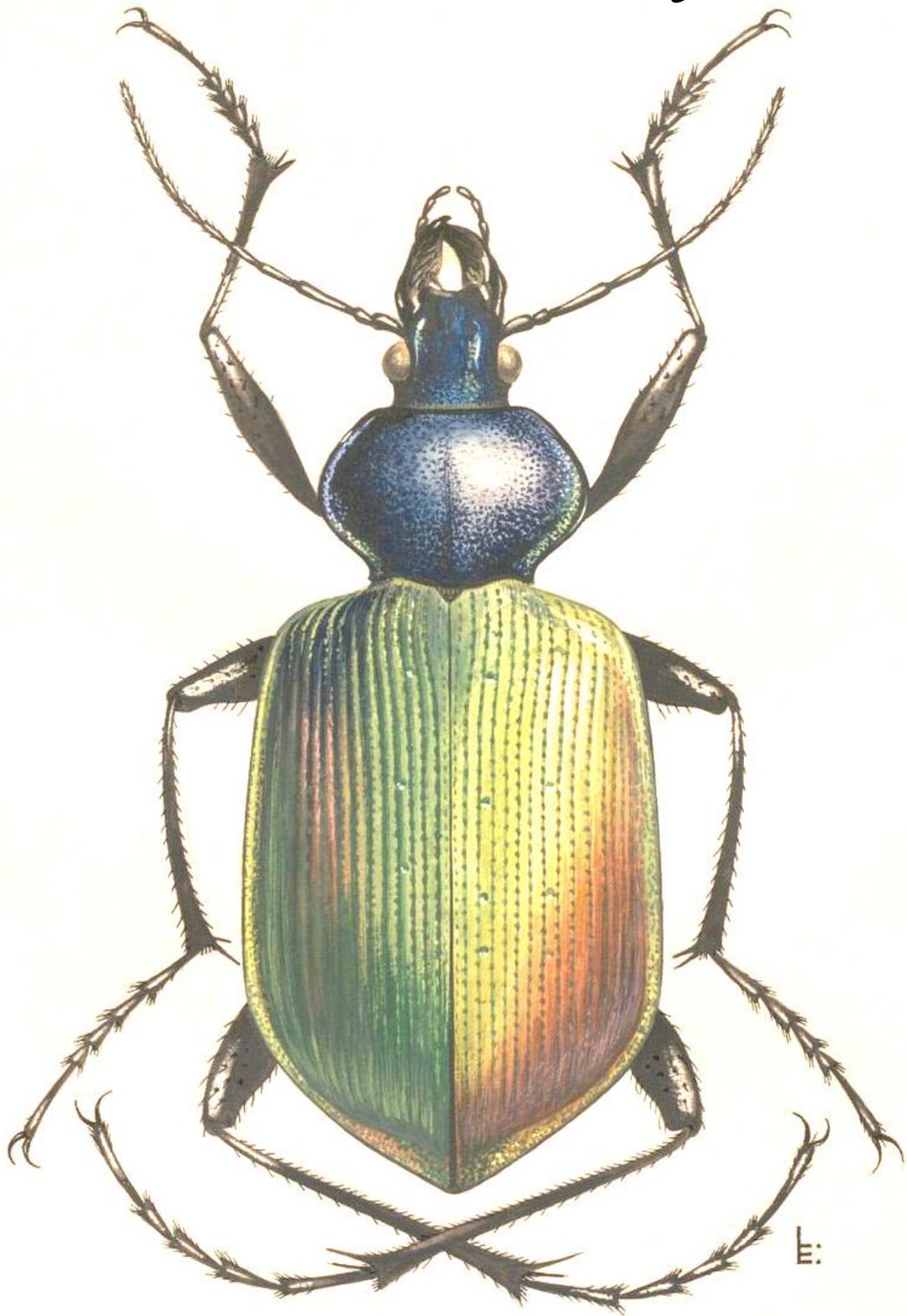
---

### 2.17.4. Análisis filogenético

- ❖ **Type (Strain) Genome Server** (<https://tygs.dsmz.de/>).
- ❖ **FigTree v.1.4.4** (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).
- ❖ **MEGA** (<https://www.megasoftware.net/>).



### 3. Resultados y discusión



*Cáрабо irisado - Calosoma sycophanta*. Por Luis Esteban Matamala (1911-1960). Fondo Especial Colecciones Iconográficas



## CAPÍTULO 1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DESDE MADERA EN DEGRADACIÓN

### 3.1.1. Introducción y objetivos del capítulo

La capacidad de aislar, identificar y caracterizar los microorganismos presentes en diferentes nichos ecológicos no solamente da una idea de la organización, diversidad y relaciones que esos microorganismos pueden tener en ese entorno, sino que también permite la selección de aquellos de interés, o de sus productos derivados, en procesos industriales que engloban todo tipo de mercados (Wright, 2017).

Para conocer la diversidad de un determinado ambiente pueden utilizarse distintas clases de técnicas que permiten observar diferentes partes del mismo. La secuenciación de todo el metagenoma de una muestra puede dar una visión clara sobre las especies que conviven en ella, mientras que el aislamiento y cultivo de microorganismos permite realizar estudios funcionales, taxonómicos y genéticos de las cepas aisladas (Vieira & Nahas, 2005). El estudio de estas cepas, gracias a los actuales avances en la caracterización del genoma, proteoma y metaboloma, puede conducir al descubrimiento de capacidades biosintéticas no caracterizadas o crípticas que lleven a obtener nuevas moléculas de interés (Sang *et al.*, 2019; Wright, 2017).

La madera en degradación es un nicho ecológico en sí mismo. Por un lado, la competición por parte de los hongos por el sustrato disponible crea unas dinámicas donde estos hongos utilizan todo su arsenal biosintético para competir con el resto. (Hage & Rosso, 2021; Hiscox & Boddy, 2017). Por otro, las bacterias presentes tienen que ser capaces de poder convivir en este sistema, ayudando o perjudicando, a estos hongos degradadores de madera (Johnston *et al.*, 2016). Todo ello, crea un ambiente de competición entre hongos y bacterias propicio para el desarrollo de compuestos bioactivos implicados en la defensa y competición, lo que convierte este nicho ecológico en un ambiente donde buscar y aislar a estos microorganismos.

Por todo ello, los objetivos de este capítulo son:

- Elaboración de un protocolo para la extracción de microorganismos de madera.
- Aislamiento de microorganismos de las diferentes partes de la madera.
- Análisis metagenómico de la diversidad microbiana de muestras de madera en degradación.

### 3.1.2. Muestreo de madera en degradación

#### **3.1.2.1. DEFINICIÓN DE CONDICIONES DE MUESTREO Y ETIQUETADO**

El primer paso fue establecer un protocolo estandarizado para la recogida y el procesamiento de muestras, este protocolo recoge información del lugar de recolección, la época del año y el número de muestras que se procesan. A cada muestra se le asigna un código

identificativo único y se anotó características sobre ella como su estado (si es madera sana o es madera en degradación) o la especie de árbol de la muestra recogida. Todo ello creo una base de datos de las muestras que se habían recogido que será indispensable para interpretación de los datos finales. El protocolo seguido esta detallado en el apartado 2.5.

Los códigos utilizados hacen referencia a la muestra recogida dando información sobre su origen V (Villavieja, España), P (Trondheim, Noruega) y E (Krupina, Eslovaquia). Además, cada muestra de madera fue separada, cuando fue posible, en tres zonas de muestreo, corteza (corteza), cambium (intercorteza) y duramen (serrin), identificando cada una de estas zonas con una letra tal como se muestra en la figura 3.1.1.



V2 – Villavieja (León). Muestra numero 2

V2C – Zona de la corteza

V2i – Zona de la intercorteza

V2S – Zona serrin

V2C1 – Numero de cepa. Cepa numero 1

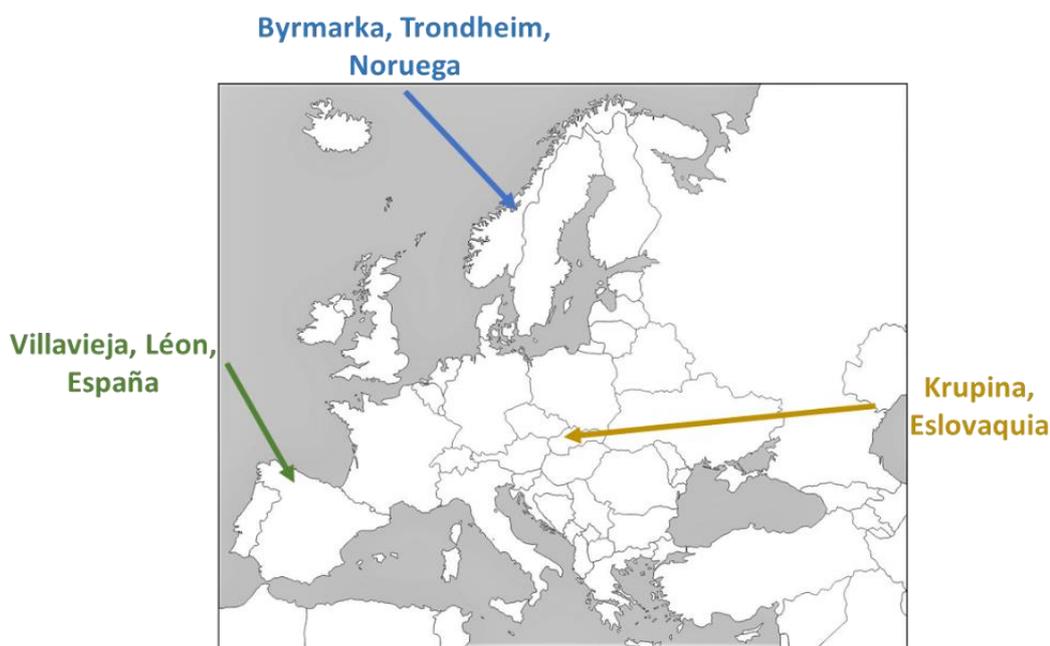
aislada de una zona de una muestra

**Figura 3.1.1. Etiquetado para muestra de madera recogida.** Cada muestra se dividió en tres zonas para realizar la extracción de los microorganismos, corteza (C), intercorteza (i) y serrin (S).

Aunque la madera en degradación es un ecosistema en sí mismo, las diferentes localizaciones geográficas pueden influenciar la cantidad y la diversidad de microorganismos presentes en las muestras. Así, las dos principales localizaciones de muestreo se corresponden con bosques completamente distintos, los bosques pertenecientes al municipio de Villavieja, en El Bierzo (León, España, 42,485015, -6,684764, 765 m s. n. m), están localizados en una zona biogeográfica denominada la Hoya del Bierzo, en la cual, se combinan los dos principales macroclimas de la Península Ibérica, el clima mediterráneo y el clima templado (Rivas-Martínez *et al.*, 2011). En esta zona conviven especies arbóreas propias de ambos macroclimas, estando principalmente representada por especies de hoja caduca como el castaño o el cerezo. Por ello, de esta zona se recogieron muestras de árboles de madera dura que se han usado tanto en construcción [castaño (*Castanea sativa*), cerezo (*Prunus avium*) y nogal (*Juglans regia*)] como en la fabricación de muebles [roble (*Quercus robur*), peral (*Pyrus communis*), morera (*Morus alba*), olivo (*Olea europaea*), fresno (*Fraxinus excelsior*) y mimbrera (*Salix viminalis*)] (Díaz González & Penas, 2017; Rivas-Martínez *et al.*, 2011). Por otro lado, los bosques situados en Bymarka (Trondhheim, Noruega, 63.40667, 10.31278, 290 m s. n. m.) son parte del denominado Bosque Boreal, este tipo de ecosistema, uno de las más grandes masas forestales existentes en la Tierra, se caracteriza por una composición vegetal simple comparada con otras masas boscosas (Gower *et al.*, 2001). En este caso el bosque boreal

situado en Fenoscandia (península escandinava, península de Kola, Carelia y Finlandia) está compuesto mayoritariamente por cuatro géneros arbóreos, dos coníferas [pino (*Pinus silvestris*) y picea (*Picea abies*)] y tres de hoja caduca [abedul común (*Betula péndula*), abedul pubescente (*Betula pubescens*) y álamo (*Populus tremula*)] (Bright *et al.*, 2014; Thomas & MacLellan, 2009). Durante la recogida de muestras se centró la atención en las maderas usadas preferentemente para la construcción, como son ambas coníferas.

Se recogieron y procesaron 27 muestras cumpliendo lo indicado en el apartado 3.2.1, que consistían en trozos o ramas de madera en diferente estado de degradación. Trece de las muestras provinieron de los bosques alrededor de la localización berciana de Villavieja (León, España), doce de los bosques de Byrmarka (Trondheim, Noruega), una fue recogida de una carpintería de la ciudad de León y la última fue recogida de una casa antigua derruida en Krupina (Eslovaquia, 48.43654, 19.03449, 600 m s. n. m.). En la figura 3.1.2 se detallan los diferentes orígenes de las muestras.



**Figura 3.1.2. Mapa de las localizaciones de muestreo.** Se recogieron en total 27 muestras de tres países distintos.

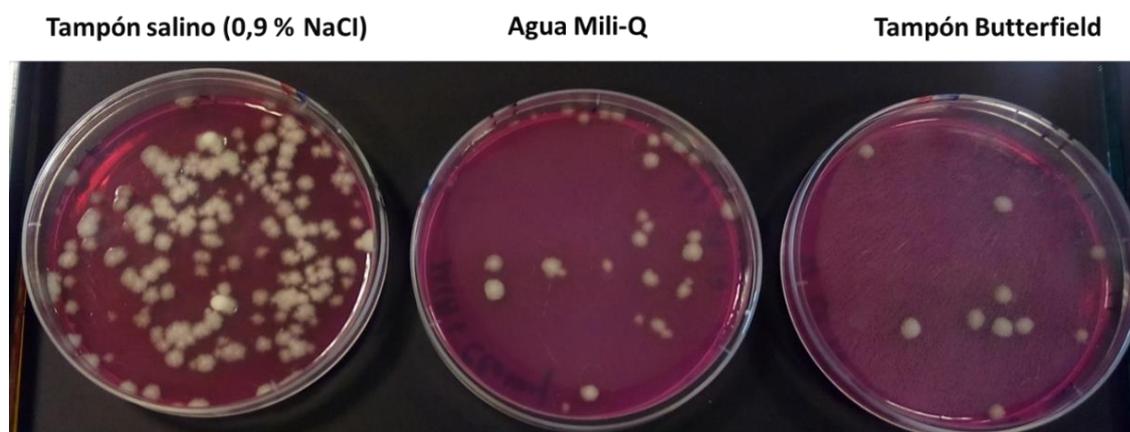
Como se ha indicado en la figura 3.1.1, cada una de las piezas de madera recogidas se procesó para obtener muestras de tres zonas distintas (corteza, cambium y duramen), por el estado de degradación de las mismas no siempre fue posible el muestreo de las tres zonas en todas las muestras, por ello, al final se obtuvieron de las 27 piezas de madera 70 muestras independientes para el aislamiento microbiano posterior.

### **3.1.2.2. CONDICIONES DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS**

Con el objetivo de obtener el mayor número de microorganismos desde cada muestra ambiental se probaron diferentes tampones de extracción para conocer cuál de ellos conseguía

obtener la máxima cantidad de colonias diferentes de una misma muestra de madera. De esa manera se testaron dos tampones, tampón salino (0,9% NaCl) y tampón Butterfield, y agua Mili-Q (ultra pura). Las tres soluciones han sido utilizadas ampliamente para el aislamiento de hongos y bacterias desde diferentes fuentes (Fangio *et al.*, 2010).

El resultado de esta comparación se puede ver en la figura 3.1.3, en ella se muestra que la extracción realizada con tampón salino proporcionaba placas con un mayor número de colonias que las otras dos opciones pudiendo de esta manera aislarse una mayor cantidad de colonias.



**Figura 3.1.3. Extracción de hongos desde madera con distinto tampón.** De izquierda a derecha, agua Mili-Q y tampón Butterfield.

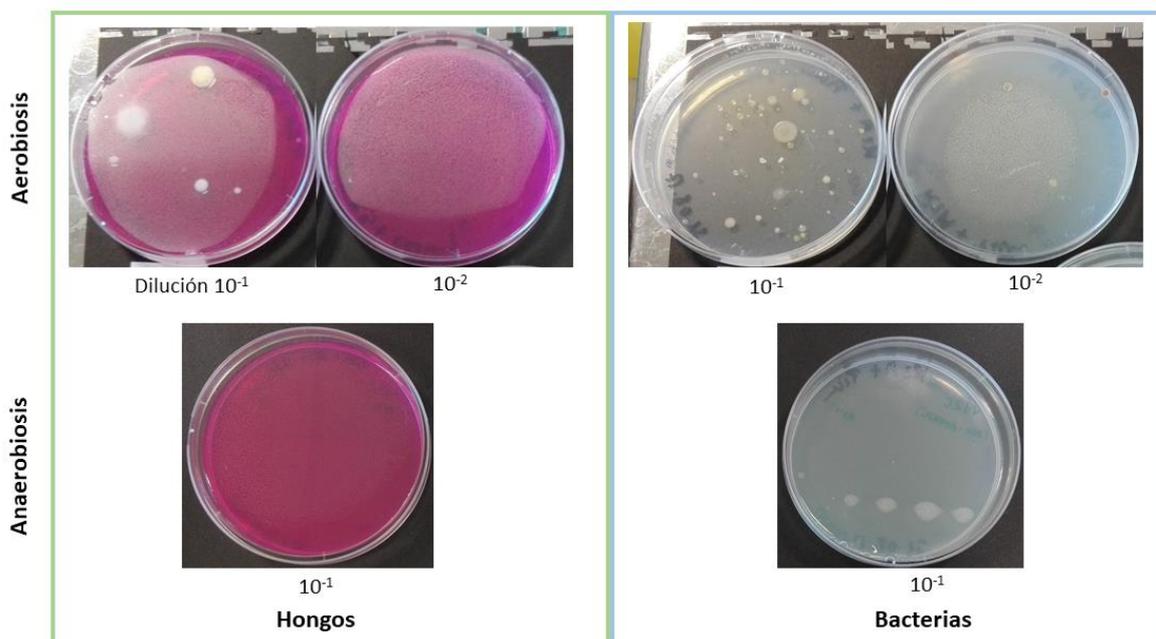
Nótese que las diferencias en la extracción con diversos tampones pueden deberse a numerosas causas, en este caso fue sorprendente el bajo número de especies encontradas en los experimentos realizados con tampón Butterfield, ya que este ha sido usado durante los años el tampón de referencia para el aislamiento tanto de bacterias como de hongos de diferentes ambientes (Murphy *et al.*, 2022).

### **3.1.2.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Durante este trabajo se han aislado microorganismos de climas templados como España, y de climas más fríos como es el caso de Noruega. Para el crecimiento de microorganismos se establecieron unas condiciones de cultivo que abarcaran la mayor cantidad de microorganismos posible y que, además, estos pudieran ser útiles para un posible desarrollo industrial. Este último requisito sitúa la búsqueda en los microorganismos mesófilos o termotolerantes.

Para ello, de acuerdo con la bibliografía consultada, se probaron tres temperaturas de crecimiento 25 °C, 28 °C y 30 °C (Embacher *et al.*, 2021; Giordano *et al.*, 2009). La primera opción (25 °C) fue la que mejores resultados de crecimiento obtuvo en las primeras muestras analizadas, por lo que se estableció esta temperatura de cultivo en todas las muestras.

Aunque los principales degradadores de madera actúan de forma aerobia, se ha visto que especies anaerobias o aerobias facultativas pueden estar involucradas en algunos tipos de degradación bacteriana de la madera (da Silva *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2016). Además, la utilización de bacterias anaerobias para la degradación del material lignocelulósico en procesos industriales, a través de diferentes especies de *Clostridium* spp., puede ser económicamente viable gracias a que la conversión directa del material lignocelulósico a etanol puede darse en un único proceso anaerobio (Demain *et al.*, 2005). Es por ello que se probó el cultivo de bacterias anaerobias a través de bolsas y cámaras de anaerobiosis de las muestras procedentes de la corteza y el duramen de la madera en degradación. Como se puede observar en la figura 3.1.4 en anaerobiosis no creció ninguna colonia en bacterias ni en hongos, por lo que se descartó seguir con la búsqueda en el resto de muestras.



**Figura 3.1.4. Cultivo de bacterias y hongos en anaerobiosis.** Cultivo de las muestras de madera en condiciones de aerobiosis (arriba) y anaerobiosis (abajo) en hongos (panel izquierdo) y bacterias (panel derecho).

#### **3.1.2.4. SELECCIÓN DE MEDIOS**

Para el aislamiento de microorganismo presentes en la madera en degradación fue necesario definir los medios de cultivo que sean capaces de aislar la mayor variedad de microorganismos usando la menor cantidad de medios de cultivo. Siguiendo este planteamiento durante esta investigación se empezó con 17 medios distintos para el aislamiento de hongos, los cuales estaban suplementados, en algunos casos, con rosa de Bengala (RB), dando un total de 26 combinaciones diferentes, tal como se puede ver en la tabla 3.1.1 y en la figura 3.1.5.

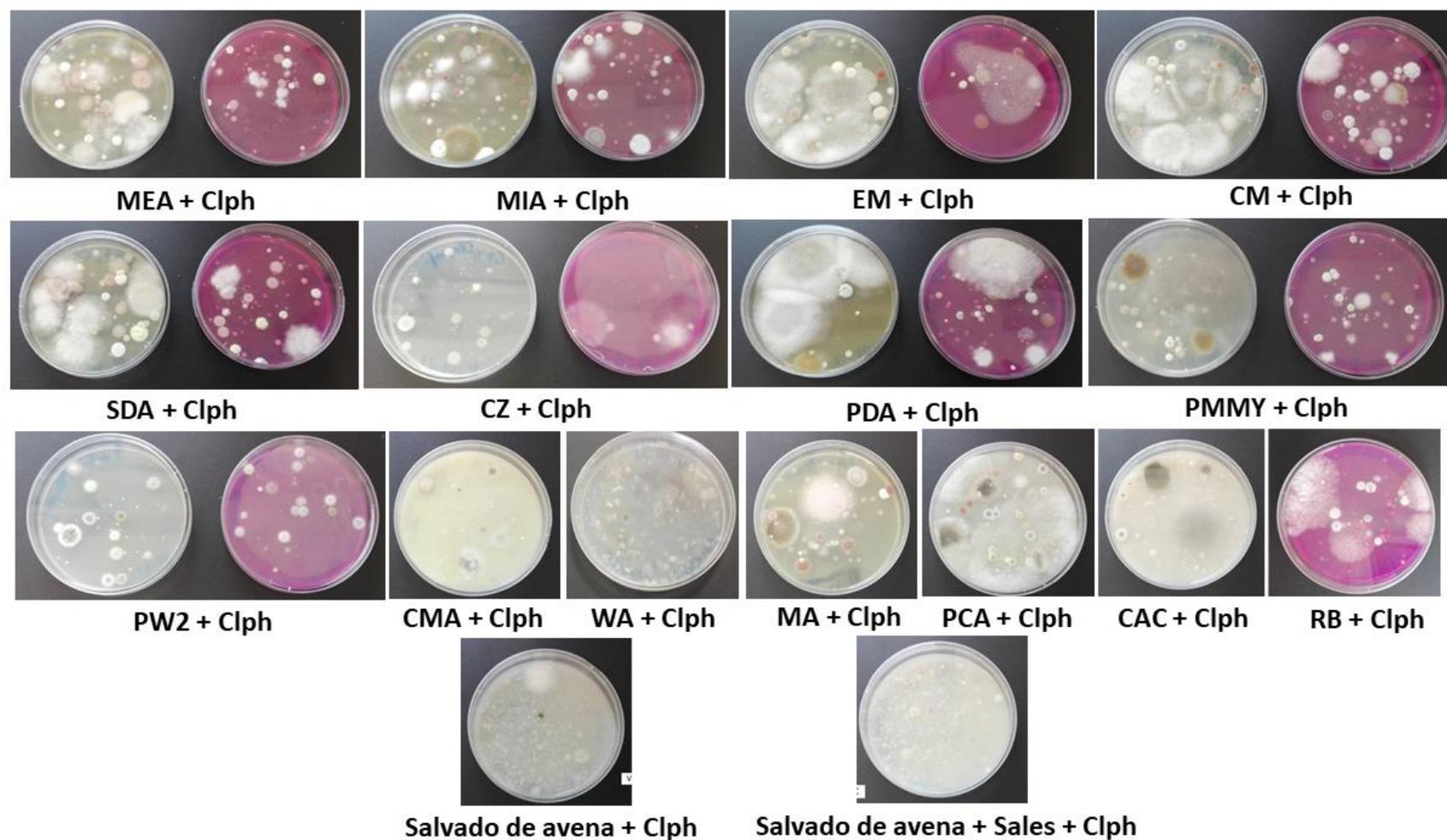
El rosa de Bengala se utilizó debido a su capacidad como inhibidor del crecimiento de bacterias y además, retrasa el crecimiento de algunos hongos filamentosos. El sobrecrecimiento de este tipo de hongos puede cubrir completamente la placa de cultivo

enmascarando otras especies que se encontraran en la muestra. Por ello, el uso de rosa de Bengala permite el aislamiento de más variedad de hongos y levaduras (Jayaram & Nagao, 2018). Por otro lado, también se añadió cloranfenicol como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias.

Aunque esta cantidad de medios hubiera permitido el aislamiento de diferentes tipos de hongos, el número de medios era excesivo para la cantidad de muestras que se quería procesar (70 muestras), por lo que se decidió intentar reducir el número de medios utilizados.

**Tabla 3.1.1. Medios utilizados para el aislamiento de hongos en la muestra V8.** Aquellos medios donde se observaron más de 200 UFC o más de 20 cepas diferentes aisladas han sido resaltados en negrita.

Medio	UFC en todas las placas	Cepas aisladas
<i>CHROMagar Candida (CAC)</i>	70	13
<i>Complete Medium (CM)</i>	80	12
<i>Complete Medium + Bengal Rose (RB)</i>	91	<b>22</b>
<i>Cornmeal Agar (CMA)</i>	130	<b>20</b>
<i>Czapek- Dox (Cz-DOX)</i>	150	7
<i>Czapek- Dox + RB</i>	119	12
<i>Malt Extract Broth (EM)</i>	130	6
<i>Malt Extract Broth + RB</i>	<b>276</b>	18
<i>Malt Agar (MA)</i>	113	<b>20</b>
<i>Malt Extract Agar (MEA)</i>	100	5
<i>Malt Extract Agar + RB</i>	<b>320</b>	<b>25</b>
<i>Mold Inhibitory Agar (MIA)</i>	149	9
<i>Mold Inhibitory Agar + RB</i>	<b>302</b>	16
<i>Plate Count Agar (PCA)</i>	168	18
<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	67	4
<i>Potato Dextrose Agar + RB</i>	<b>499</b>	<b>26</b>
<b>PMMY</b>	50	6
<b>PMMY + RB</b>	<b>322</b>	<b>24</b>
<b>Power Medium 2 (PW2)</b>	<b>200</b>	5
<b>Power Medium 2 + RB</b>	69	15
<b>Bengal Rose (RB)</b>	<b>266</b>	19
<b>Sabouraud Agar (SA)</b>	<b>246</b>	<b>20</b>
<i>Sabouraud Agar +SALES</i>	50	8
<b>Sabouraud Dextrose Agar (SDA)</b>	<b>230</b>	6
<b>Sabouraud Dextrose Agar + RB</b>	<b>322</b>	<b>21</b>
<i>Water Agar (WA)</i>	20	5



**Figura 3.1.5. Selección inicial de medios para el aislamiento de hongos.** Se utilizaron 17 medios distintos para el aislamiento de hongos, 10 de ellos se suplementaron con Rosa de Bengala (RB) para controlar el crecimiento de hongos altamente invasivos. Todos ellos se suplementaron con cloranfenicol (Cf), para evitar el crecimiento bacteriano.

El proceso de selección de medios para hongos se realizó, en primer lugar, con la muestra V8, de la cual se sembraron placas de las 26 combinaciones de medios distintos (con y sin rosa de Bengala) de hongos. Tal y como se muestra en la Tabla 3.1.1, el número de colonias que crecían en cada medio fue diferente. A primera vista, como se puede ver en la figura 3.1.5, en los medios donde no se había utilizado el rosa de Bengala algunos hongos de crecimiento rápido invadían la placa de cultivo, impidiendo ver el crecimiento del resto de hongos (CM, EM, SDA). Por ello, se decidió suplementar con rosa de Bengala todos los medios de muestreo en los siguientes aislamientos. Además, aunque el número de colonias que crecía en la placa era alto, muchas de ellas tenían una morfología parecida, pudiendo ser de la misma especie, por lo que se aisló una sola colonia por morfología. Debido a esto en la tabla 3.1.1 aparecen las cepas aisladas de cada uno de los medios, siendo en general mayores en los medios que estaban suplementados con rosa de Bengala (PDA + RB 26 cepas aisladas o PMMY + RB 24 cepas aisladas). Con ambos datos, el crecimiento general en las placas y las cepas que se han aislado de cada medio, se eliminaron aquellos medios donde el número de colonias aisladas era bajo, o que todas ellas tenían una morfología similar.

El siguiente aislamiento de hongos se realizó en la muestra V4 con 16 medios distintos. En este punto se eliminaron los medios CM, CZ-Dox, EM, MEA, MIA, PDA, PMMY, PW2 y SDA sin rosa de Bengala y el SA sin sales. Los conteos generales en esta muestra manifiestan la utilidad de los medios con rosa de Bengala, por lo que finalmente se eligen 5 de estos medios (MIA, EM, SDA, PMMY y PDA) para continuar con las siguientes muestras, tabla 3.1.2.

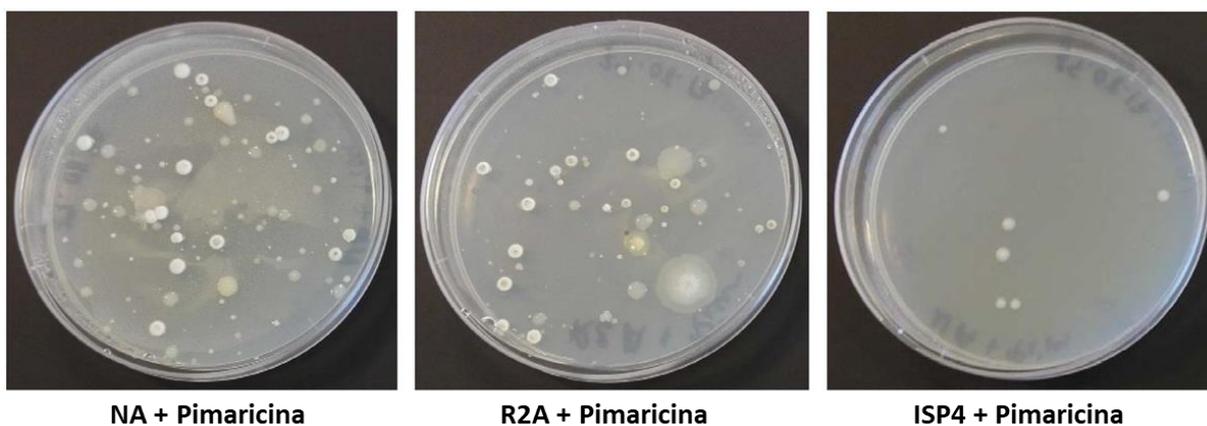
**Tabla 3.1.2. Resumen decrecimiento y aislamiento de hongos en la muestra V12.**

	Cepas totales			Cepas aisladas
	<u>Corteza</u>	<u>Intercorteza</u>	<u>Serrín</u>	
<b>SDA + RB</b>	11	4	2	9
<b>EM + RB</b>	2	2	11	9
<b>MIA + RB</b>	5	7	18	8
<b>PMMY + RB</b>	3	3	21	7
<b>PDA + RB</b>	9	7	21	14

Durante el siguiente aislamiento, la muestra V12, se vio que la utilización de 5 medios seguía siendo muy laboriosa, por lo que con los resultados obtenidos de esta muestra se redujo el número de medios de hongos a 3. Como se puede ver en la tabla 3.1.2 los medios donde más colonias crecieron fueron PDA, MIA y PMMY. Como en este último el número de cepas aisladas es el más bajo (7), indicando que la mayoría de las colonias que crecieron tenían morfologías parecidas, se descartó continuar utilizándolo, eligiendo los medios EM, MIA y PDA para continuar con las siguientes muestras. Estos medios están basados en formulaciones generales con base de patata y malta que permiten el aislamiento de una gran cantidad de géneros fúngicos distintos, como son diferentes especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium* o *Alternaria* (Al-Enazi *et al.*, 2018; Jaber *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2019; Scognamiglio *et al.*, 2010).

Por otro lado, la selección de medios para el aislamiento de bacterias empezó con tres medios diferentes seleccionados por distintas razones. El agar nutritivo (NA) es un medio general de cultivo bacteriano que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos y se usa tanto para el aislamiento como para el mantenimiento de bacterias no patógenas (Eaton *et al.*, 1988). El medio Reasoner's 2A (R2A) permite el crecimiento de bacterias de desarrollo más lento y aunque en su día se ideó para aislar bacterias de fuentes de agua corriente, hoy en día se utiliza en todo tipo de ambientes (Reasoner & Geldreich, 1985; Tak *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Por último, se usó el medio ISP4 (*International Streptomyces Project 4*) creado en sus inicios para la caracterización morfológica de distintas especies de *Streptomyces*, pero que con el tiempo se ha convertido en un medio de cultivo común para el aislamiento de actinomicetos (Qureshi *et al.*, 2021; Shirling & Gottlieb, 1966b).

Para la selección de medios bacterianos, se realizó una prueba donde se sembraron los distintos medios con la misma muestra (V8). De esta manera se demostró que existía una mayor variedad y número de colonias en los medios NA y R2A, tal y como se puede ver en la figura 3.1.6, por lo que fueron seleccionados para continuar con el resto de muestras.



**Figura 3.1.6. Selección de medios inicial para el aislamiento de bacterias.** Todos los medios fueron suplementados con el antifúngico pimaricina para evitar el crecimiento de hongos y levaduras.

En resumen, como medios de aislamiento de hongos se eligieron PDA, EM y MIA suplementados con rosa de Bengala y cloranfenicol, y para bacterias se utilizaron NA y R2A suplementados con pimaricina.

### 3.1.3. Identificación de especies aisladas

Inicialmente, el aislamiento de las diferentes especies se realizó por comparación morfológica (color, brillo, textura, esporulación, *etc*) entre las colonias y su posterior cultivo mediante siembra en parche en placas de medio NA o TSA (*Tryptic Soy Agar*) en el caso de las bacterias, y en PDA en el caso de los hongos. Este aislamiento, a partir de una sola colonia, es necesario para su posterior identificación, análisis de propiedades de la cepa aislada y comparación con cepas parecidas, además de permitir su conservación.

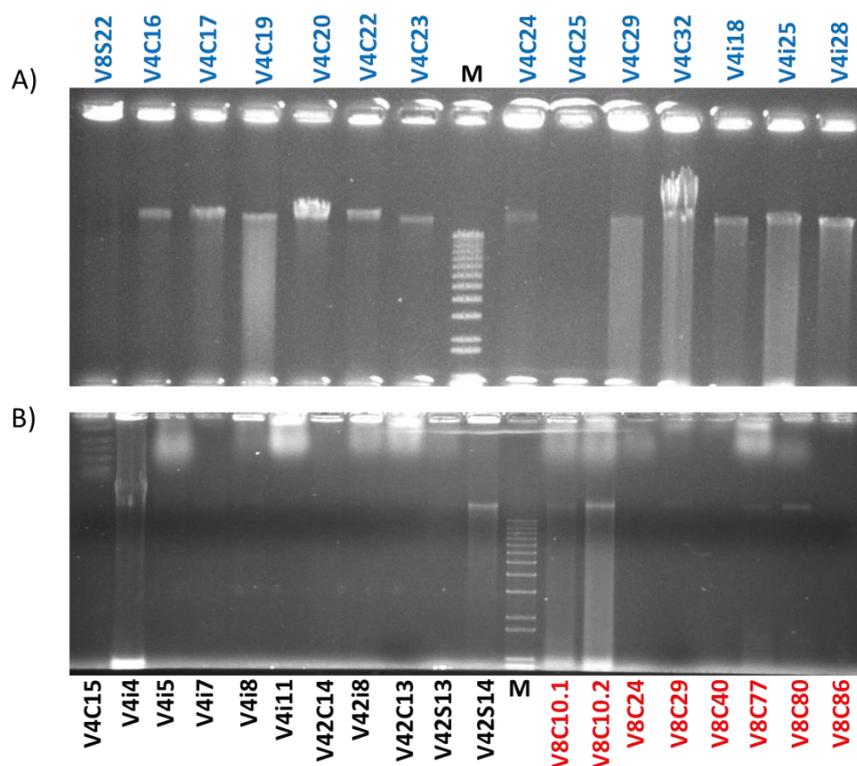
Para poder tener una trazabilidad de todas las cepas aisladas se recogió toda la información posible de ellas, desde la especie de árbol de donde provenía cada cepa, hasta el momento cuando se secuenció o se guardó en glicerol. En la tabla 3.1.3 se puede ver la información recogida de cada cepa.

**Tabla 3.1.3. Información recogida de cada cepa aislada.** La última columna muestra un caso concreto.

	<b>Información</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Muestra</b>	Código de muestra	V8
	Especie de árbol	Nogal ( <i>Juglans regia</i> )
	Estado (degradado o sano)	Degradado
	Zona de muestro [corteza, intercorteza (cambium) y serrín]	Corteza
<b>Condiciones de muestreo</b>	Fecha de Siembra	05/07/2017
	Medio de cultivo (nombre de medio, dilución y antibiótico)	SA +sales, Dil 1/10 y cloranfenicol
<b>Colonias totales</b>	Numero de colonias	≈30
	Observación general de la placa	
<b>Aislamiento</b>	Fecha de resiembra	12/07/17
	Medio de resiembra	PDA
	Código de la cepa	V8C91
	Fecha de paso a 4°C	17/07/2017
	Observación/aspecto de la colonia	Hongo. Mediano. Verde césped. Aterciopelado
	Colonias totales en la placa	1
	Recuento colonias de cepa en todos los medios	1
<b>Secuenciación</b>	Fecha extracción ADN	09/10/2017
	[DNA] (ng/μL)	132,9 ng/μL
	Fecha secuenciación	11/10/2017
	Especie	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
<b>Mantenimiento</b>	Fecha glicerol	01/12/2017

En el aislamiento de microorganismos de madera se realizó un conteo del número de colonias que crecían en cada placa y después se agruparon las colonias presentes según su morfología, que se anotaba en la tabla de información de las cepas (*observación/aspecto de la colonia* en la tabla 3.1.3). De esta manera se contaron aquellas colonias con morfología parecida como una sola cepa aislándose una de ellas en un medio apropiado y asignándole un código con la información de la muestra, dónde se ha aislado y la zona de la misma (figura 3.1.1). Una vez el microorganismo había crecido, y se determinaba que únicamente existía una

sola morfología, se extraía el ADN genómico por medio del kit “*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*” (Promega), se comprobaba su integridad a través de electroforesis (figura 3.1.7), se cuantificaba la concentración de ADN genómico con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y por último, se secuenciaba en el servicio de genómica de la Universidad de León.



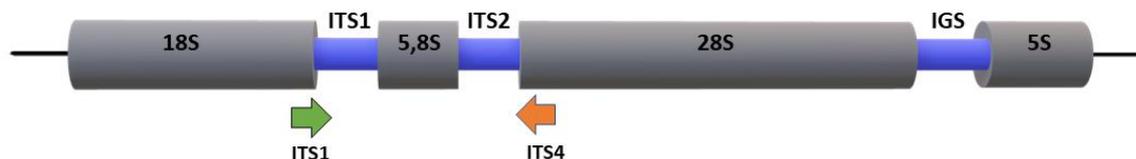
**Figura 3.1.7.** Electroforesis en agarosa 0,6% de DNA genómico de microorganismos aislados de madera. A) Muestras de hongos (azul). B) Muestras de bacterias (negro), levaduras (rojo). M (marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder).

La identificación de las distintas colonias se realizó a través de la secuenciación del ADN ribosómico, en concreto de las regiones 16S para bacterias y ITS para hongos. La secuenciación de estas regiones del ADN ribosómico permite la identificación de especies basándose en secuencias de gran variabilidad dentro de genes altamente conservados. En el caso de los hongos, se corresponden con las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer Regions*) flanqueadas por secuencias muy conservadas, como son los genes que codifican para las subunidades 18S, 5,8S y 28S del ribosoma, tal como se muestra en la figura 3.1.8. La amplificación de estas regiones ITS hipervariables se realiza a través cebadores universales que reconozcan las secuencias conservadas, en este caso los cebadores ITS1 e ITS4 (ver en el la tabla 2.2B dentro del apartado 2.5.1) (Aslam *et al.*, 2017; Schoch *et al.*, 2012).

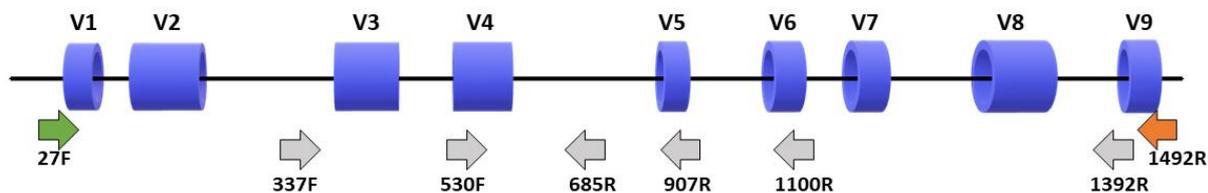
Para la identificación de las bacterias se utilizó la secuencia 16S del ADN ribosómico. Esta secuencia de alrededor de 1550 pares de bases está compuesta por regiones conservadas y regiones hipervariables. Esta combinación hace de esta región la más usada para la identificación de bacterias. Se han desarrollado una gran colección de cebadores para la

amplificación de las regiones hipervariables, en este estudio se optó por la amplificación de toda la secuencia 16S, a través de los cebadores 27F y 1492R ((ver en el la tabla 2.2A dentro del apartado 2.5.1) , tal y como se indica en la figura 3.1.8 (Clarridge 3rd, 2004; Woese, 1987; Woo *et al.*, 2008).

#### Hongos



#### Bacterias



**Figura 3.1.8. Esquema de las diferentes agrupaciones génicas que se utilizan para identificar hongos (en la parte superior) y bacterias (en la parte inferior).** Las regiones hipervariables ITS de los hongos, representada en azul, se amplificaron a través de cebadores, en verde directo (*forward*) ITS1 y en naranja reverso (*reverse*) ITS4. En bacterias se amplifica la región codificante del fragmento 16S del ribosoma. Los cebadores utilizados en este estudio se muestran coloreados [verde directo (27F) y naranja reverso (1492R)]. Otros cebadores utilizados para la amplificación de esta secuencia se muestran en gris. F (cebador directo) y R (cebador reverso) (Modificado de Fukuda *et al.* 2016 y Romanelli *et al.* 2014).

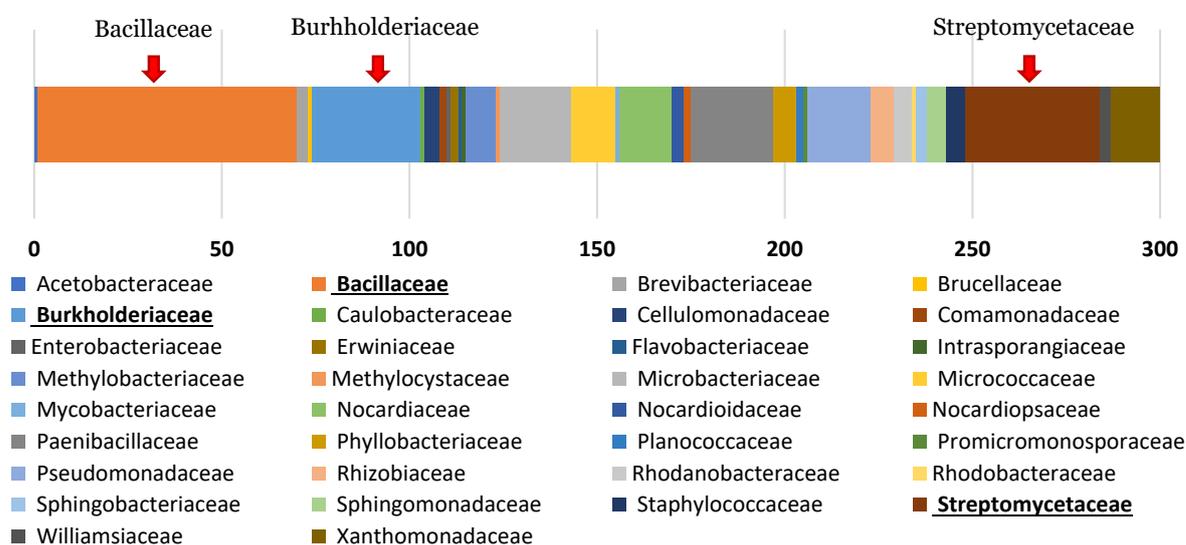
### 3.1.3.1. MICROORGANISMOS ENCONTRADOS

En total se aislaron 720 cepas de microorganismos entre bacterias y hongos. Concretamente se aislaron 300 cepas de bacterias, que se agrupan en cuatro filos (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria), siete clases (Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria, Flavobacteria, Gammaproteobacteria y Sphingobacteria), 17 órdenes, 34 familias y 50 géneros distintos (un género diferente cada 6 bacterias aisladas como media). Las familias más representadas han sido Bacillaceae (69 cepas), Streptomycetaceae (36), Burkholderiaceae (29), Paenibacillaceae (22), Microbacteriaceae (19) y Pseudomonadaceae (17) (figura 3.1.9).

Como se puede observar en la figura 3.1.9, existe una clara dominancia de Bacillaceae con respecto al resto de familias encontradas, dentro de esta familia se han aislado 17 especies de un solo género, *Bacillus*, junto con un gran número de cepas donde no se ha podido asignar especie. Este género es conocido por su capacidad de crecer en casi cualquier ambiente, tal es ese punto que se han encontrado esporas capaces de sobrevivir en la estación espacial internacional (Vaishampayan *et al.*, 2012). Dentro de este género se agrupan especies de todo tipo, algunas patógenas y hasta con potencial uso como arma biológica, *B. anthracis* o *B. cereus* (Ehling-Schulz *et al.*, 2019), y otras con una gran relevancia agroindustrial, por ejemplo,

*B. thuringiensis* que se lleva usando a lo largo de los años para el tratamiento de cultivos contra plagas, o diferentes especies como *B. subtilis*, *B. safensis*, *B. pumilus* o *B. megaterium* las cuales son capaces de secretar sustancias con actividad antimicrobiana (Sansinenea & Ortiz, 2011).

Los siguientes ordenes más representados también son relevantes desde el punto de vista industrial. Así, el orden Streptomycetaceae engloba las principales bacterias que se han usado en la síntesis de antibióticos, siendo estas bacterias, principalmente del género *Streptomyces*, la fuente de alrededor de dos tercios de todos los antibióticos naturales conocidos (Procópio *et al.*, 2012; Risdian *et al.*, 2019). Del orden Burkholderiaceae se ha aislado un único género, *Burkholderia*, que está siendo investigado estos últimos años por su utilidad en numerosos campos, como en agricultura, promoviendo el crecimiento de cultivos, como agente de biocontrol y en la degradación de contaminantes (Kunakom & Eustáquio, 2019).



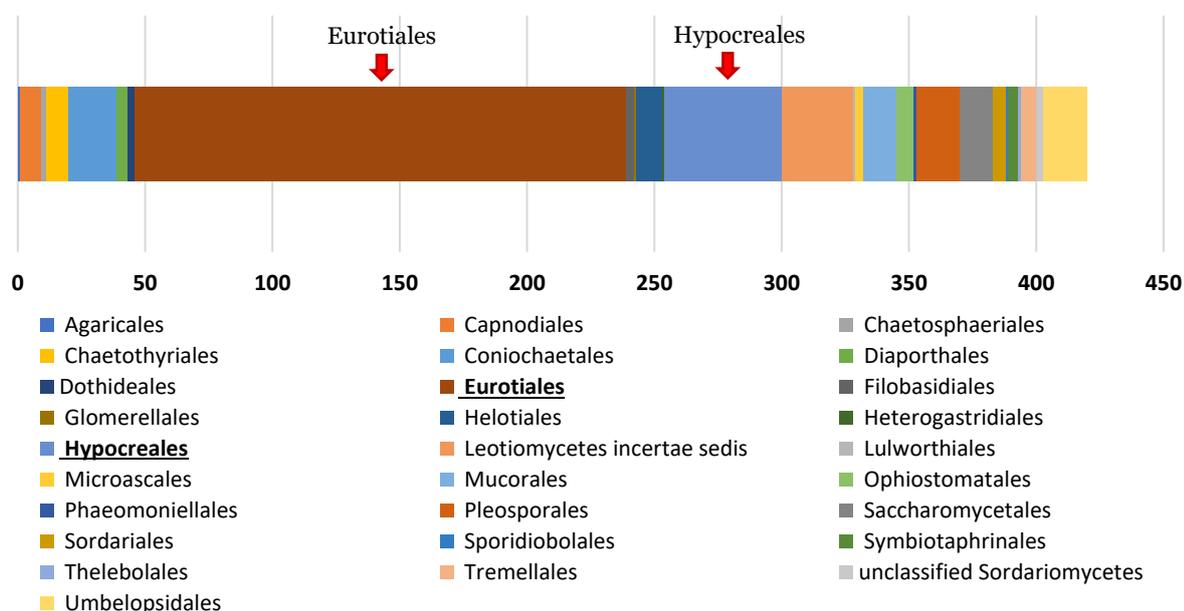
**Figura 3.1.9. Familias de bacterias aisladas de madera en degradación.** Dominancia de algunas familias bacterianas como Bacillaceae o Streptomycetaceae, marcadas con una flecha roja en el gráfico y resaltadas (subrayado y negrita) en la leyenda.

En cuanto a los hongos, se aislaron 420 cepas de hongos, que se agruparon en tres filos (Ascomycota, Mucoromycota y Basidiomycota), 11 clases, 28 órdenes, 51 familias y 73 géneros distintos (un género diferente cada 5,7 hongos aislados como media). En las figuras referentes a los aislamientos fúngicos se han representados los órdenes fúngicos en vez de las familias debido al gran número de familias diferentes encontradas (figuras 3.1.10, 3.1.12 y 3.1.14).

Dentro de las diferentes ordenes encontrados lo más representativo es la gran dominancia del orden Eurotiales en los hongos aislados, figura 3.1.10. Este orden comprende una gran variedad de hongos que se dividen cinco familias Penicillaginaceae, Aspergillaceae, Elaphomycetaceae, Thermoascaceae y Trichocomaceae. Dentro de estas familias se agrupan algunos de los géneros fúngicos más conocidos, como son *Penicillium*, *Aspergillus* o *Talaromyces*. Se aislaron predominantemente cepas del género *Penicillium* (182 cepas) siendo

casi la mitad de los hongos aislados (43,3%), tres cepas de *Aspergillus* y dos cepas de *Talaromyces*. Todos estos hongos, se caracterizan por su gran capacidad biosintética, habiendo sido utilizados durante décadas en la producción de antibióticos o enzimas (Demain & Martens, 2017).

Dentro del género dominante, *Penicillium*, se aislaron 182 cepas que corresponden a 32 especies distintas y un gran número de cepas donde no se ha conseguido llegar al nivel de especie. La gran capacidad biosintética de este género lo convierte en un antiguo aliado en la producción de moléculas de alto valor añadido como fármacos o enzimas, además, su uso también es importante en otros ámbitos como en la industria alimentaria, por ejemplo, en la maduración de quesos (García-Estrada *et al.*, 2020; Ropars *et al.*, 2020). Entre las especies encontradas se pueden destacar *Penicillium citrinigrum* (13,2% de las cepas de *Penicillium* aisladas), *Penicillium spinulosum* (7,1%) y *Penicillium sanguifuum* (6,0%).



**Figura 3.1.10. Órdenes de hongos aislados de madera en degradación.** Dominancia del orden Eurotiales y del orden Hypocreales marcados con una flecha roja en el gráfico y resaltados (negrita y subrayado) en la leyenda.

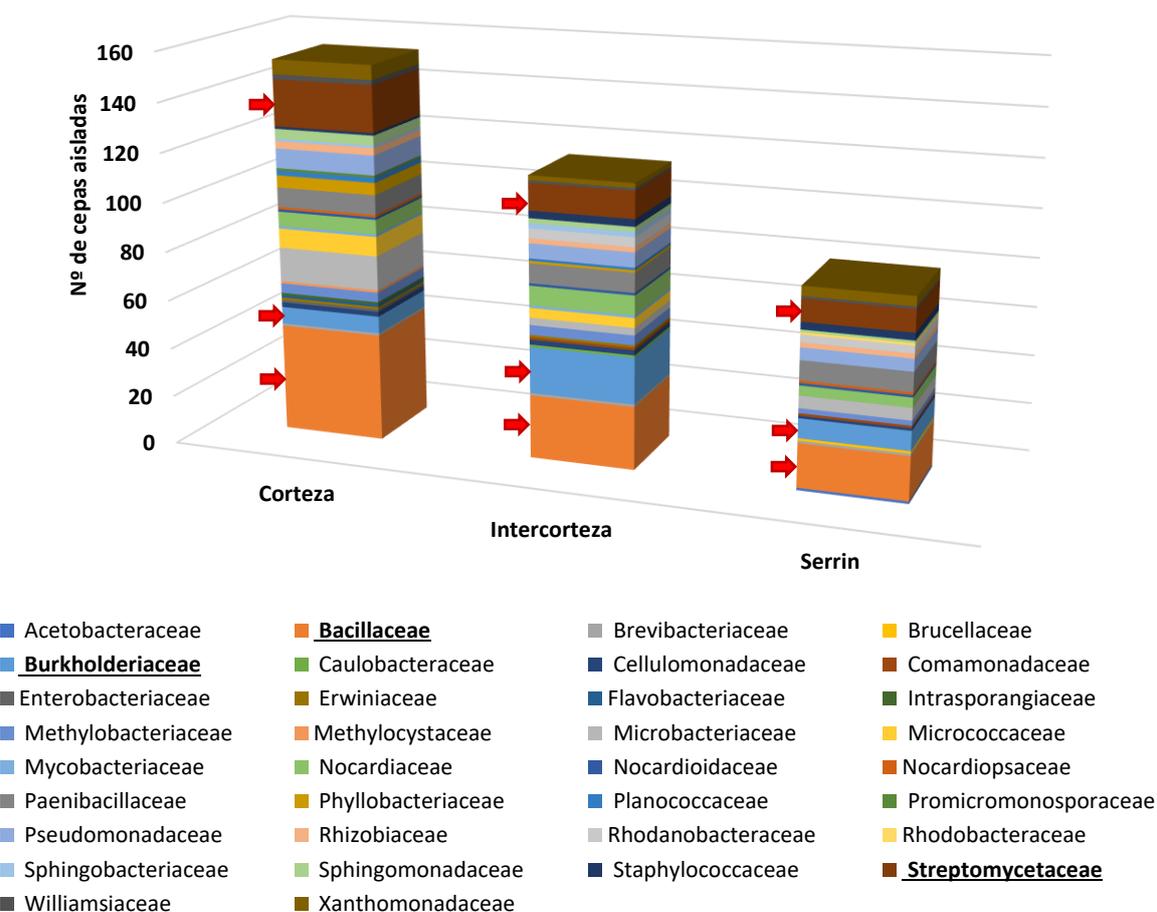
El segundo orden con más cepas aisladas ha sido Hypocreales (10,9% de las cepas fúngicas aisladas), dentro de esta familia el género dominante ha sido *Trichoderma* (7,1% de las especies fúngicas encontradas). Se han aislado 30 cepas distintas, entre ellas, especies que han sido usadas en el biocontrol de enfermedades fúngicas en cultivos, como *T. harzianum*, y otras utilizadas en la producción de enzimas para la producción de biocombustibles, como *Trichoderma citrinoviridae* (Kancelista *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016). Ambos géneros, *Trichoderma* y *Penicillium*, engloban más del 51% de todas las cepas aisladas.

De los 71 géneros fúngicos restantes los más abundantes fueron *Coniachaeta* (4,3%), *Umbelopsis* (4,1%), *Oidiodendron* (3,8%), *Mucor* (2,4%) y *Geomyces* (2,1%).

### 3.1.3.2. COMPARACIÓN POR ZONA DE LA MUESTRA

Como se ha explicado en el apartado 3.1.2, se realizó una extracción de microorganismos de tres zonas distintas de cada muestra (la corteza, el cambium y el duramen).

La corteza es la zona más exterior de la madera, se divide en dos zonas denominadas corteza externa (corteza) y corteza interna (cambium). La corteza externa tiene una función principalmente de protección de las zonas internas, formando una barrera continua sobre toda la superficie, aunque también se ha visto que puede ejercer otro tipo de funciones en algunos géneros vegetales (Morris & Jansen, 2017).



**Figura 3.1.11. Comparación de familias bacterianas encontradas en las distintas zonas de muestreo.** Prevalencia de Bacillaceae (marrón claro) y Streptomyetaceae (marrón oscuro) en todas las zonas, menos en intercorteza donde la segunda familia mayormente aislada fue Burkholderiaceae. Las familias mayormente detectadas fueron marcadas con una flecha roja en el gráfico y resaltadas en la leyenda (negrita y subrayado).

La distribución de las bacterias en las tres zonas de las muestras no varía significativamente de la distribución total de bacterias encontradas, con una prevalencia de Bacillaceae y Streptomyetaceae con respecto al resto de familias, aun así, se pueden sacar algunas diferencias fijándose en la figura 3.1.11.

Por un lado, el número de cepas aisladas de la corteza es superior al de las otras dos partes, casi duplicando al número de cepas que se han aislado del serrín. Esto puede deberse al

contacto directo de la corteza de la madera con el suelo donde se recogió la muestra. Este contacto entre ambas superficies posibilitaría la colonización de la corteza de la madera por microorganismos provenientes de los estratos superiores de la tierra del bosque, siendo esta la mayor fuente de microorganismos que existe en el bosque (Baldrian, 2017). Una parte de los microorganismos provenientes del suelo contienen las enzimas necesarias para utilizar la celulosa como fuente de energía, especies de las familias antes mencionadas por su alta presencia en las muestras recogidas, como el género *Bacillus* o *Streptomyces* se encuentran entre estas especies, por ello, su aislamiento desde la corteza puede explicarse debido a su alta presencia en el suelo (López-Mondéjar *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014).

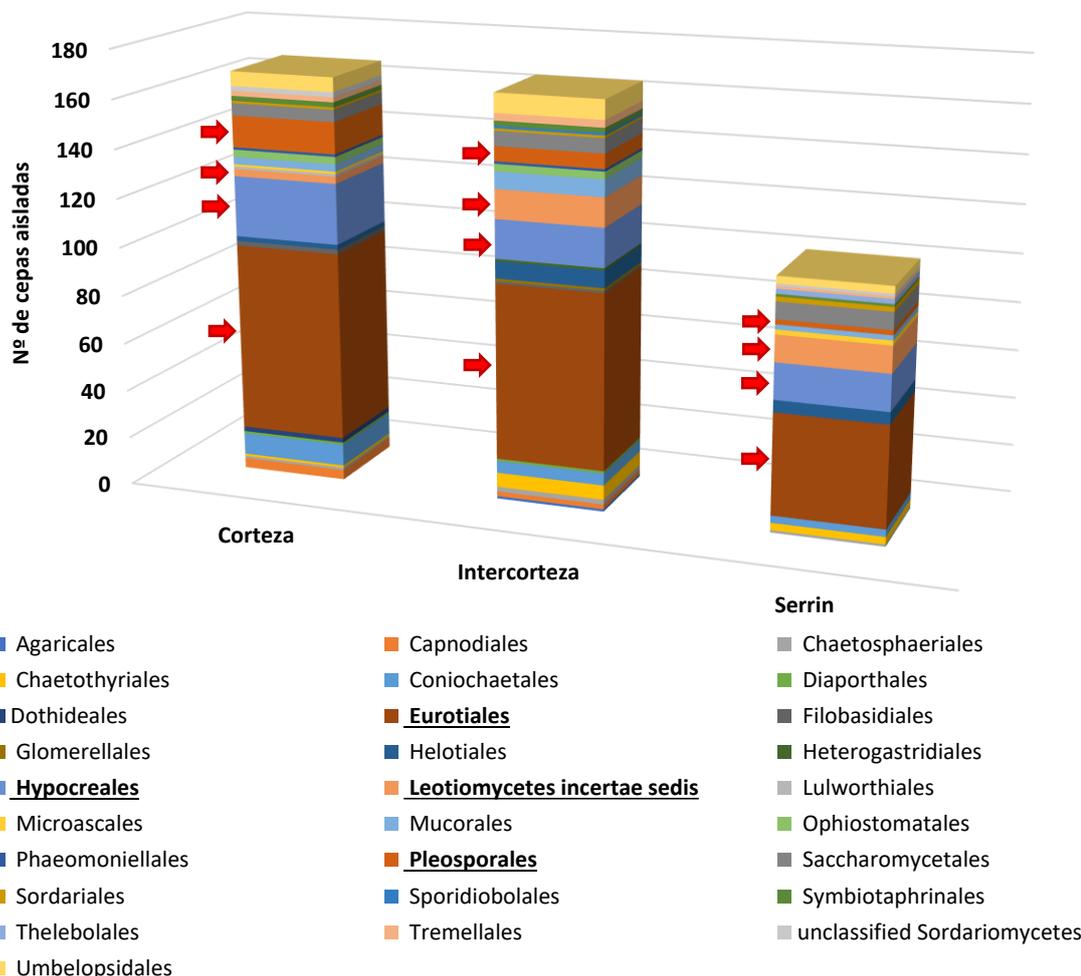
Dentro de las diferencias en la distribución de las familias entre las tres partes de muestreo, lo más reseñable es la familia Burkholderiaceae, que se ha sido preferentemente aislada en la intercorteza y en el duramen. Muchas especies que pertenecen a esta familia, representada en la figura 3.1.11 en azul claro, son conocidas por estar asociadas a hongos degradadores de la madera actuando como bacterias fijadoras de nitrógeno o degradando compuestos aromáticos (Sun *et al.*, 2014), la asociación existente entre estas bacterias y los hongos degradadores de la madera puede explicar su mayor presencia en zonas de la corteza interna y el serrín, donde también se encontrarían los mencionados hongos.

Por otro lado, el aislamiento de cepas fúngicas muestra una diversidad de ordenes bastante parecida a lo que encontramos en los datos totales, tal y como se puede ver en la figura 3.1.12. Existe una clara prevalencia de Eurotiales siendo estos el orden mayormente aislado independientemente de la zona de muestreo (46,8% en corteza, 44% en intercorteza y 40,8% en serrín). Siguiendo con la misma dinámica, el segundo orden más aislado ha sido Hypocreales, especialmente abundante en la corteza (14,9%). El número de cepas aisladas en cada zona sigue el mismo patrón que en el caso de las bacterias, siendo la corteza donde más cepas se han aislado, sin embargo, en este caso el número de cepas aisladas en cada zona es más homogéneo.

En cuanto a las diferencias, por un lado, se puede ver un aislamiento preferencial de especies pertenecientes al orden Pleosporales (en la figura 3.1.12 en marrón oscuro) en la corteza (*Didymella*, *Neocucurbitaria*, *Nigrograna*, *Phoma*, *Preussia* y *Ulocladium*). Este orden engloba más de 4.700 especies distintas de hongos, las cuales pueden encontrarse en una gran diversidad de ambientes. Las especies encontradas han sido halladas con anterioridad en material vegetal, tanto como endófitos, patógenos de plantas o aislados de madera en descomposición (Bi *et al.*, 2016; Raudonienė *et al.*, 2019; Shaw *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009).

Por otro lado, existe una mayor prevalencia en intercorteza y serrín de Leotiomycetes *incertae sedis* (géneros *Phialocephala*, *Scytalidium*, *Leptodontidium*, *Neobulgaria*, *Collophora*, *Oidiodendron*, *Cadophora*, *Geomyces* y *Thelebolus*, entre otros) representados en la figura 3.1.12, en marrón claro. Dentro de estas especies encontramos hongos relacionados con la madera de numerosas formas, reconocidos causantes de la degradación blanda como *Phialocephala dimorphospora* o *Cadophora* sp., hongos causantes de enfermedades en

especies arboleas como *Collophora* y endófitos como *Geomyces* y *Oidiodendron* (Damm *et al.*, 2010; Hayes, 2012; Karunasekera & Daniel, 2015; Rice & Currah, 2005; Rusman *et al.*, 2018).



**Figura 3.1.12. Comparación de órdenes fúngicos aislados de las distintas zonas de muestreo.** Dominancia del orden Eurotiales en las tres zonas. Aumento del número de Pleosporales en la corteza (marrón oscuro), y de Leotiomyces (marrón claro) en intercorteza y serrín. Los órdenes mayormente detectados fueron marcados con una flecha roja en el gráfico y resaltados en la leyenda (negrita y subrayado).

### 3.1.3.3. COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES LOCALIZACIONES GEOGRÁFICAS

Las muestras de esta tesis se recogieron mayormente en dos localizaciones muy distintas, tanto geográfica, como ambientalmente (temperatura y altitud). Las españolas se recogieron en Villavieja (León, España: 42,485015, -6,684764, 765 m s. n. m.), dentro de la Hoya del Bierzo, donde se da unas características climáticas características, al compartir rasgos de clima mediterráneo y clima templado. En cambio, las muestras recogidas en Bymarka (Trondheim, Noruega: 63.40667, 10.31278, 290 m s. n. m.), pertenecen, en su gran mayoría, a coníferas representativas del bosque boreal. Por ello se corresponden con especies arbóreas distintas, las

españolas son arboles de hoja caduca, como el castaño o el cerezo, y las noruegas son coníferas como pino o picea.

Si bien, el número de muestras fue parecido, 14 muestras de España y 12 muestras de Noruega, la cantidad de cepas aisladas en cada localización fue muy diferente. La mayoría de las cepas se aislaron desde las muestras españolas. Del total de 720 cepas aisladas, 540 (75%) cepas se aislaron de las muestras españolas, 151 (20,97%) de las muestras noruegas y 29 (4,02%) de una sola muestra procedente de Krupina (Eslovaquia, 48.43654, 19.03449, 600 m s. n. m.), la cual, por su pequeña contribución, se eliminó de los análisis por localización geográfica.

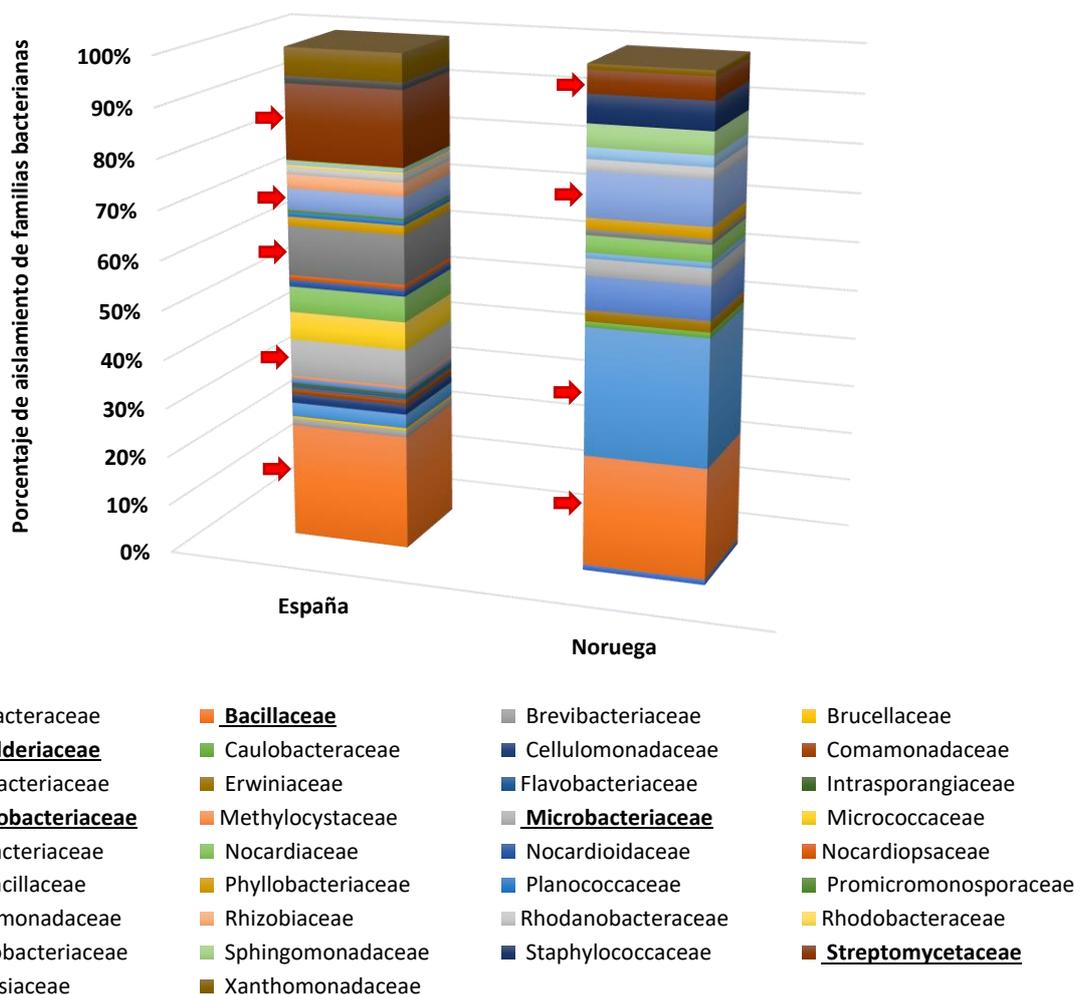
Es interesante señalar que, aunque el número total de cepas aisladas en ambas localizaciones fuera muy dispar, la relación entre la cantidad de cepas aisladas de hongos y bacteria fue bastante parecida. En las muestras recogidas en España el 39,07% de las cepas aisladas fueron bacterias y el 60,93% hongos. Mientras que, en las muestras recogidas en Noruega el 41,05% de las cepas fueron bacterias y el 58,95% hongos. Esto parece demostrar que la relación entre bacterias y hongos fue, en términos generales, bastante constante dentro de la madera en degradación.

Para que la diferencia entre el número de cepas aisladas en ambos sitios no eclipse la comparación entre las especies encontradas, en las siguientes gráficas (figuras 3.13 y 3.14) se muestra el porcentaje que cada familia (bacterias) u orden (hongos) ocupa con respecto al total de especies aisladas.

En bacterias, se encontraron diferencias en cuanto a la familia más aislada en cada localización, siendo Bacillaceae la mayormente encontrada en las muestras españolas (23,22%), como se puede ver en la figura 3.1.13. Sin embargo, la familia más aislada en las muestras de Noruega fue Burkholderiaceae (25,84%), siendo Bacillaceae la segunda más aislada (22,47%). Las familias pertenecientes a las Actinobacterias fueron preferentemente aisladas de las muestras españolas (41,71% España y 12,36% Noruega), algunos ejemplos fueron [Streptomycetaceae (15,17% España y 4,49% Noruega), Microbacteriaceae (7,58% España y 3,37% Noruega), Nocardiaceae (5,21% España y 3,37% Noruega)], y otras que únicamente fueron aisladas en España [Brevibacteriaceae (1,42%), Cellulomonadaceae (1,90%), Micrococcaceae (5,69%), Nocardiopsaceae (0,95%) y Williamsiaceae (1,42%)]. Como se ha comentado anteriormente, estas especies son particularmente importantes por su capacidad de producir metabolitos secundarios de alta necesidad, como antibióticos, antivirales o anticancerígenos (Xi *et al.*, 2012).

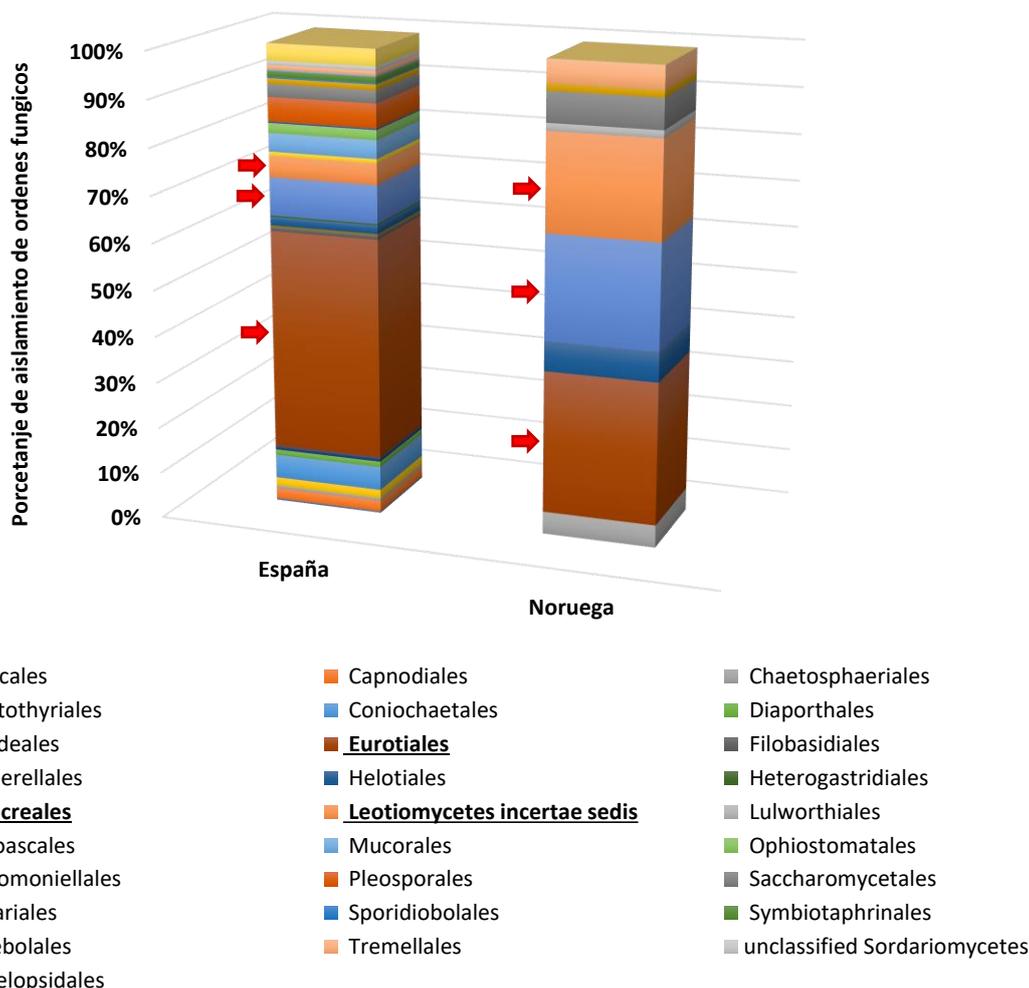
Por otro lado, se detectaron en las muestras de Noruega una mayor cantidad de familias pertenecientes a las Proteobacterias, más concretamente a las Alpha- y Beta-proteobacterias [Methylobacteriaceae (0,95% España y 6,74% Noruega), Sphingomonadaceae (0,47% España y 4,49% Noruega) y Phyllobacteriaceae (1,90% España y 2,25% Noruega)], Todo ello contribuyó a que existiera una notable diferencia en la presencia de estas clases en ambas localizaciones [Alpha-Proteobacteria (7,58% España y 15,73% Noruega) y Beta-Proteobacteria (3,79%

España y 25,84% Noruega)]. Se vio que bacterias pertenecientes a estas clases están relacionadas con climas fríos (Kobabe *et al.*, 2004).



**Figura 3.1.13. Comparación entre las familias bacterianas aisladas en las distintas localizaciones geográficas.** Diferencias a nivel de Alpha- y Beta-proteobacterias, más presentes en las muestras de Noruega, y de Actinobacterias, más presentes en las muestras españolas. Las familias mayormente detectadas fueron marcadas con una flecha roja en el gráfico y resaltadas en la leyenda (negrita y subrayadas).

Además, se encontraron similitudes en los aislamientos de ambos sitios. Por un lado, la clase Bacilli, fue representada en ambos sitios de forma semejante (34,12% España y 29,21% Noruega), dentro de las especies encontradas la familia Bacillaceae se encuentra casi igualmente representada en ambas localizaciones, como se puede ver en la figura 3.1.13 en naranja (23,22% España y 22,47% Noruega). Por último, la clase Gamma-proteobacterias estuvo también casi igualmente representada (11,85% España y 14,61% Noruega). Dentro de esta clase se pudo ver que las familias encontradas no han estado igualmente representadas, estando algunas sobrerrepresentadas en las muestras de España [Xanthomonadaceae (5,69% España y 1,12% Noruega)] y otras en las muestras noruegas [Pseudomonadaceae (4,27% España y 8,99% Noruega)].



**Figura 3.1.14. Comparación entre las ordenes fúngicos aislados en las distintas localizaciones geográficas.** Dominancia del orden Eurotiales en las muestras españolas, no siendolo en las noruegas, donde el orden Hypocreales está muy representado. Los órdenes mayormente detectados fueron marcados con una flecha roja en el gráfico y resaltados en la leyenda (negrita y subrayados).

Por otro lado, en el caso de los hongos, la mayor diferencia que se puede apreciar en la figura 3.1.14 es el desequilibrio en el número de ordenes fúngicos hallados en cada localización. Mientras que en España se aislaron 28 ordenes fúngicos distintos, en Noruega únicamente 9. Esto puede estar relacionado con la cantidad de hongos hallados en cada lugar, habiéndose aislado el 84,14% de los hongos de las muestras españolas.

Dentro de los órdenes encontrados destacó el orden Eurotiales, sobre todo en las muestras españolas, siendo el 47,72% de las cepas encontradas. También fue el más abundante en las muestras de Noruega, pero sin ser tan dominante (30,65%).

Además, se vio un mayor aislamiento de ordenes fúngicos como Hypocreales (8,21% España y 22,58% Noruega) y Leotiomyces (4,56% España y 20,97% Noruega) en las muestras de Noruega. Dentro de los Hypocreales, aunque se aislaron una mayor cantidad de cepas en las muestras españolas (27 cepas en España y 14 cepas en Noruega), el número de géneros hallados

es el mismo (9 géneros distintos en cada localización), mostrando la gran variedad de géneros fúngicos de este orden presentes en las muestras de Noruega. Por último, algunos géneros dentro de Leotiomycetes (*Oidiodendron* y *Geomyces*) que han sido preferentemente encontrados en las muestras de Noruega, se ha visto que están asociados a climas fríos (Hayes, 2012; Rice & Currah, 2005).

### 3.1.4. Análisis metagenómicos

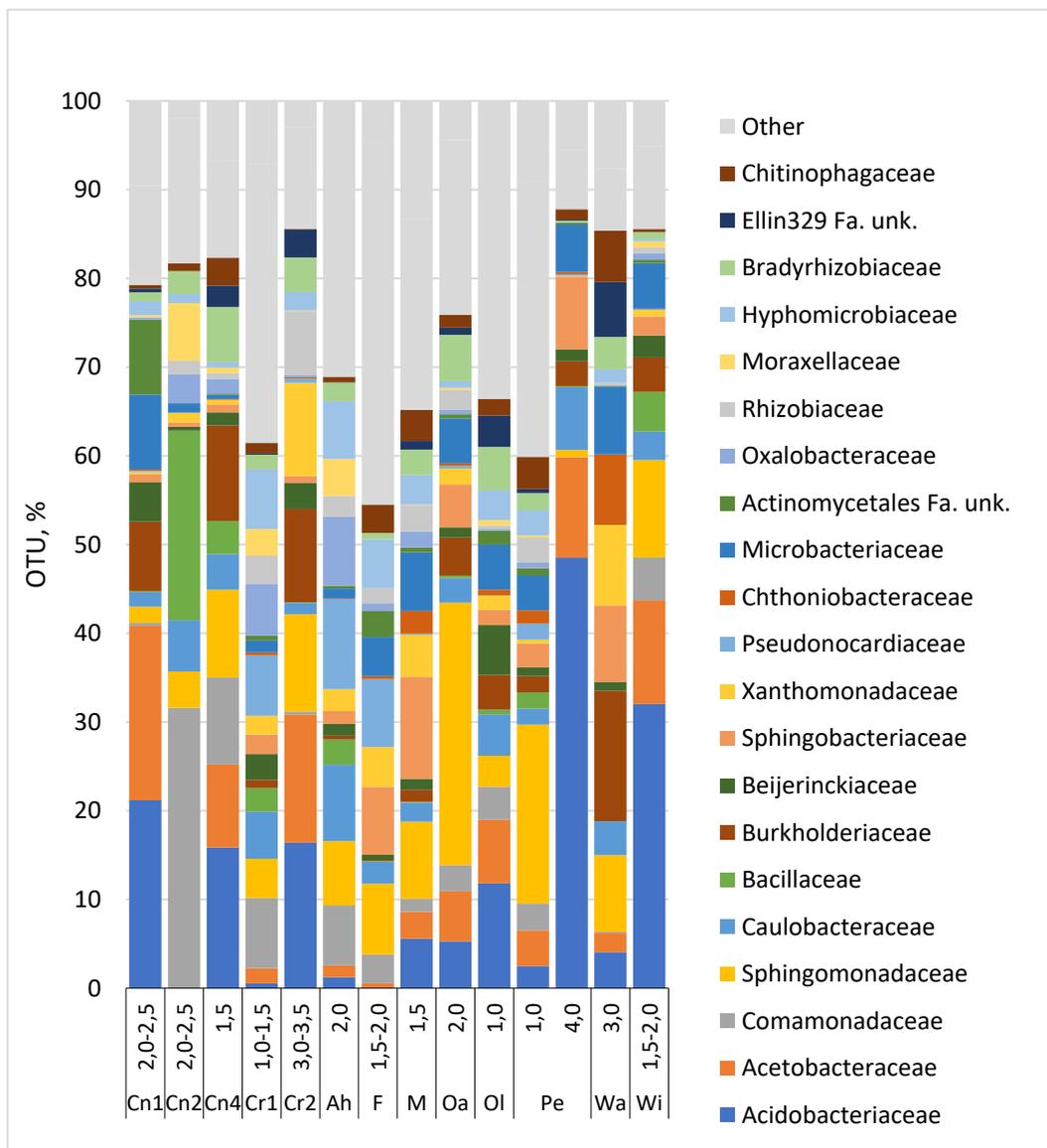
Las técnicas de aislamiento permiten encontrar y distinguir una parte de los microorganismos presentes en una muestra, mientras que los análisis metagenómicos dan una visión general de las comunidades microbianas presentes. Ambas técnicas aportan imágenes distintas pero complementarias de lo que sucede dentro de la madera en degradación. Por ello, se realizó un análisis metagenómico de las muestras recogidas.

Tabla 3.1.4. Sistema de clasificación NFI de madera muerta. (Sandström *et al.*, 2007).

Nivel de degradación	Sistema NFI
0	Madera verde. Los arboles han muerto recientemente y la madera no se ha secado
1	Madera muerta sólida. Mas del 90% de la madera presente es madera dura, la superficie de la muestra tiene una apariencia sólida
2	Madera algo deteriorada. El volumen de la madera blanda presente es del 10-25%. El resto es madera sólida
3	Madera degradada, El volumen de la madera blanda o muy blanda es del 25%-75% de la muestra
4	Madera muy degradada. El volumen de madera blanda y muy blanda es del 75%-100%

Además, se realizaron recogidas de muestras adicionales para su análisis por metagenómica. En total se recogieron 32 muestras nuevas; 20 muestras se recogieron del mismo sitio de donde se recogieron las muestras noruegas iniciales (Bymarka, Trondheim, Noruega), 8 de ellas en Agosto de 2017 y 12 en Enero del 2018 y, 12 muestras en otro bosque cercano en Octubre de 2017 (bosque de Estenstadmarka, Trondheim, Noruega). Las muestras procedentes de las últimas tres recolecciones fueron únicamente procesadas a nivel metagenómico. El proceso de comparación entre localizaciones en Noruega, diferentes estaciones y diferentes épocas del año sigue en proceso, por lo que en lo referente a esta tesis únicamente se comentara los datos metagenómicos generales.

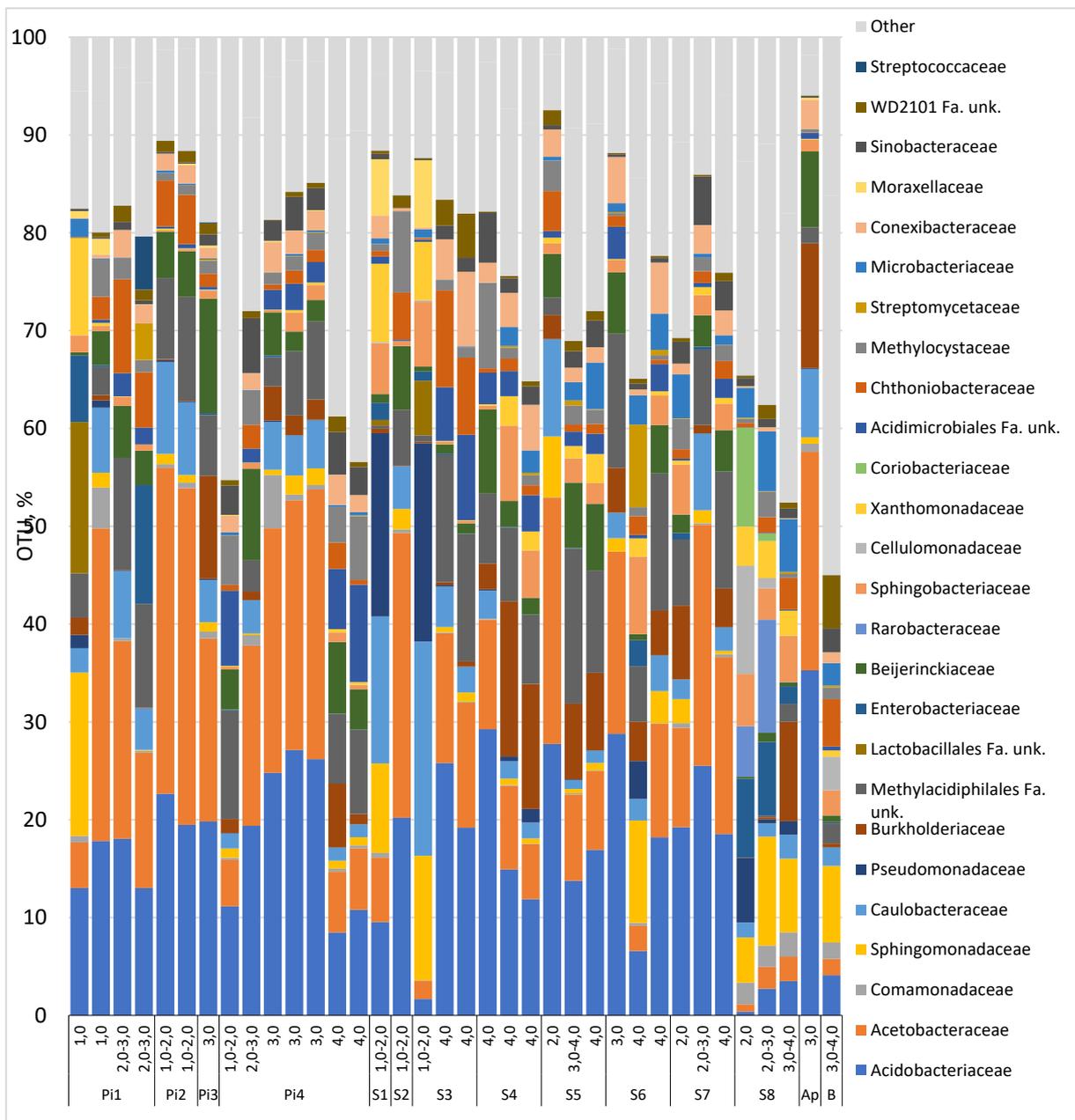
Todo ello dio lugar al análisis metagenómico de 47 muestras de madera, 32 muestras recogidas en Noruega y 15 en España (figuras 3.1.15-3.1.21). El total de muestras recogidas se resume en la Tabla S1 dentro del material suplementario.



**Figura 3.1.15. Análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a nivel de familia de la fracción bacteriana de las muestras de madera recogidas en España.** Debajo de cada muestra se indica el árbol del que viene [castaño (Cn), cerezo (Cr), fresno (Ah), higuera (F), morera (M), roble (Oa), olivo (Ol), peral (Pe), nogal (Wa) y sauce (Wi)] y el nivel de degradación de la muestra en forma numérica (código NFI).

Para ello, se secuenciaron las regiones V3-V4 del gen ribosomal 16S en bacterias y las regiones ITS2 (*Internal Transcribed Región 2*) en el caso de los hongos.

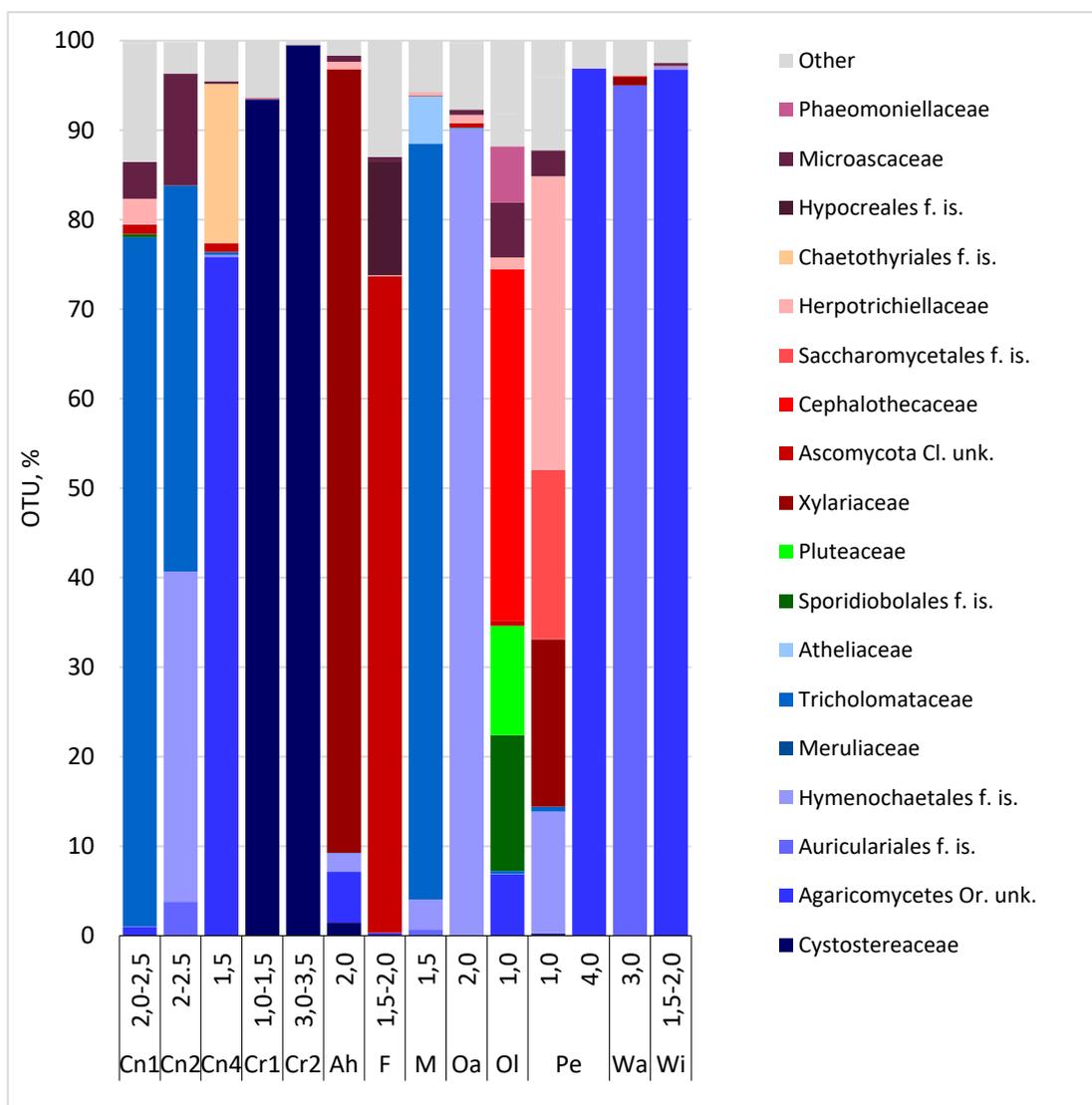
El análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTU: *Operatinal Taxonomic Units*) indica en las muestras recogidas en España una gran diversidad de diferentes familias como Comamonadaceae, Sphingomonadaceae, Microbacteriaceae, Rhozobiaceae y Bacillaceae, figura 3.1.15.



**Figura 3.1.16. Análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a nivel de familia de la fracción bacteriana de las muestras de madera recogidas en Noruega.** Debajo de cada muestra se indica el árbol del que proviene la muestra [pino (Pi), abeto (S), álamo (Ap), abedul (B)] y el nivel de degradación de la muestra en forma numérica (código NFI).

En cambio, en las muestras de Noruega existe una gran presencia de las familias Acidobacteriaceae y Acetobacteriaceae, siendo en algunas muestras entre el 30% y 60% de los OTUs encontrados, como se puede observar en la figura 3.1.16. Además, dentro de estas muestras también existe una gran relevancia de las familias Caulobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Burkholderiaceae, géneros dentro de estas familias se han comentado anteriormente por estar relacionados con la degradación, o por su utilidad industrial, como *Pseudomonas* o *Burkholderia*. La presencia mayoritaria de estas familias se repite en las

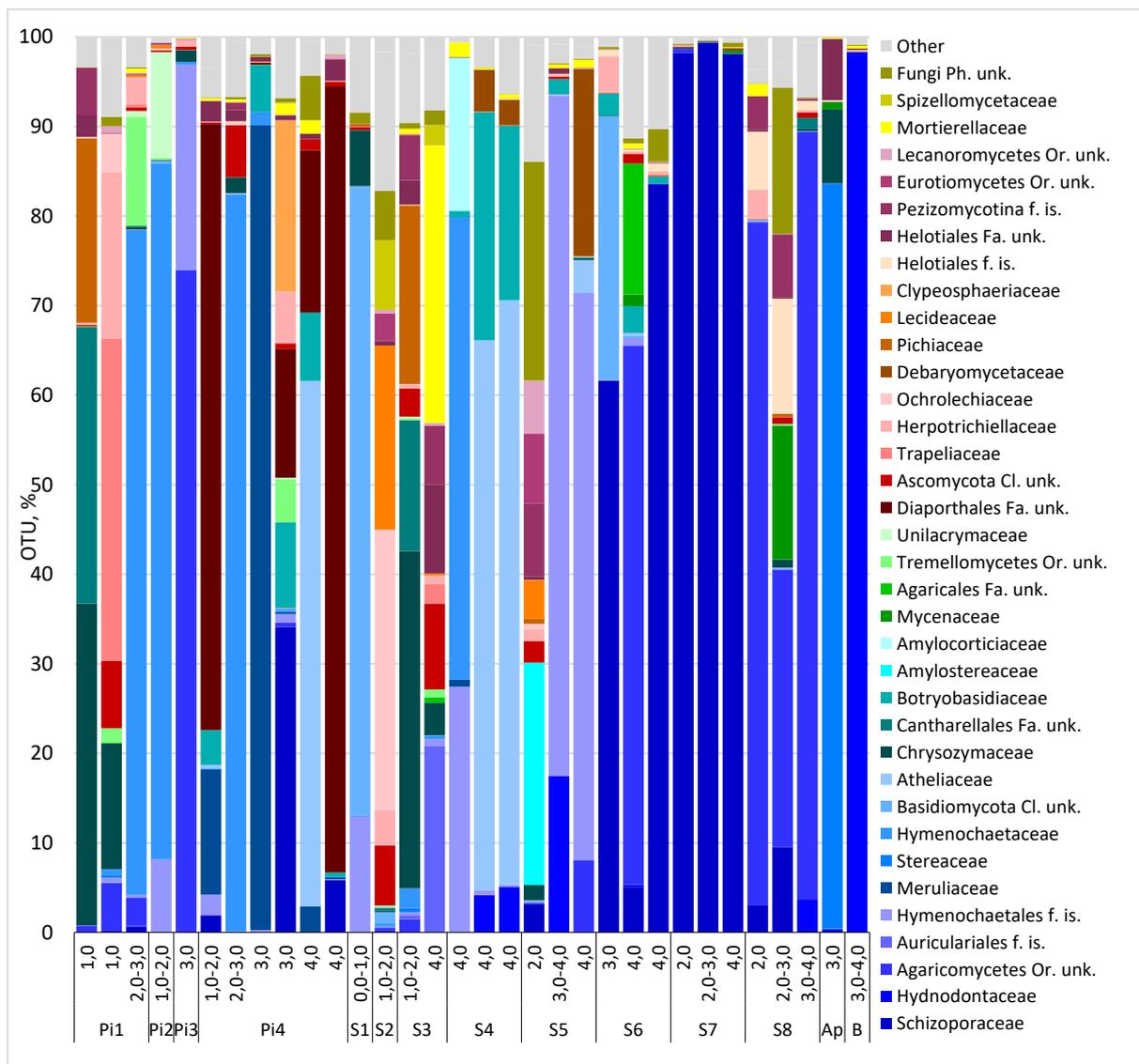
diferentes muestras de Noruega, siendo muy distinta en las muestras españolas, donde la dominancia de las familias Acidobacteriaceae y Acetobacteriaceae solo se da en tres muestras.



**Figura 3.1.17. Análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a nivel de familia de la fracción fúngica de las muestras de madera recogidas en España.** Debajo de cada muestra se indica el árbol del que viene [castaño (Cn), cerezo (Cr), fresno (Ah), higuera (F), morera (M), roble (Oa), olivo (OI), peral (Pe), nogal (Wa) y sauce (Wi)] y el nivel de degradación de la muestra en forma numérica (código NFI).

A nivel fúngico los resultados fueron bastante distintos, como se puede ver en la figura 3.1.17 y 3.1.18, la variabilidad a nivel de familias encontradas no fue muy alta en ninguna de las dos localidades. Las muestras españolas muestran unos resultados muy poco diversos, como se puede ver en la figura 3.1.17, donde la mayoría de las muestras están dominadas por una o dos familias fúngicas (Agaricomycetes, Cystostereaceae y Auriculariales). En el caso de las muestras de Noruega, los resultados fueron también muy homogéneos siendo unas pocas familias [Schizoporaceae, Hydnodontaceae, Hymenochaetales, Atheliaceae, Diaporthales *i.f* (*incertae familis*), Meruliaceae o Trapeliaceae] las más características de cada muestra.

Atendiendo al nivel de degradación, aquellas muestras con alto nivel de degradación las familias Schizoporaceae, Hydnodontaceae y Agaromycetales, están preferentemente representadas. Dentro de estas familias encontramos hongos pertenecientes a la degradación blanca, tales como los géneros *Hyphodontia* y *Schizopora* (Min *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2014).



**Figura 3.1.18. Análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) a nivel de familia de la fracción fúngica de las muestras de madera recogidas en Noruega.** Debajo de cada muestra se indica el árbol del que viene [pino (Pi), abeto (S), álamo (Ap), abedul (B)] y el nivel de degradación de la muestra en forma numérica (código NFI).

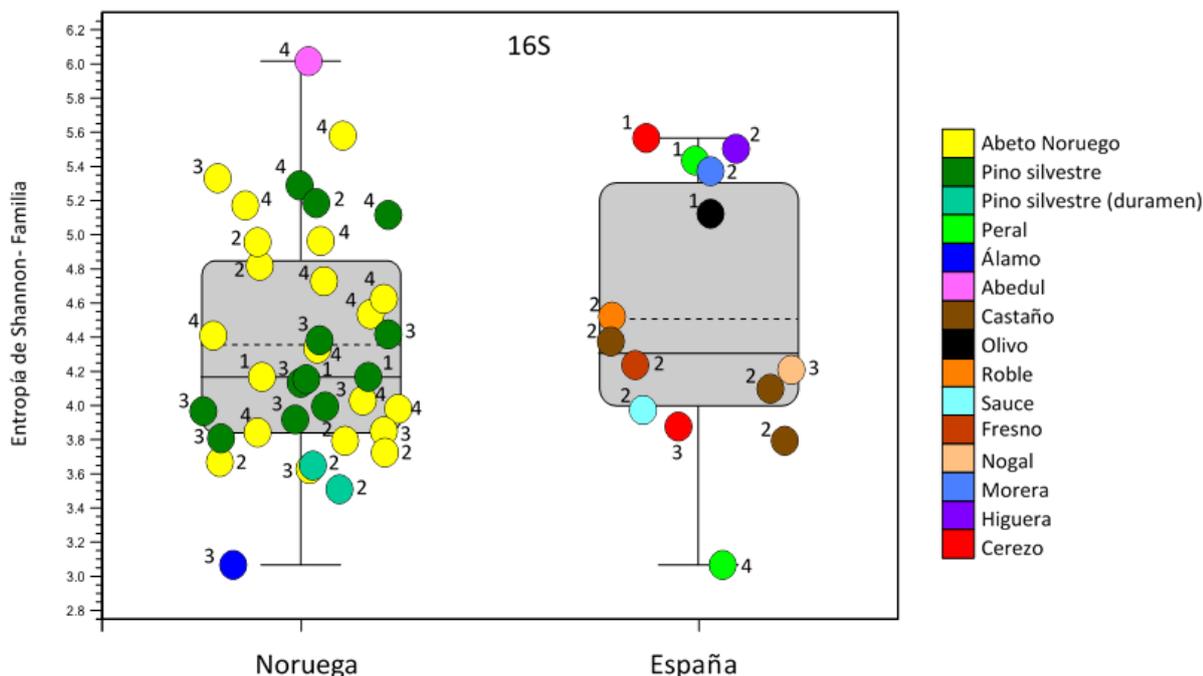
En ambas localizaciones uno de los taxones fúngicos más encontrados ha sido Agaromycetes, sin concretar el orden ni la familia. Dentro de este amplio taxón se encuentran especies degradadoras de la madera como la familia Polyporaceae, de donde viene una gran cantidad de hongos de la degradación blanca, como *T. versicolor*. En comparación con las muestras de Noruega, es interesante la aparición y gran dominancia de la familia Cystostereaceae dentro de las muestras de cerezo, esta familia está relacionada con hongos

degradadores de la madera como *Crustomyces subabruptus*, pero sobre todo con los hongos corticoides, gran grupo de hongos de diferentes familias muy implicados en la degradación de la madera (Gorjón, 2020; Kunttu *et al.*, 2020).

### 3.1.5. Diversidad microbiana

Aunque el presente trabajo no está centrado en la ecología microbiana, se pretende realizar algunos análisis que permitan establecer relaciones entre la degradación de la madera y los microorganismos aislados.

Con el fin de obtener una visión general de los ambientes analizados se realizó un análisis de la diversidad de cada muestra a través del índice de entropía de Shannon, comparando cada muestra individual con el resto. La entropía de Shannon da una medida la incertidumbre en la identidad de una especie en la muestra, este factor no mide directamente la diversidad existente en esa muestra, pero permite conocer información sobre la riqueza y la uniformidad de distribución de las especies en la misma (Jost, 2006; Kim *et al.*, 2017).



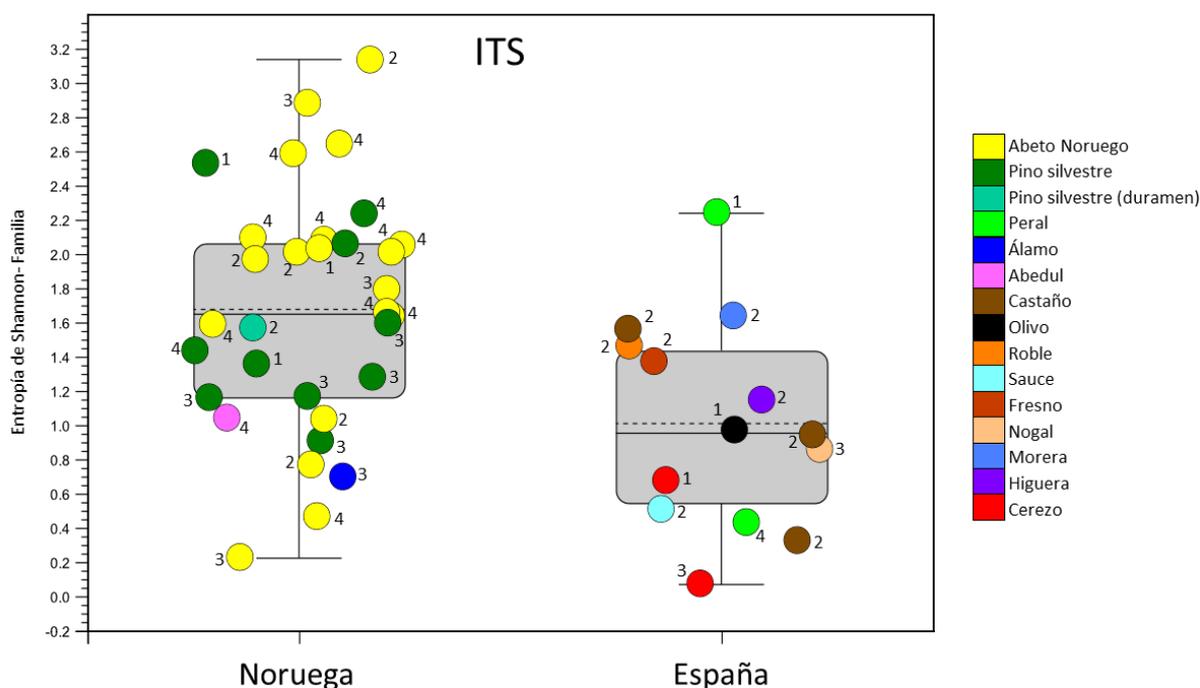
**Figura 3.1.19. Entropía de Shannon a nivel de familia en la fracción bacteriana.** Los números hacen referencia al estado de degradación de cada muestra, según el índice NFI. Las líneas de puntos representan las medianas mientras que las líneas sólidas representan las medias. Los colores hacen referencia a la especie de árbol de la muestra. El percentil de la caja es 25 y el factor de rango de los bigotes es 1,5.

El análisis de la fracción bacteriana muestra una gran variación entre las muestras, sin embargo, tal y como se puede ver en la figura 3.1.19, la media y la mediana general en ambas localizaciones son similares, indicando que, aunque las muestras individuales sean muy distintas la diversidad de ambos lugares es similar. Mas en detalle, no se ha encontrado una relación directa entre la especie de árbol y la diversidad microbiana de la muestra. Atendiendo

a las muestras españolas por tener más diversidad de árboles en el muestreo, no se ha visto ninguna asociación entre especies que se repitiesen (cerezo, peral y castaño).

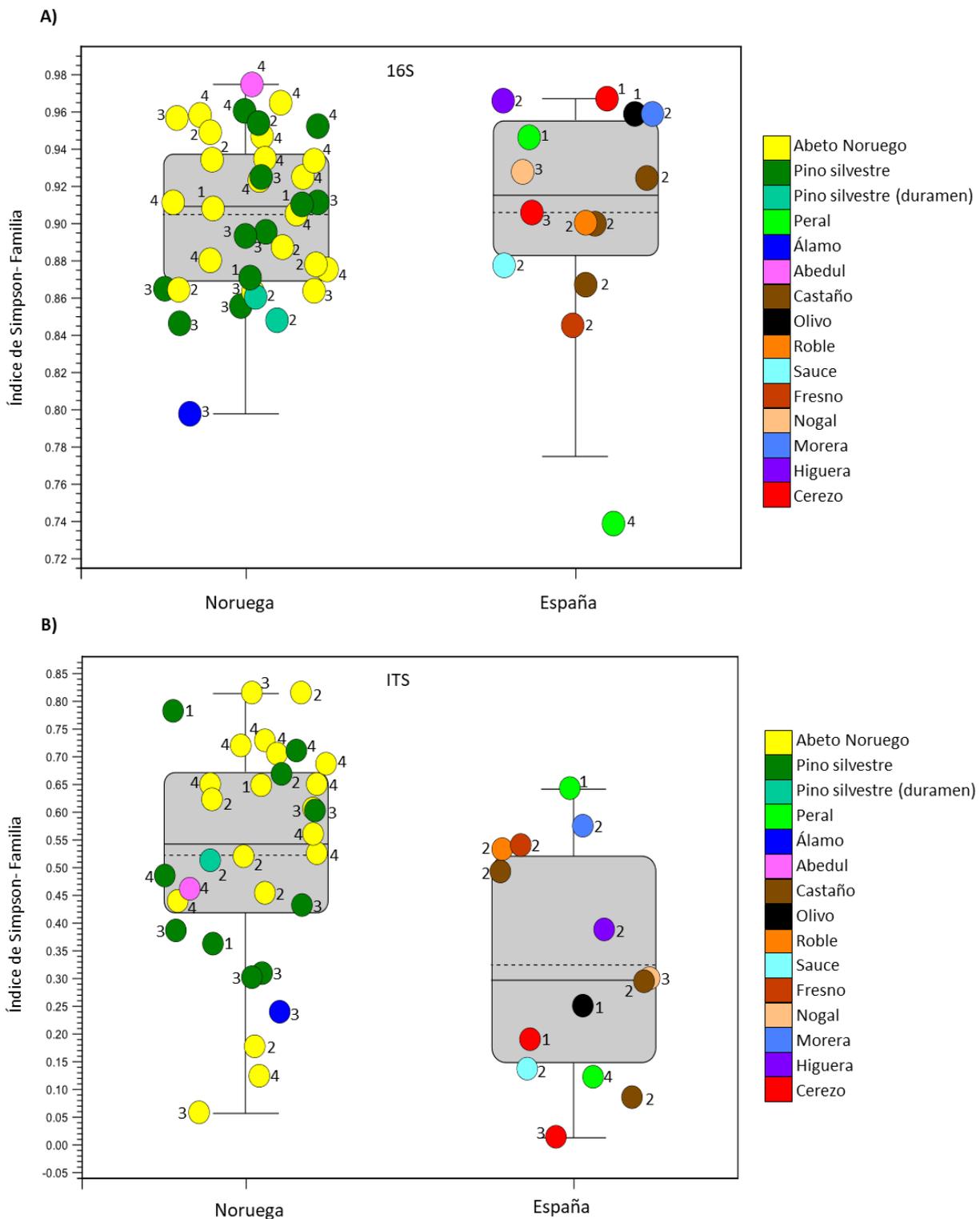
El análisis de las muestras de Noruega indica una mayor relación del estado de degradación de la madera con la diversidad bacteriana, teniendo las muestras más degradadas preferentemente unos índices de entropía de Shannon superiores. Esto, no se repite en las muestras españolas donde las maderas con nivel de degradación 1, son las que presentan mayor índice de diversidad.

En el caso de la fracción fúngica, como se muestra en la figura 3.1.20, existe diferencia entre las medias y medianas de ambas localizaciones. Se puede ver que la diversidad general de las muestras noruegas es superior a las muestras españolas. En todo caso, la diversidad de las muestras no es muy elevada, siendo inferior a la encontrada en la fracción bacteriana.



**Figura 3.1.20. Entropía de Shannon a nivel de familia en la fracción fúngica.** Los números hacen referencia al estado de degradación de cada muestra, según el índice NFI. Las líneas de puntos representan las medianas mientras que las líneas sólidas representan las medias. Los colores hacen referencia a la especie de árbol de la muestra. El percentil de la caja es 25 y el factor de rango de los bigotes es 1,5.

En la fracción fúngica tampoco parece haber ninguna relación existente entre el tipo de árbol y la diversidad en las muestras españolas, mientras que en las muestras de Noruega 6 de las muestras procedentes de abeto estarían por debajo de la media, mientras que 13 estarían por encima, indicando una mayor diversidad que en el caso del pino silvestre, donde 7 muestras tendrían un valor de entropía de Shannon inferior a la media y 3 superior a esta. En cuanto a la degradación de las muestras, en las muestras de Noruega se puede ver alguna relación entre la alta degradación (NFI:4) y una alta diversidad fúngica, tal y como se veía en la fracción bacteriana.



**Figura 3.1.21. Diversidad Alpha. Índice de Simpson a nivel de familia** Los números hacen referencia al estado de degradación de cada muestra, según el índice NFI. Las líneas de puntos representan las medianas mientras que las líneas solidas representan las medias. Los colores hacen referencia a la especie de árbol de la muestra. El percentil de la caja es 25 y el factor de rango de los bigotes es 1,5. **A)** Bacterias y **B)** Hongos.

Además, se ha realizado el mismo análisis siguiendo el índice de Simpson, este índice representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie (Kim *et al.*, 2017). Estos resultados han dado resultados parecidos a los obtenidos con utilizando la entropía de Shannon, como se puede ver en la figura 3.1.21. Aunque la variación entre muestras sea tan grande, existe una mayor diversidad en las muestras de bacterias, donde también existe una paridad en la media y la mediana en ambas localizaciones. En el caso de los hongos, las diferencias entre ambas regiones son igualmente evidentes utilizando esta medida de la diversidad. En este caso, se puede ver en el análisis de ambas fracciones microbianas un agrupamiento de muestras muy degradadas (NFI:4) en las muestras procedentes de Noruega con valores de diversidad altos, mientras que las muestras españolas únicamente muestran un pequeño agrupamiento en las maderas no muy degradadas (NFI:1).



## CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS MICROBIANOS

### 3.2.1. Introducción y objetivos del capítulo

La madera en degradación ha sido presentada durante el primer capítulo como un nicho ecológico interesante para la búsqueda de microorganismos. Las interacciones propias de nichos ecológicos donde los microorganismos deben convivir en condiciones de escasez de nutrientes, como es la madera o lo son los lechos marinos, son reconocidos como ambientes donde pueden existir interesantes interacciones microbianas, lo que puede llevar a la producción de metabolitos o enzimas útiles para la industria (Granato *et al.*, 2019).

El aislamiento es el primer paso en la caracterización de los microorganismos para que puedan ser utilizados de forma industrial, una vez los microorganismos han sido aislados e identificados se puede proceder al estudio de las características propias de esa cepa que puedan ser útiles en procesos industriales. Para ello, los métodos cualitativos permiten conocer, de una forma rápida y sencilla, qué cepas pueden llegar a ser útiles y dan una visión general de las particularidades de las cepas aisladas de un nicho ecológico concreto (García-Ortiz *et al.*, 2017; Lübeck, 2018; Pereira *et al.*, 2017).

Durante este capítulo se comprobará la capacidad antagónica de cepas aisladas frente a hongos causantes de los distintos tipos de degradación de la madera. Este tipo de ensayos son útiles para reconocer cepas con capacidad antagónica contra hongos, que más adelante puedan ser utilizada en ámbitos como la agricultura o la protección de la misma madera. Con el fin de validar los bioensayos de antagonismo, se ha realizado una búsqueda de genes biosintéticos en los principales productores de metabolitos antibióticos, Actinobacterias y *Penicillium*. Por último, se ha comprobado la capacidad de hongos aislados pertenecientes al género *Penicillium*, para la secreción de enzimas de interés comercial, como son las endoglucanasas, celulasas y feruloil esterases.

Por todo ello, los objetivos de este capítulo son:

- Análisis de capacidad antagonista de cepas aisladas de madera en degradación frente a hongos tradicionalmente implicados en la degradación de la madera.
- Análisis de la existencia de genes biosintéticos en cepas aisladas de madera en degradación (Actinobacterias y *Penicillium*).
- Análisis de la capacidad de producción de enzimas con aplicación industrial en cepas del género *Penicillium*.

### 3.2.2. Actividad antagonista de los microorganismos aislados

Para comprobar la capacidad antagónica de los aislados ambientales se seleccionó una técnica de competencia directa, donde se enfrentan en una misma placa los posibles microorganismos antagonistas y los indicadores (*reporters*). Y dado que el objetivo del

proyecto donde se enmarca esta tesis doctoral era la protección de la madera, se seleccionó como microorganismos indicadores cinco especies de hongos reconocidos como degradadores de la madera. Estas especies fueron seleccionadas para abarcar los diferentes tipos de degradación o coloración de la madera y están recogidas en la tabla 3.2.1.

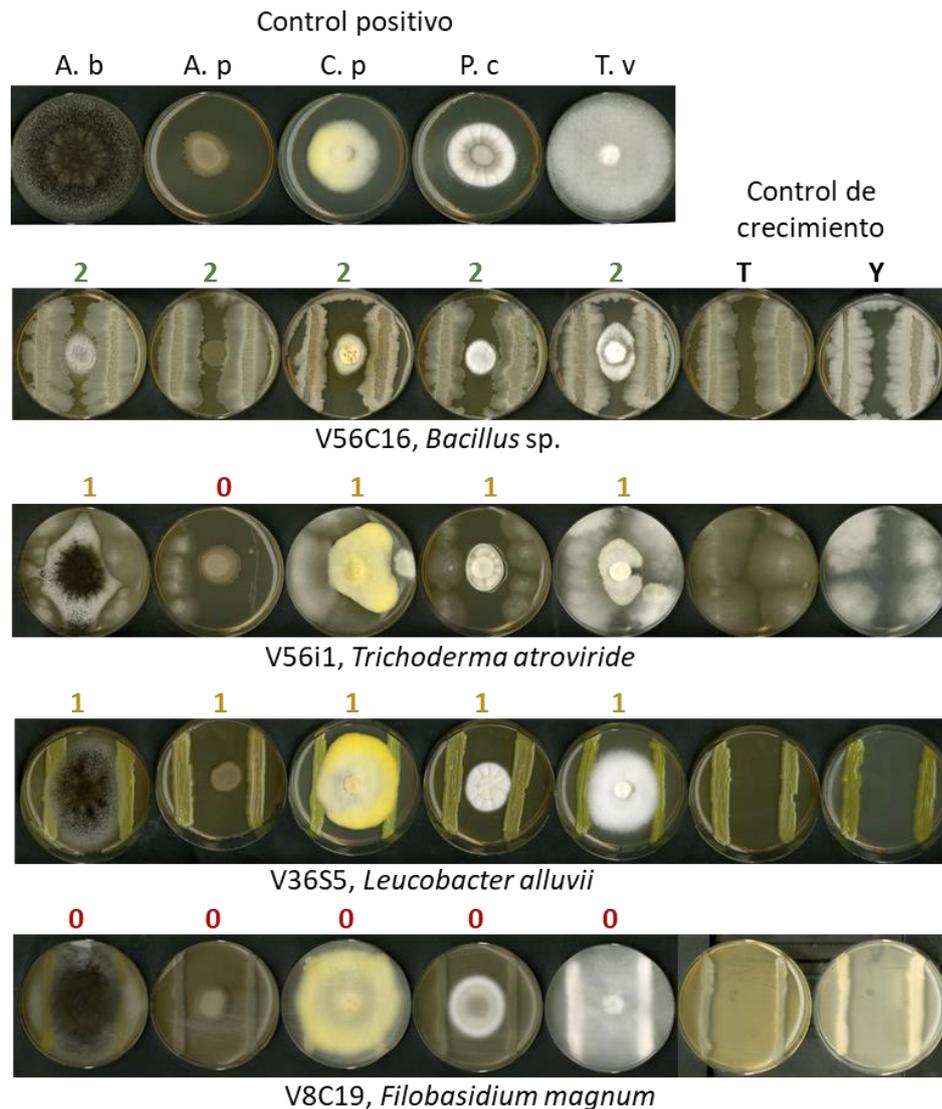
**Tabla 3.2.1. Especies seleccionadas como microorganismos indicadores en los bioensayos de competencia.** Los medios de cultivo utilizados fueron TSA (*Tryptic Soy Agar*) y YEME (*Yeast Extract Malt Extract*) según el crecimiento del hongo seleccionado.

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código</b>	<b>Tipo de degradación</b>	<b>Medio</b>	<b>Referencia</b>
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2700	A. b	Degradación blanda	TSA	(Hamed, 2013)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC 9480	P. c	Degradación blanda	TSA	(Hamed, 2013)
<i>Coniophora puteana</i>	DSM 3085	C. p	Degradación parda	YEME	(Tornberg & Olsson, 2002)
<i>Trametes versicolor</i>	DSM 3086	T. v	Degradación blanca	YEME	(Tišma <i>et al.</i> , 2021)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 2404	A. p	Coloración azul de la madera	TSA	(Kim <i>et al.</i> , 2020)

La realización de este tipo de ensayos necesita de medios de cultivo en los que tanto bacterias como hongos sean capaces de crecer. Por ello, se seleccionaron los medios TSA (*Tryptic Soy Agar*) y YEME (*Yeast Extract Malt Extract*) por ser medios ricos donde son capaces de crecer gran variedad de microorganismos (Bauer *et al.*, 2002; Beuchat, 1993; Shepherd *et al.*, 2010). Dentro de los hongos seleccionados como indicadores para los bioensayos, se comprobó el crecimiento de *A. brasiliensis*, *P. chrysogenum* y *A. pullulans* en TSA, y *C. puteana* y *T. versicolor* en YEME.

De las 720 cepas aisladas en todas las muestras de madera se seleccionaron 146 cepas entre bacterias y hongos para realizar un bioensayo de competencia contra las cinco especies seleccionadas de hongos. Estas cepas se seleccionaron acorde a bibliografía anterior, intentando escoger cepas de los géneros más frecuentemente hallados en madera en degradación. Las 146 cepas probadas se dividen en **i)** 55 cepas fúngicas, donde 41 eran hongos complejos y 14 eran levaduras, y **ii)** 90 cepas bacterianas, siendo 72 pertenecientes a bacterias Gram + y 18 a Gram -. Los bioensayos se recogen en las figuras suplementarias S1 y S2.

Para la realización del bioensayo se sembró el hongo indicador en el centro de la placa y el microorganismo antagonista a ambos lados de éste, tal y como se muestra en la figura 3.2.1.



**Figura 3.2.1. Ejemplos de ensayos de antagonismo.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). Completa o casi completa inhibición del crecimiento de la especie indicadora: **2**, existencia de antagonismo de forma moderada: **1** y falta completa de inhibición: **0**. Hongos indicadores: *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p) *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Como control de crecimiento de la cepa indicadora, se sembró la cepa sola, sin antagonista, y como control del crecimiento de las especies antagonistas, estas se sembraron en ambos medios (TSA y YEME) sin la especie indicadora.

La evaluación del antagonismo por parte de la cepa aislada de madera en degradación se realizaba comparando los ensayos frente a placas control (García-Ortiz *et al.*, 2017). Según el crecimiento de los hongos indicadores en la placa junto con los antagonistas se evaluaba cada placa con una escala del cero a dos, donde cero corresponde a carencia de capacidad antagonista (el hongo indicador ha crecido tanto como si creciera solo) y dos corresponde a un antagonismo completo.

### 3.2.2.1. ANÁLISIS DE AISLADOS FÚNGICOS

Se realizaron bioensayos con 55 cepas fúngicas, que se pueden dividir entre hongos complejos y levaduras. Dentro de los hongos complejos se escogieron aquellas especies con conocida capacidad para la inhibición del crecimiento de otros hongos, como *Alternaria* o *Trichoderma*. Por ello, se realizaron bioensayos con 5 géneros de hongos distintos: 29 cepas de *Penicillium*, 9 cepas de *Trichoderma*, 1 cepa de *Alternaria*, 1 cepa de *Cladosporium* y 1 cepa de *Clonostachys*. Esta desigualdad en la selección de las cepas a probar se dio, por un lado, por el aislamiento preferencial de cepas de *Penicillium* y *Trichoderma* en la madera en degradación, y por otro, por la capacidad biosintética de estos géneros fúngicos.

Dentro de esta fracción fúngica con resultados antagónicos medio-altos, se encuentran 25 cepas de las que 7 son cepas de *Trichoderma* y 18 son cepas de *Penicillium*. Los resultados más altos corresponden a dos cepas de *Trichoderma*, *T. citrinoviride* y *T. gamsii*, ambos con una inhibición total del crecimiento de los todos los hongos marcadores.

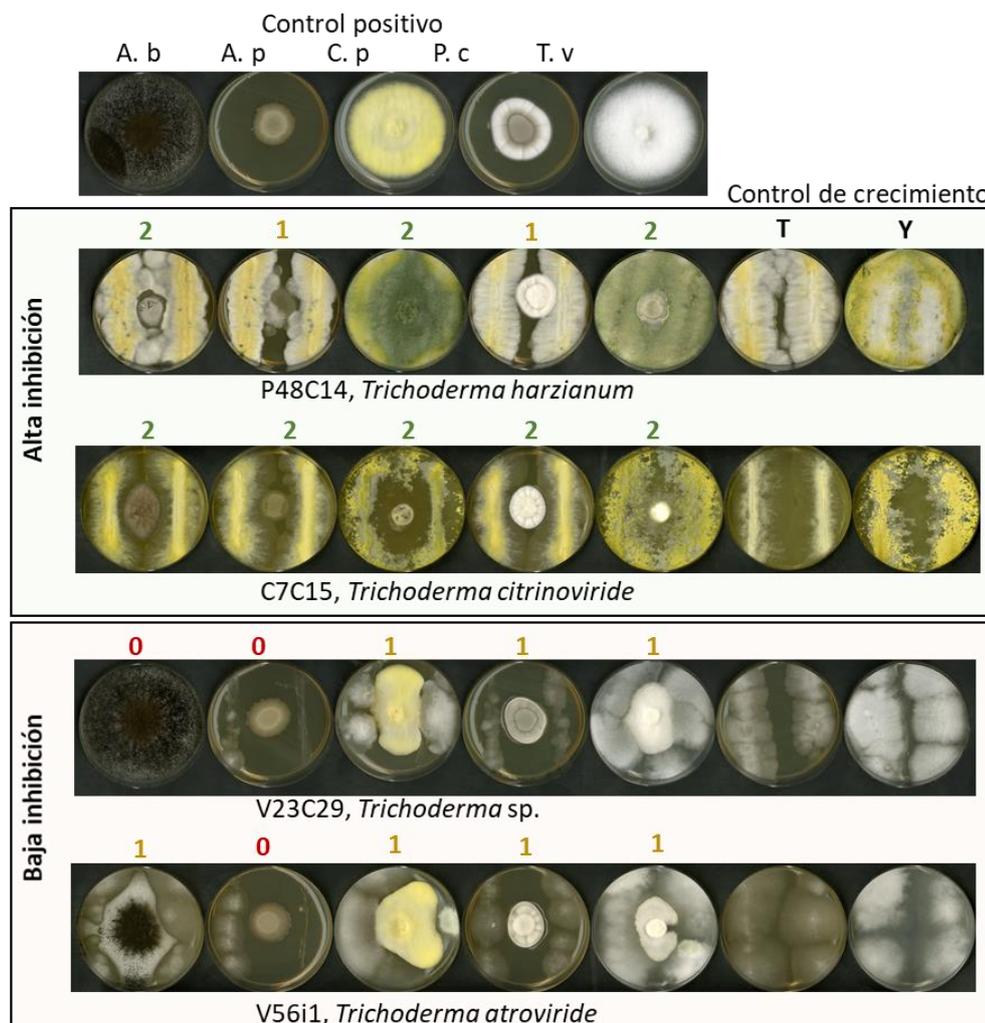
**Tabla 3.2.2. Bioensayos de cepas de *Trichoderma*.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *Aspergillus brasiliensis* (A. b), *Aureobasidium pullulans* (A. p), *Penicillium chrysogenum* (P. c), *Coniophora puteana* (C. p) y *Trametes versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Especie	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	C7C15	2	2	2	2	2	2,0
<i>Trichoderma gamsii</i>	V5C7	2	2	2	2	2	2,0
<i>Trichoderma koningii</i>	P44C12	2	2	2	1	2	1,8
<i>Trichoderma</i> sp.	P42S2	2	2	2	1	2	1,8
<i>Trichoderma harzianum</i>	P48C14	2	1	2	1	2	1,6
<i>Trichoderma lixii</i>	V23C22	2	1	2	1	2	1,6
<i>Trichoderma</i> sp.	V5S9	1	0	2	1	1	1,0
<i>Trichoderma atroviride</i>	V56i1	1	0	1	1	1	0,8
<i>Trichoderma</i> sp.	V23C29	0	0	1	1	1	0,6

Dentro de las cepas del género *Trichoderma* aisladas se ha hallado una gran diferencia entre la capacidad antagónica de las cepas analizadas, como se puede ver en la tabla 3.2.2 y en la figura 3.2.2. Algunas cepas, como *T. harzianum* (P48C14) y *T. citrinoviridae* (C7C15) son capaces de inhibir el crecimiento por completo, o casi por completo, de los hongos degradadores de la madera, mientras que la actividad antifúngica de otras es mucho menor [*Trichoderma* sp. (V23C29) y *Trichoderma atroviridae* (V56i1)]. Esta actividad contra los hongos degradadores de la madera ha sido demostrada en el trabajo de Ribera *et al.* (2017) donde demuestra la utilidad de cepas de *Trichoderma* para tratamiento de la madera frente a la degradación.

Este género destaca gracias a la gran actividad enzimática que presenta, donde diferentes especies han sido usadas para la degradación de moléculas complejas. Algunos ejemplos son

la celulosa, tanto en la producción de energía como en la preparación de alimento para animales, o de contaminantes como fenoles, nitratos o cianidas. Además, su capacidad antagonista ante otros hongos, ya bien por micro-parasitismo, como por producción de moléculas antifúngicas o de compuestos orgánicos volátiles (VOC), ha impulsado el uso de este género en la protección de cultivos frente a hongos fitopatógenos (Błaszczuk *et al.*, 2014; Kango *et al.*, 2019).



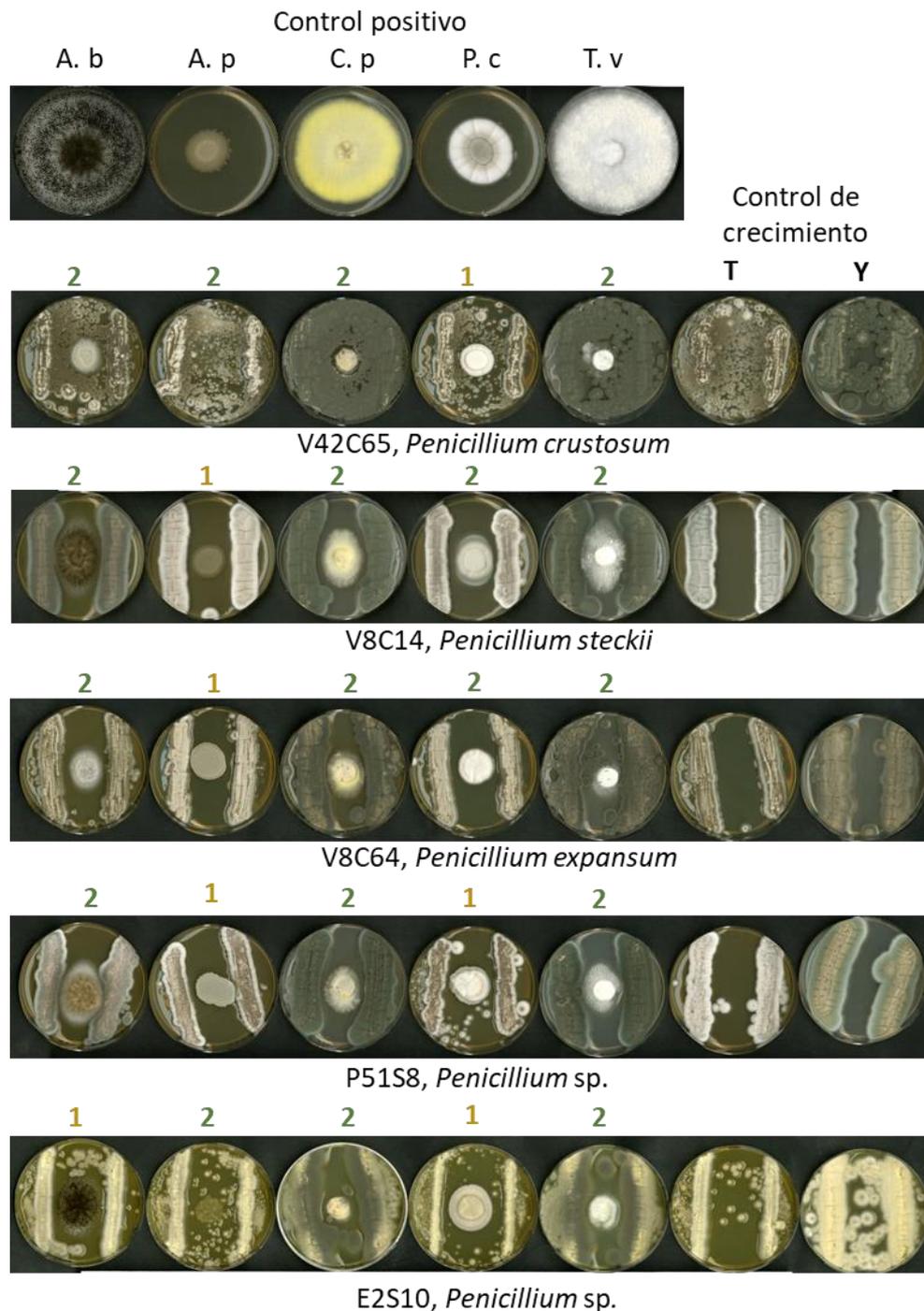
**Figura 3.2.2. Ejemplos de antagonismo en cepas con alta y baja inhibición de *Trichoderma*.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). Paneles superiores: cepas con alta capacidad antagonista, y paneles inferiores: cepas con baja capacidad antagonista. *Aspergillus brasiliensis* (A. b), *Aureobasidium pullulans* (A. p), *Penicillium chrysogenum* (P. c), *Coniophora puteana* (C. p) y *Trametes versicolor* (T. v).

Por otro lado, el género *Penicillium* es uno de los géneros tradicionales en la obtención de antibióticos, habiéndose descubierto cepas con capacidad de producir moléculas con actividad bactericida, antifúngica, anticancerígena entre otras (Kumar *et al.*, 2021; Mady & Haggag, 2020). Además, este género ha estado presente en otras actividades industriales, ejemplos de esto son la elaboración de quesos curados o la producción de enzimas para distintos sectores (Al-Enazi *et al.*, 2018; Toghueo & Boyom, 2020).

**Tabla 3.2.3. Bioensayos de cepas de *Penicillium*.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Especie	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Penicillium crustosum</i>	V42C65	2	2	2	1	2	1,8
<i>Penicillium steckii</i>	V8C14	2	1	2	2	2	1,8
<i>Penicillium expansum</i>	V8C64	2	1	2	2	2	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	E2S10	1	2	2	1	2	1,6
<i>Penicillium</i> sp.	P51S8	2	1	2	1	2	1,6
<i>Penicillium melinii</i>	E2C16	2	2	1	0	2	1,4
<i>Penicillium</i> sp.	V42C33	1	1	2	1	2	1,4
<i>Penicillium charlesii</i> B	V42C63	2	1	1	1	2	1,4
<i>Penicillium citrinum</i>	V8C33	2	0	2	1	2	1,4
<i>Penicillium aeneum</i>	V42C66	1	1	2	1	1	1,2
<i>Penicillium toxicarium</i>	V8C126	1	1	2	1	1	1,2
<i>Penicillium sanguifluum</i>	V8C83	1	1	2	1	1	1,2
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	E2C22	1	1	2	0	1	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	V12C13	1	0	2	1	1	1,0
<i>Penicillium spinolosum</i>	V4C17	1	0	2	1	1	1,0
<i>Penicillium aeneum</i>	V4C34	1	0	1	1	2	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	V4S2	1	1	2	0	1	1,0
<i>Penicillium corylophilum</i>	V8C26	1	1	1	1	1	1,0
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	V12C14	1	0	1	1	1	0,8
<i>Penicillium glabrum</i>	V7C19	1	0	1	0	2	0,8
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	V8C15	1	1	1	1	0	0,8
<i>Penicillium murcianum</i>	V8i77	1	0	1	0	2	0,8
<i>Penicillium pancosmium</i>	V8C107	1	0	1	0	1	0,6
<i>Penicillium fellutanum</i>	V42C41	0	0	1	0	1	0,4
<i>Penicillium</i> sp.	V4C32	0	0	2	0	0	0,4
<i>Penicillium decaturense</i>	V8C31	1	0	1	0	0	0,4
<i>Penicillium brevicompactum</i>	V12S13	1	0	0	0	0	0,2
<i>Penicillium ubiqueum</i>	V8C89	0	0	0	0	1	0,2
<i>Penicillium herbarum</i>	V8C35	0	0	0	0	0	0,0

Como el género *Penicillium* fue el género del cual más cepas se aislaron, ha sido el género fúngico en el que se han realizado la mayor parte de los bioensayos. De esta manera, se han testado 29 cepas de *Penicillium* en ensayo de competencia frente a los hongos degradadores de madera. Como se puede ver en la tabla 3.2.3, la mayoría de las cepas probadas (19 cepas) poseen alguna capacidad antagónica (media superior a 1,0), y 5 de ellas alta capacidad (media superior a 1,5), representadas en la figura 3.2.3.



**Figura 3.2.3. Ejemplos de cepas con alta inhibición de *Penicillium*.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). Las cepas de *Penicillium* con mayor capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de madera. *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

La capacidad antifúngica del género *Penicillium* ya ha sido demostrada con anterioridad, con especies capaces de inhibir el crecimiento de gran variedad de hongos a través de la producción de moléculas de distinta naturaleza, desde las proteínas antifúngicas (AFPs), las cuales son proteínas catiónicas, ricas en cisteína y muy estables a la temperatura, el pH y la

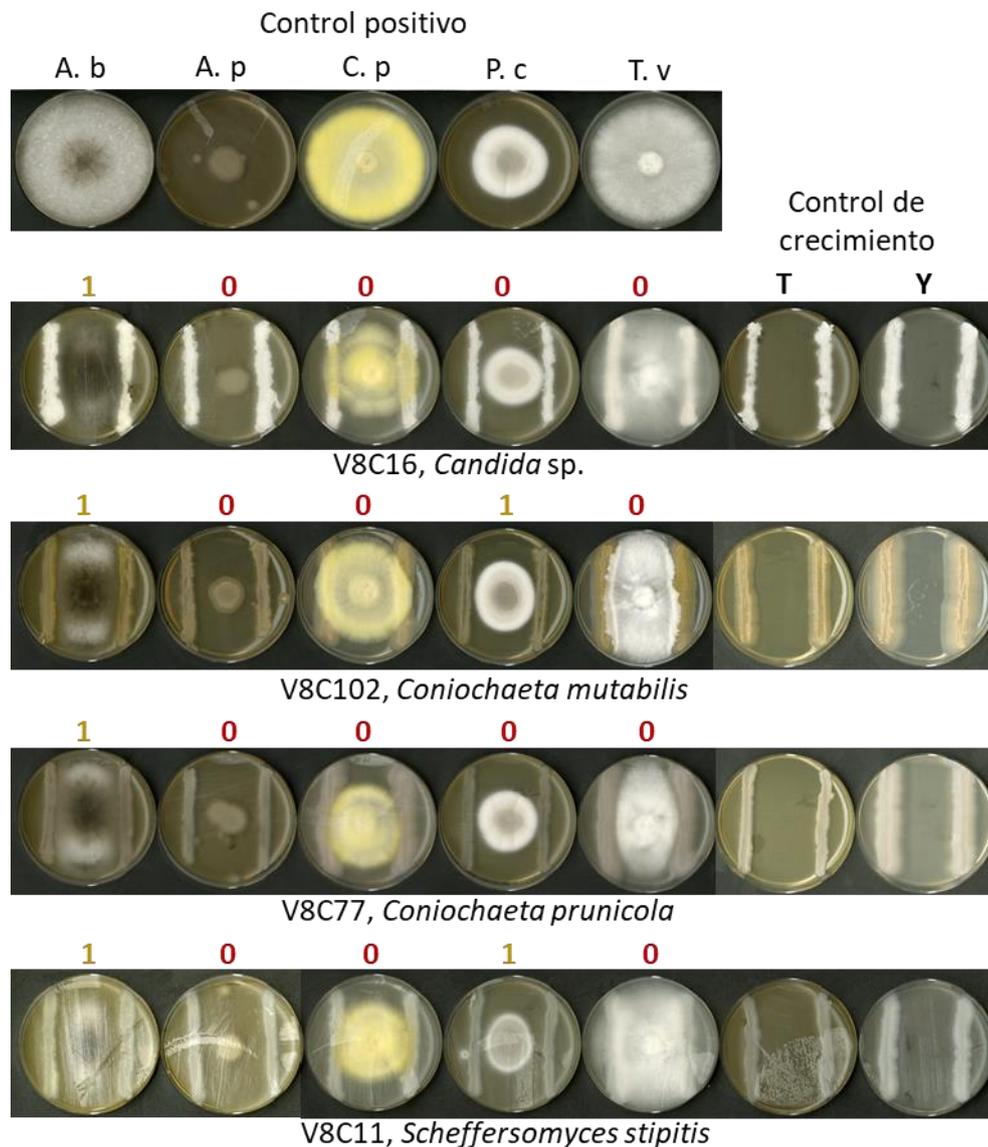
proteólisis que muestran actividad frente una gran selección de hongos, incluidos hongos del mismo género (Garrigues *et al.*, 2018), hasta la producción de moléculas complejas como policétidos con actividad tanto antifúngica como anticancerígena (Bladt *et al.*, 2013).

Asimismo, se han realizado ensayos de competencia con tres cepas fúngicas adicionales [*Alternaria atra* (V8C36), *Cladosporium cladosporioides* (V8C91) y *Clonostachys rosea* (V42C62)] que no presentaron ninguna actividad antagónica, tal y como se puede ver en la tabla 3.2.4.

**Tabla 3.2.4. Bioensayos de cepas de hongos y levaduras.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de la madera. Las primeras tres cepas son los hongos no *Trichoderma* o *Penicillium* testados, el resto a partir de la línea son levaduras. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *Aspergillus brasiliensis* (A. b), *Aureobasidium pullulans* (A. p), *Penicillium chrysogenum* (P. c), *Coniophora puteana* (C. p) y *Trametes versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

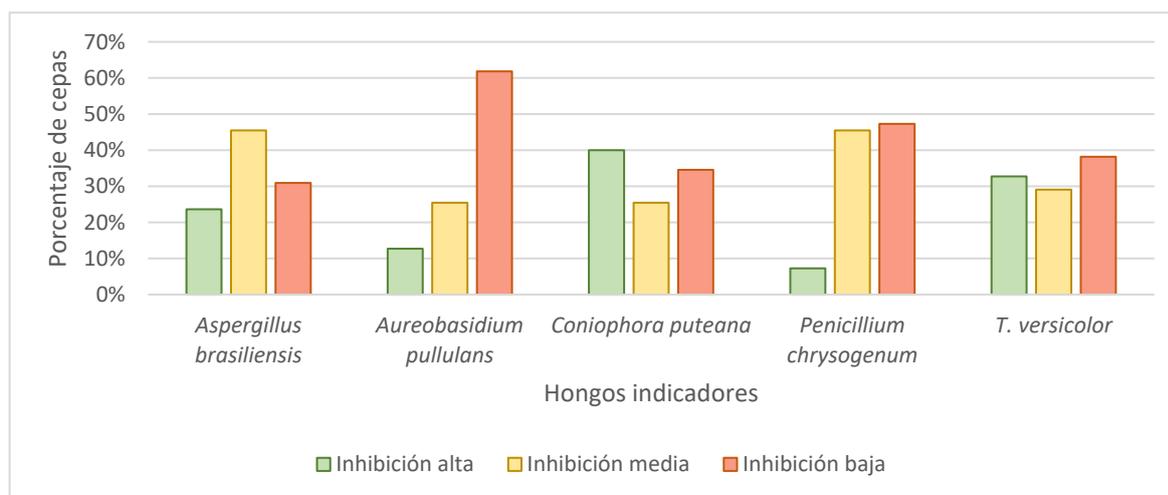
Especie	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Alternaria atra</i>	V8C36	1	0	1	1	1	0,8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	V8C91	0	0	0	0	0	0,0
<i>Clonostachys rosea</i>	V42C62	0	0	0	0	0	0,0
<i>Coniochaeta mutabilis</i>	V8C102	1	0	0	1	0	0,4
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	V8C11	1	0	0	1	0	0,4
<i>Candida sp.</i>	V8C16	1	0	0	0	0	0,2
<i>Coniochaeta prunicola</i>	V8C77	1	0	0	0	0	0,2
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	C7C25	0	0	0	0	0	0,0
<i>Coniochaeta mutabilis</i>	V8C80	0	0	0	0	0	0,0
<i>Debaryomyces udonii</i>	V3S24	0	0	0	0	0	0,0
<i>Filobasidium magnum</i>	V8C19	0	0	0	0	0	0,0
<i>Neobulgaria pura</i>	V4i51	0	0	0	0	0	0,0
<i>Rhodotorula philyla</i>	V4i38	0	0	0	0	0	0,0
<i>Tremella moriformis</i>	V12i13	0	0	0	0	0	0,0
<i>Tremella sp.</i>	V4i27	0	0	0	0	0	0,0
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	V1i9	0	0	0	0	0	0,0
<i>Tromeropsis microtheca</i>	C7C24	0	0	0	0	0	0,0

Por último, se comprobó la capacidad antagónica de 14 cepas de levaduras aisladas. Diferentes mecanismos han sido descritos como implicados en la inhibición del crecimiento de hongos por parte de levaduras. Entre estos se pueden destacar algunos como la secreción de sideróforos, la competición por el espacio o los nutrientes y la producción de compuestos con actividad antifúngica (Spadaro & Droby, 2016). Dentro de las levaduras analizadas ninguna de ellas tenía un efecto global contra los hongos degradadores de la madera, pero cuatro de ellas tenían un efecto moderado contra ellos (figura 3.2.4 y tabla 3.2.4). Entre ellas se puede ver una ligera inhibición del crecimiento de *A. brasiliensis* en todos los casos, este hongo no llega a expandirse por toda la placa, además *Coniochaeta prunicola* (V8C77) parece inhibir levemente el crecimiento de *P. chrysogenum* y *T. versicolor*.



**Figura 3.2.4. Bioensayos con levaduras con capacidad inhibitoria.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

En términos generales, se puede ver que la inhibición total por parte de las cepas de hongos aisladas de madera en degradación ha sido desigual dependiendo del hongo indicadora al que se enfrentaban, figura 3.2.5. Es curioso ver que casi el 40% de las cepas han sido capaces de inhibir el crecimiento de *C. puteana*, mientras que menos del 10% han sido capaces de inhibir el crecimiento de *P. chrysogenum*. Este hecho destaca la especificidad que puede existir en los mecanismos de inhibición fúngica dentro de la madera en degradación (Hiscox & Boddy, 2017).



**Figura 3.2.5. Capacidad inhibitoria de las cepas fúngicas testadas separadas por el hongo indicador** El porcentaje de cepas que tiene capacidad antagonica alta (2 en verde), media (1 en amarillo) y baja (0 en rojo).

### **3.2.2.2. ANÁLISIS DE AISLADOS BACTERIANOS**

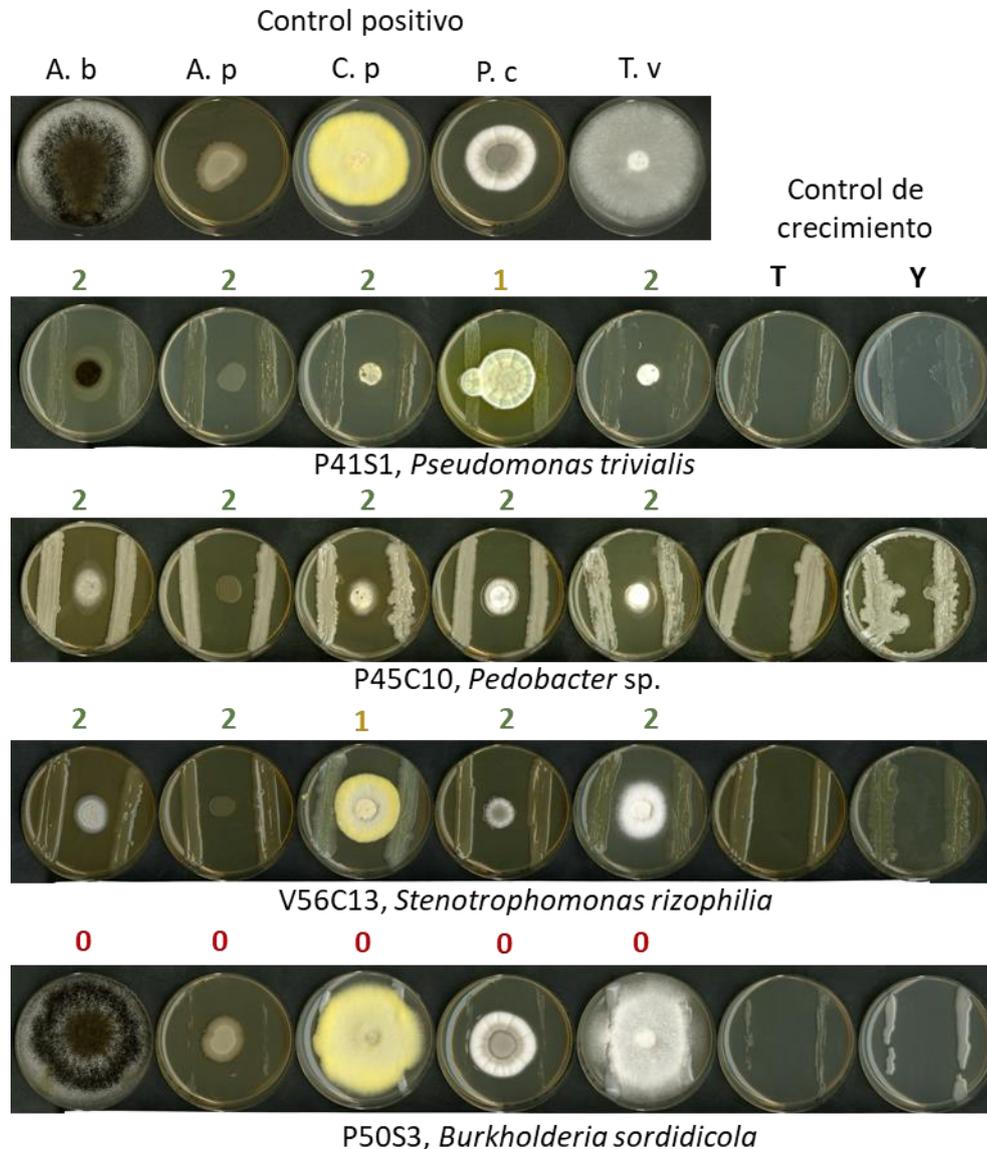
La capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos degradadores de madera se testó utilizando 90 cepas bacterianas pertenecientes a 18 géneros distintos. Dentro de los géneros analizados se dividieron según sea su comportamiento respecto a la tinción de Gram.

Dentro de las especies Gram – (G-) se han analizado 18 aislados pertenecientes a 4 géneros diferentes (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pedobacter* y *Stenotrophomonas*). Los resultados se resumen en la Tabla 3.2.5. En ella se puede ver que cinco cepas analizadas tienen alta capacidad antagonista frente a todas las cepas indicadoras, representadas en la figura 3.2.5.

Dos de ellas perteneces al género *Pseudomonas*, él cual es bien conocido por su capacidad antifúngica siendo utilizado desde hace años en agricultura como agente de biocontrol y potenciador del crecimiento de los cultivos (Montes-Osuna *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021). Esta capacidad de inhibición del crecimiento de hongos también se ha demostrado en especies arboles atacadas por *Heterobasidium* (Pellicciaro *et al.*, 2021). Dentro de estas, como se puede ver en la figura 3.2.5, la interacción entre *P. chrysogenum* y la *P. trivialis* (P41S1) ha ocasionado la producción de un metabolito secundario amarillo por parte de *P. chrysogenum*, la producción de este tipo de metabolitos en esta especie ha sido ampliamente estudiado (Fierro *et al.*, 2022).

De las 8 cepas restantes, dentro de las bacterias G- se han testado cinco cepas de *Burkholderia*, dos cepas de *Stenotrophomonas* y una cepa de *Pedobacter* obteniendo resultados de alto antagonismo de todos estos géneros. Aunque el género *Burkholderia* es conocido por su uso en la protección de cultivos debido a sus propiedades antifúngicas (Kim *et al.*, 2019), ha sido el que menos cepas con alta capacidad antagonica frente a los hongos degradadores de la madera ha presentado, siendo únicamente *Burkholderia* sp. (V1i2) la que presenta inhibición frente a todos los hongos marcadores. También es cierto, que otros

estudios destacan el papel de cepas de *Burkholderia* como bacterias endófitas de hongos degradadores de la madera, siendo capaces de potenciar el crecimiento de estos (Nazir *et al.*, 2013, 2014; Stopnisek *et al.*, 2016).



**Figura 3.2.5. Bioensayos con bacterias Gram -.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Cepas de los géneros *Pedobacter* y *Stenotrophomonas* también han presentado inhibición frente a los hongos indicadores. Existen estudios que demuestran la capacidad de ambos géneros para la inhibición de hongos que afectan a los cultivos, ya sea por la producción de compuestos volátiles orgánicos (VOCs), o por la secreción de quitosanas (Alijani *et al.*, 2020; Rojas-Solís *et al.*, 2018; Y.-S. Song *et al.*, 2019).

**Tabla 3.2.5 Bioensayos de cepas Gram -.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T.s versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Especie	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Pedobacter</i> sp.	P45C10	2	2	2	2	2	2,0
<i>Pseudomonas</i> sp.	V49S4	2	1	2	2	2	1,8
<i>Pseudomonas trivialis</i> .	P41S1	2	2	2	1	2	1,8
<i>Burkholderia</i> sp	V1i2	2	2	1	2	1	1,6
<i>Stenotrophomonas rizophilia</i>	V56C13	2	2	1	2	1	1,6
<i>Pseudomonas helmenticensis</i>	V3I2	2	2	0	1	2	1,4
<i>Pseudomonas reinekei</i>	V12I12	0	2	2	1	2	1,4
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	V8i5	1	1	2	1	1	1,2
<i>Pseudomonas</i> sp.	V2I2	1	1	0	2	2	1,2
<i>Pseudomonas</i> sp.	V42C21	0	1	2	1	2	1,2
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	V8I2	1	2	0	1	2	1,2
<i>Pseudomonas</i> sp.	P47C1	1	1	2	1	0	1,0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	V5C1	1	1	1	1	1	1,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	V8C4	1	1	0	1	0	0,6
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	V4C10	1	1	0	1	0	0,6
<i>Burkholderia bryophila</i>	V8i6	0	0	0	1	0	0,2
<i>Burkholderia sordidicola</i>	P50S1	0	0	0	0	0	0,0
<i>Burkholderia sordidicola</i>	P50S3	0	0	0	0	0	0,0

Dentro de las cepas Gram + (G+) aisladas se han analizado 72 cepas pertenecientes a 14 géneros distintos, las cuales aparecen resumidas en la tabla 3.2.5.

**Tabla 3.2.5. Resumen de cepas Gram + testadas para actividad antifúngica.**

Clase	Orden	Familia	Género	Nº de cepas testadas
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	29
Actinobacteria	Micrococcales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	1
		Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i>	1
		Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	1
			<i>Curtobacterium</i>	1
			<i>Leifsonia</i>	1
			<i>Microbacterium</i>	8
	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	1
		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	3
	Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	25
	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	1
<i>Arthobacter</i>			6	
Nocardiopsaceae		<i>Nocardioides</i>	1	
		<i>Nocardiopsis</i>	2	

La selección de cepas para realizar bioensayos se realizó atendiendo a aquellas que bibliográficamente presentan capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos degradadores de madera, por ello se testaron principalmente bacterias G+ pertenecientes a la clase Actinobacteria y otras con conocida capacidad antifúngica como el género *Bacillus*, tal y como se puede ver en la tabla 3.2.5. Además, estos géneros fueron los que más se aislaron desde las muestras de madera en degradación.

Dentro de las cepas de *Bacillus* analizadas se han encontrado cepas que presentan una gran inhibición y otras que no presentan ninguna. Cabe destacar la inhibición causada por distintas cepas de *Bacillus pumilus* aisladas de diferentes lugares [P48C1 (Noruega), V17C11 (España) y E2i1 (Eslovaquia)]. Estas cepas han sido las que más inhibición han presentado de todos los ensayos analizados, produciendo una inhibición completa de todas las especies indicadoras.

Esta variabilidad en la capacidad antifúngica puede observarse en la tabla 3.2.6 y en la figura 3.2.6, donde cepas del género *Bacillus* aisladas de madera en degradación han presentado desde una inhibición total del crecimiento fúngico hasta una falta completa de esta actividad.

**Tabla 3.2.6. Bioensayos de cepas del género *Bacillus*.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagonista frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *Aspergillus brasiliensis* (A. b), *Aureobasidium pullulans* (A. p), *Penicillium chrysogenum* (P. c), *Coniophora puteana* (C. p) y *Trametes versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Nombre	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Bacillus pumilus</i>	P48C1	2	2	2	2	2	2,0
<i>Bacillus pumilus</i>	V17C11	2	2	2	2	2	2,0
<i>Bacillus pumilus</i>	E2i1	2	2	2	2	2	2,0
<i>Bacillus safensis</i>	V36C10	2	2	2	2	2	2,0
<i>Bacillus</i> sp.	V56C16	2	2	2	2	2	2,0
<i>Bacillus</i> sp.	V3C1	2	2	1	2	2	1,8
<i>Bacillus subtilis</i>	V3i4	2	1	1	1	1	1,2
<i>Bacillus simplex</i>	V56C25	1	0	2	1	1	1,0
<i>Bacillus mycoides</i>	V8C1	1	1	0	1	1	0,8
<i>Bacillus</i> sp.	P45C9	1	2	1	0	0	0,8
<i>Bacillus</i> sp.	V1C3	2	1	0	1	0	0,8
<i>Bacillus</i> sp.	V56C19	1	1	0	1	1	0,8
<i>Bacillus aryabhatai</i>	V36C5	1	1	0	1	0	0,6
<i>Bacillus megaterium</i>	V3C8	1	1	0	1	0	0,6
<i>Bacillus licheniformis</i>	V5i3	1	0	0	1	0	0,4
<i>Bacillus pumilus</i>	P46C7	1	0	0	1	0	0,4
<i>Bacillus simplex</i>	P51S1	1	1	0	0	0	0,4
<i>Bacillus muralis</i>	V8C2	1	0	0	0	0	0,2
<i>Bacillus</i> sp.	V12S1	0	0	0	0	0	0,0

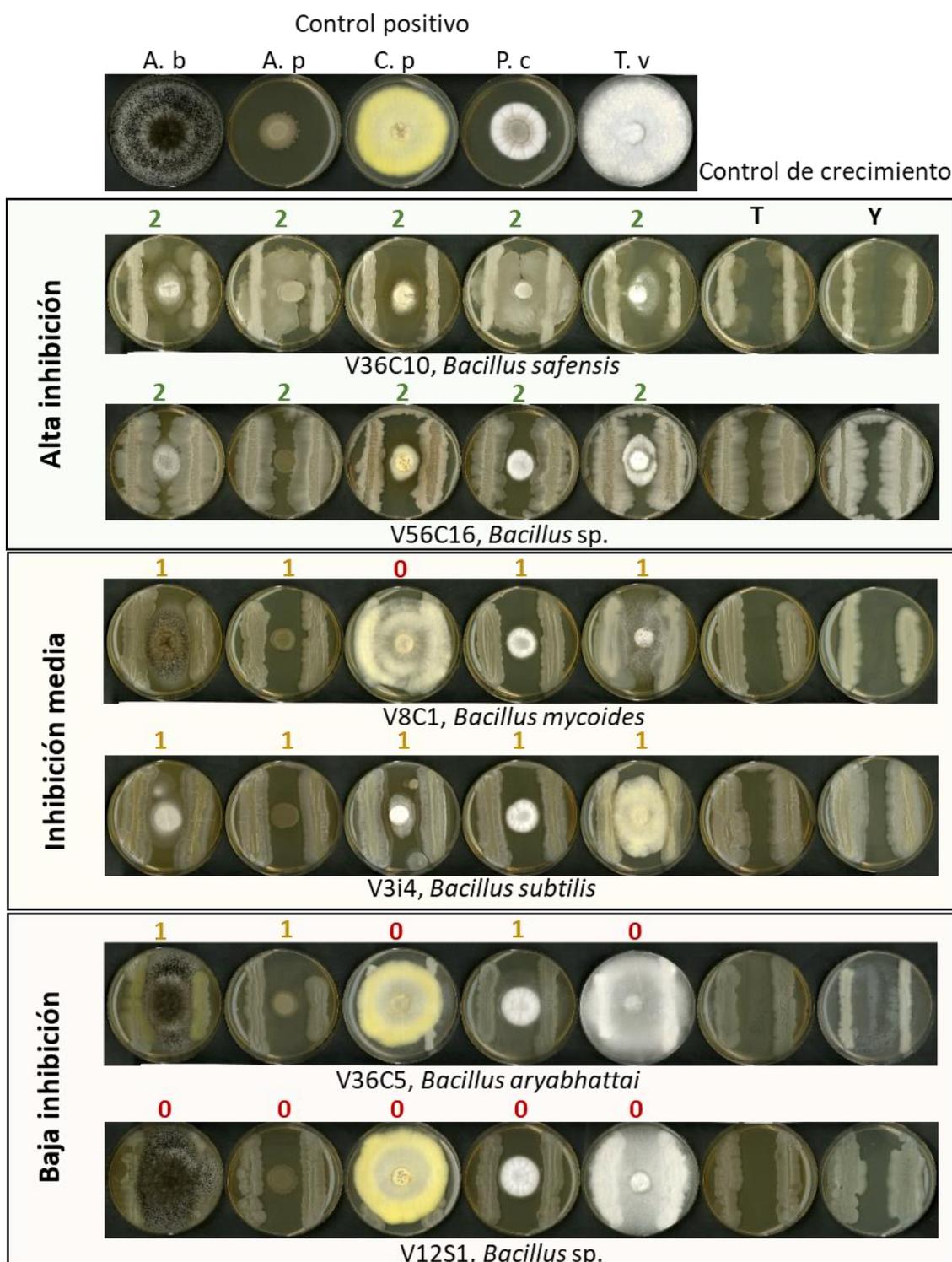


Figura 3.2.6. Análisis de la capacidad antifúngica de diferentes cepas del género *Bacillus*. Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). Se muestran las diferencias entre la capacidad de inhibición de diferentes cepas. *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Algunas de las cepas con baja capacidad inhibitoria como *B. megaterium* (V3C8) o *B. licheniformis* (V5i3) son especies con probada capacidad de inhibir el crecimiento de hongos (Mannaa y Kim, 2018; Muras *et al.*, 2021), por lo que es posible que exista una variabilidad interespecie con respecto a la producción de compuestos antifúngicos, esta variabilidad también se puede ver en el caso de *B. pumilus* (P46C7), siendo esta la única cepa identificada como *B. pumilus* sin alta capacidad inhibitoria.

Dentro de las especies analizadas existen otros ejemplos de cepas del género *Bacillus* capaces de inhibir el crecimiento fúngico por completo, como *B. safensis* (V36C10), *Bacillus* sp. (V56C16) y *Bacillus* sp. (V3C1).

A nivel biotecnológico diferentes especies dentro del género *Bacillus* han sido utilizadas por su gran capacidad de producir metabolitos secundarios incluyendo bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, lipopéptidos, policétidos y sideróforos (Fira *et al.*, 2018). Dentro de este género se pueden encontrar especies que se llevan utilizando en agricultura como insecticidas durante años, como es el caso de *B. thuringiensis*, que ha sido utilizado para controlar las plagas en diferentes cultivos gracias a la producción de  $\delta$ -endotoxinas Cry durante la esporulación (Domínguez-Arrizabalaga *et al.*, 2020). Con respecto a la actividad antifúngica numerosas especies dentro de este género han demostrado la capacidad de producir diferentes sustancias que permiten inhibir el crecimiento de los hongos. Estas sustancias pueden ser divididas entre aquellas con acción antibiótica, como lipopéptidos o bacteriocinas con probada capacidad para inhibir directamente el crecimiento de hongos fitopatológicos a través de su acción directa; o enzimas líticas, como; quitinasas, quitosanasas, glucanasas, celulasas, lipasas y proteasas, capaces de hidrolizar la pared celular de hongos y bacterias (Miljaković *et al.*, 2020). También se ha comprobado el uso de mecanismos de inhibición indirecta por parte de especies del género *Bacillus* de como secreción de sideróforos, sustancias capaces de impedir el crecimiento fúngico por captación de metales, impidiendo el uso de estos metales por parte los hongos fitopatógenos (Khan *et al.*, 2016).

Las Actinobacterias analizadas pueden dividirse en dos grupos por el número de cepas analizadas (tabla 3.2.5). El primero correspondiente al género *Streptomyces* del que se analizaron 25 cepas distintas, y el segundo, el resto de Actinobacterias aisladas de las que se analizaron 26 cepas distintas. El gran número de especies de Actinobacterias aisladas de madera en degradación, así como la conocida capacidad de estas para la producción de metabolitos secundarios fueron los motivos principales para realizar un elevado número de ensayos de antagonismo con cepas pertenecientes a este filo.

Empezando por este segundo grupo, como se puede ver en la tabla 3.2.7 se analizaron cepas de 12 géneros distintos, siendo los resultados de los bioensayos en general bajos, sin haber obtenido ninguna cepa con una capacidad de inhibición alta (media mayor que 1.5). Se pueden destacar una cepa con capacidad media-alta, *Nocardiopsis umidischolae* (V3C7) efectiva contra *A. brasiliensis* y contra *P. chrysogenum*. Este género está siendo investigado por su capacidad de producción de compuestos secundarios útiles para la industria farmacéutica

entre los que se incluyen moléculas antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas (Ibrahim *et al.*, 2018).

**Tabla 3.2.7. Bioensayos de cepas de Actinobacterias no *Streptomyces*.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagonica frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *Aspergillus brasiliensis* (A. b), *Aureobasidium pullulans* (A. p), *Penicillium chrysogenum* (P. c), *Coniophora puteana* (C. p) y *Trametes versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Nombre	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Nocardopsis umidischolae</i>	V3C7	2	1	1	2	1	1,4
<i>Arthrobacter rhombi</i>	V2C5	1	1	2	1	1	1,2
<i>Arthrobacter</i> sp.	V8C6	1	1	2	1	1	1,2
<i>Arthrobacter</i> sp.	V12C2	1	0	2	1	1	1,0
<i>Arthrobacter gandavensis</i>	V5S8	0	1	2	0	2	1,0
<i>Leucobacter alluvii</i>	V36S5	1	1	1	1	1	1,0
<i>Microbacterium oxydans</i>	V8C5	1	1	0	2	1	1,0
<i>Rhodococcus opacus</i>	C7I4	1	1	0	1	1	0,8
<i>Cellulomonas</i> sp.	C7C14	1	1	0	1	0	0,6
<i>Curtobacterium flacumfaciens</i>	V42C25	1	1	0	1	0	0,6
<i>Janibacter melonis</i>	V42C22	0	1	0	1	1	0,6
<i>Microbacterium</i> sp.	V12C5	1	1	0	1	0	0,6
<i>Rhodococcus fascians</i>	C7C6	1	1	0	0	1	0,6
<i>Arthrobacter citrius</i>	V12C7	0	1	0	0	1	0,4
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	V4C3	1	1	0	0	0	0,4
<i>Microbacterium</i> sp.	C7C3	1	0	0	1	0	0,4
<i>Mycobacterium salmoniphium</i>	P41C4	0	0	0	0	1	0,2
<i>Agromyces terreus</i>	V42I11	0	0	0	0	0	0,0
<i>Arthrobacter agilis</i>	V8C9	0	0	0	0	0	0,0
<i>Leifsonia poae</i>	C7C10	0	0	0	0	0	0,0
<i>Microbacterium oxydans</i>	V4C4	0	0	0	0	0	0,0
<i>Microbacterium</i> sp.	V3C11	0	0	0	0	0	0,0
<i>Microbacterium</i> sp.	V12C15	0	0	0	0	0	0,0
<i>Nocardiales</i> sp.	C7C9	0	0	0	0	0	0,0
<i>Nocardopsis albus</i>	V54S2	0	0	0	0	0	0,0
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	V8I7	0	0	0	0	0	0,0

Además, las cepas del género *Arthrobacter* presentaron valores de inhibición medios, con cuatro de ellos con valores entre 1 y 1,2, siendo especialmente eficaces contra *C. puteana*. Aunque el uso biotecnológico principal de los aislados de este género ha sido la descomposición de compuestos xenobióticos, como pesticidas o de compuestos aromáticos policíclicos y derivados del benceno (Gupta *et al.*, 2021), se ha comprobado la existencia de especies capaces producir de compuestos secundarios con actividades antibacterianas y antifúngicas (Ramlawi *et al.*, 2021b; 2021a).

El resto de Actinobacterias (no *Streptomyces*) probadas han obtenido resultados muy bajos, siendo muchas de las cepas incapaces de inhibir en absoluto el crecimiento de los hongos degradadores de la madera probados en este análisis.

Por último, la capacidad inhibitoria de los aislados ambientales pertenecientes al género *Streptomyces* han sido ampliamente analizados. Este género ha sido históricamente de los más importantes en lo que se refiere a la producción de antibióticos, por lo que se han analizado 25 cepas distintas, siendo de esta manera el género bacteriano con mayor número de especies analizadas en este estudio (tabla 3.2.8).

**Tabla 3.2.8. Bioensayos de cepas de *Streptomyces*.** Las cepas testadas han sido ordenadas según su capacidad antagónica frente a los hongos degradadores de la madera. El código indica la cepa, este código se corresponde a la muestra donde fue aislada. Los hongos indicadores son: *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v) y los números muestran el nivel de inhibición presentado por la cepa testada: 2 (inhibición alta), 1 (inhibición media) y 0 (inhibición baja).

Nombre	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>Streptomyces</i> sp.	C7i7	1	2	2	2	2	1,8
<i>Streptomyces fimicarius</i>	V56S1	2	2	2	2	1	1,8
<i>Streptomyces niveus</i>	V56S7	1	2	2	2	2	1,8
<i>Streptomyces</i> sp.	V5C2	1	1	2	1	2	1,4
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	V5i1	2	2	0	1	2	1,4
<i>Streptomyces</i> sp.	V5i2	0	2	2	1	2	1,4
<i>Streptomyces</i> sp.	C7C8	1	1	0	1	2	1,0
<i>Streptomyces laculatispora</i>	C7S7	1	2	0	1	1	1,0
<i>Streptomyces lavendulae</i>	V5S6	1	2	1	0	1	1,0
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C42	1	2	0	1	0	0,8
<i>Streptomyces vidacelatus</i>	V42C53	0	2	0	2	0	0,8
<i>Streptomyces argenteolus</i>	P44C9	1	2	0	0	0	0,6
<i>Streptomyces</i> sp.	V2S3	1	0	0	0	1	0,4
<i>Streptomyces griseus</i>	V3i9	1	0	0	0	1	0,4
<i>Streptomyces thinghreisii</i>	V42C55	0	1	0	0	1	0,4
<i>Streptomyces candidus</i>	V12i3	1	0	0	0	0	0,2
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	V36C4	1	0	0	0	0	0,2
<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	V3i17	0	0	0	1	0	0,2
<i>Streptomyces fractus</i>	V42C52	1	0	0	0	0	0,2
<i>Streptomyces</i> sp.	V4S1	0	0	0	0	1	0,2
<i>Streptomyces</i> sp.	V56C17	1	0	0	0	0	0,2
<i>Streptomyces</i> sp.	V17C6	0	0	0	0	0	0,0
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	V42C49	0	0	0	0	0	0,0
<i>Streptomyces</i> sp.	V5S7	0	0	0	0	0	0,0

Como en géneros anteriormente analizados se ha visto una clara diferencia entre distintas cepas bacterianas, teniendo algunas una gran capacidad inhibitoria, mientras que otras presentaban escasa actividad antifúngica. De este primer grupo cabe destacar principalmente tres aislados, *Streptomyces* sp. (C7i7), *S. fimicarius* (V56S1) y *S. niveus* (V56S7), con una

capacidad inhibitoria frente a todos los hongos marcadores, los bioensayos se muestran en la figura 3.2.7. La capacidad antifúngica de *S. niveus* ha sido demostrada por Li *et al* (2016) donde se comprobó la capacidad antifúngica de macrolactanas producidas por una cepa procedente del suelo de un bosque en el noreste de China. Además, se han visto actividades antifúngicas en cepas filogenéticamente cercanas a *S. fimicarius*. Así, el estudio de Siupka *et al* (2021) se demostraba su efectividad contra fitopatógenos como *Fusarium culmorum* DSM62188 y *Nigrospora oryzae* rose F7.

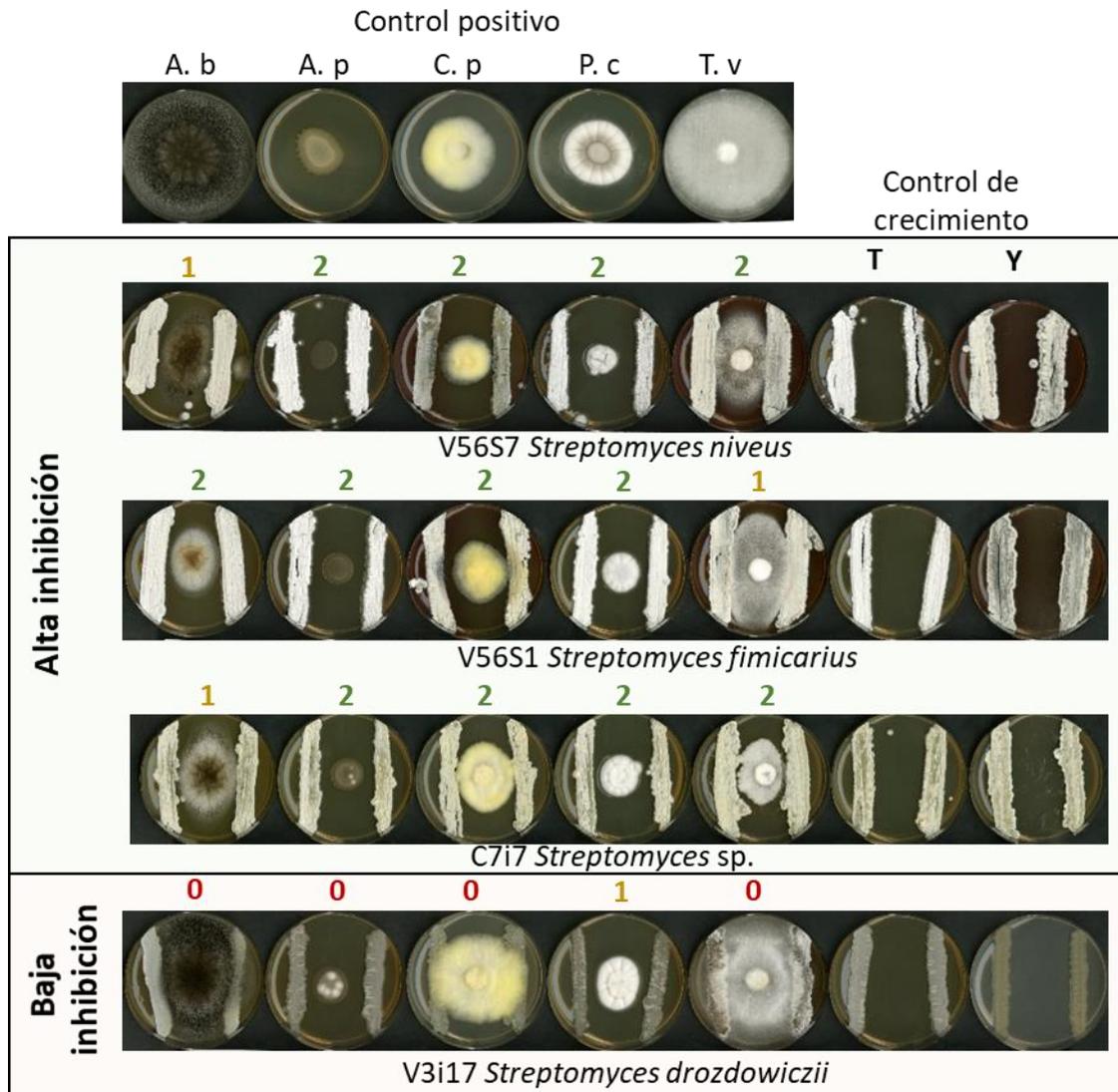
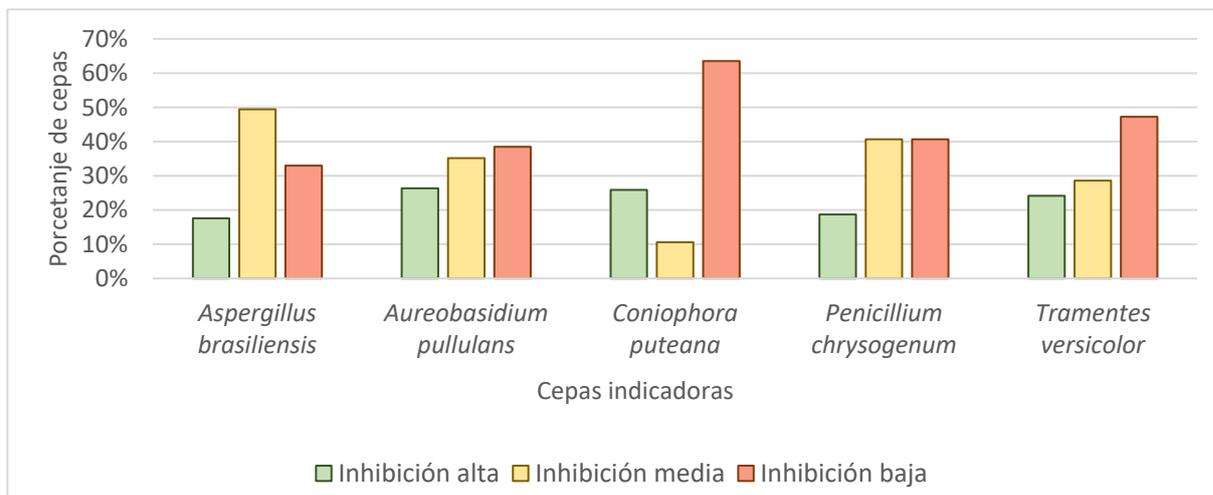


Figura 3.2.7. Ejemplos de ensayos de antagonismo realizados con cepas del género *Streptomyces*. Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Otras especies testadas que han presentado capacidad antifúngica en ensayos previos realizados por otros autores, como cepas filogenéticamente cercanas a *S. griseus* o *S. drozdowiczii*, no han demostrado actividad en este ensayo (Gebily *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). Esta diferencia entre la capacidad antifúngica en estudios diferentes puede tener varias

explicaciones, por un lado, se ha visto que la capacidad de generar compuestos antibióticos puede ser diferente en cepas filogenéticamente cercanas pero aisladas de diferentes lugares, por ejemplo, durante el trabajo realizado por Sottorf *et al.* (2019), se demuestra estas diferencias en cepas de *S. griseus* aisladas de lugares geográficamente lejanos. Esta variación en la producción de metabolitos secundarios también puede deberse a la no expresión de los genes que sintetizan estos metabolitos, es conocido que no todos los genes biosintéticos dentro de una cepa están siempre activos, y que en ocasiones existen genes que no se expresan en las condiciones de cultivo propuestas, ya sea por falta de algún nutriente o por necesitar la presencia de estímulos (Romano *et al.*, 2018). La bioprospección de diversos ambientes, junto con el estudio a nivel genético de las cepas aisladas puede dar a conocer conjuntos de genes interesantes para la producción de nuevos metabolitos secundarios, para ello es necesario la búsqueda de estos genes biosintéticos dentro del genoma de las cepas aisladas.

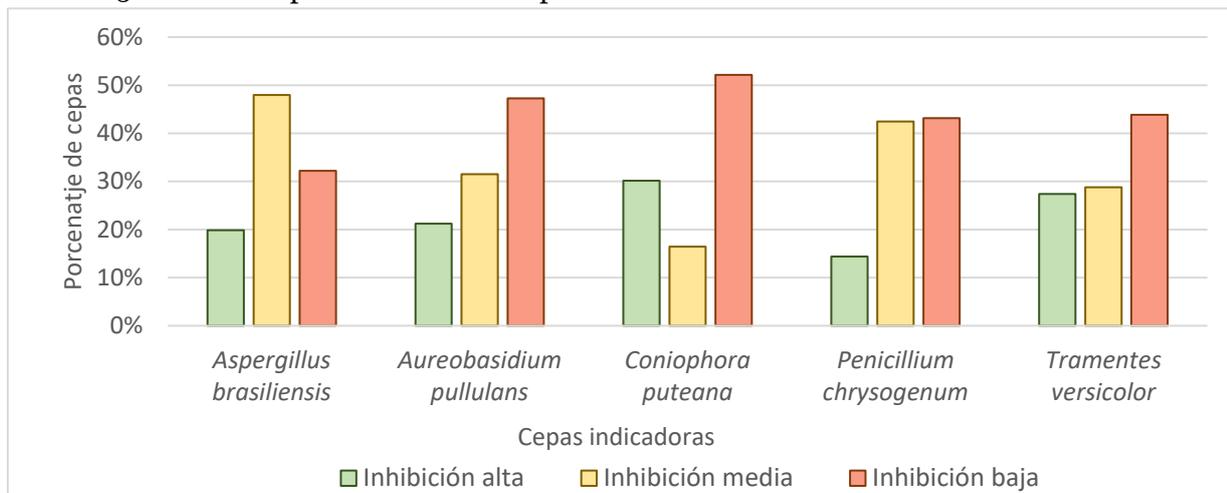
En general, la capacidad de las bacterias para la inhibición del crecimiento de los hongos de la degradación de la madera testados en este análisis ha sido desigual dependiendo de la especie de hongo al que antagonizaban, como se puede ver en la figura 3.2.8, las bacterias han sido especialmente efectivas, contra *A. pullulans*, *C. puteana* y *T. versicolor*. Por otro lado, la inhibición media del hongo *A. brasiliensis* parece bastante común en bacterias, siendo la mitad de las cepas probadas capaces de inhibirlo moderadamente. Por último, es interesante señalar la inhibición por parte de bacterias de *C. puteana*. Así, se ha visto durante los ensayos que la capacidad de inhibición de esta especie por parte de bacterias es alta o baja, no intermedia como ocurre en los demás casos.



**Figura 3.2.8. Capacidad inhibitoria de las cepas bacterianas testadas separadas por el hongo marcador.** El porcentaje de cepas que tiene capacidad antagonica alta (2 en verde), media (1 en amarillo) y baja (0 en rojo).

Como resumen, de toda la amplia gama de microorganismo testados la mayoría no han tenido una gran capacidad antagonica frente a los hongos indicadores. Siendo la mayoría de las especies, sobre todo las levaduras, incapaces de inhibir el crecimiento de los hongos. La diferente capacidad antagonica según el hongo indicador se ha visto tanto en hongos como en bacterias y se puede volver a ver en la figura 3.2.9, donde se resumen todos los ensayos

realizados. Se puede ver que el género fúngico más difícil de inhibir ha sido *C. puteana*, con más del 50% de las cepas analizadas incapaces de inhibirla.



**Figura 3.2.9. Capacidad inhibitoria de todas las cepas analizadas separadas según el hongo marcador.** El porcentaje de cepas que tiene capacidad antagónica alta (2 en verde), media (1 en amarillo) y baja (0 en rojo).

Como se puede ver en la tabla 3.2.9, la mayoría de las cepas con alta capacidad inhibitoria se agrupan en 11 géneros, donde 7 de ellos serían géneros bacterianos y dos de ellos fúngicos.

**Tabla 3.2.9. Capacidad antagónica de cepas aisladas.** La evaluación correspondería a la media de los resultados contra las 5 cepas marcadoras, siendo 0 no inhibición y 2 alta inhibición.

Capacidad antagónica	Evaluación media	Numero de cepas	Géneros
Alta	>1,5	25	<i>Bacillus, Pedobacter, Trichoderma, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Penicillium y Burkholderia</i>
Media	1,0-1,5	36	<i>Arthrobacter, Bacillus, Burkholderia, Microbacterium, Nocardiosis, Penicillium, Pseudomonas, Rhodococcus, Stenotrophomonas, Streptomyces y Trichoderma</i>
Baja	<1,0	85	<i>Agromyces, Alternaria, Arthrobacter, Bacillus, Burkholderia, Candida, Cellulomonas, Cladosporium, Clonostachys, Coniochaeta, Curtobacterium, Debaryomyces, Filobasidium, Janibacter, Lecytophora, Leifsonia, Leucobacter, Microbacterium, Mycobacterium, Neobulgaria, Nocardiales, Nocardiosis, Penicillium, Pseudomonas, Rhodococcus, Rhodotorula, Scheffersomyces, Streptomyces, Tremella, Trichoderma, Trichosporon y Tromeropsis</i>

Las cepas fúngicas con alta capacidad inhibitoria se agrupan en los géneros *Penicillium* y *Trichoderma*, siendo esos géneros los más frecuentemente aislados en las muestras de madera en degradación durante este estudio, entre ellas se pueden señalar algunas cepas por su alta capacidad antifúngica: *T. citrinoviride* (C7C15), *T. gamsii* (V5C7), *T. koningii* (P44C12), *Trichoderma* sp. (P42S2), *P. crustosum* (V42C65), *P. steckii* (V8C14) y *P. expansum* (V8C64).

Dentro de los aislamientos bacterianos destacarían por su capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos degradadores de la madera cepas como: *Pseudomonas* sp. (V49S4), *P. trivialis* (P41S1), *B. safensis* (V36C10), *Bacillus* sp. (V56C16), *B. pumilus* aislado de diferentes lugares [P48C1 (Noruega), V17C11 (España) y E2i1 (Eslovaquia)], *Streptomyces* sp. (C7i7), *S. fimicarius* (V56S1) y *S. niveus* (V56S7).

### 3.2.3. Análisis de presencia de PKS y NRPS en Actinobacteria

La clase bacteriana Actinobacteria representa el mayor grupo dentro de los Procariotas. En ella se incluyen a bacterias Gram +, que se distinguen por su alto contenido en G+C dentro del genoma y una morfología variable. Esta clase agrupa 5 subclases, 10 órdenes, 56 familias, & 286 géneros (Mohammadipanah & Wink, 2016).

Las Actinobacterias han sido la clase más utilizada para la producción de metabolitos secundarios, habiéndose descubierto dentro de ella alrededor de 10.000 moléculas bioactivas de las 23.000 encontradas en microorganismos (Demain, 2014). Además, ha sido la clase bacteriana más aislada en las muestras de madera en degradación dentro de este trabajo con 99 cepas (33% de las cepas bacterianas aisladas). Se ha testado la presencia de agrupaciones génicas relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios en 79 cepas diferentes que se agrupan en 21 géneros (tabla 3.2.10).

El motivo principal de esta búsqueda dirigida especialmente a esta clase se debe a la gran capacidad biosintética que presenta. Dentro de esta clase, el género *Streptomyces* ha sido la fuente del 45% de los metabolitos procedentes de bacterias o del 17% de los metabolitos secundarios conocidos (Laskaris & Karagouni, 2021), y además, ha sido el segundo género bacteriano con más especies aisladas de madera en degradación durante este estudio.

Para una parte de la producción de moléculas bioactivas se requieren grandes grupos enzimáticos como las sintetasas de péptidos no ribosomales [*Non-ribosomal peptide synthetase* (NRPS)] o las policétido sintetasas [*polyketide synthase* (PKS)], la presencia de estos grandes grupos enzimáticos en una cepa de Actinobacteria está relacionada con su potencial biosintético (Amin *et al.*, 2020). Estas agrupaciones génicas pueden dividirse según sea el complejo enzimático que generan, siendo de esta manera agrupadas en: PKS de tipo I (PKS I), PKS de tipo II (PKS II) y NRPS.

La presencia de estas agrupaciones génicas se comprobó a través PCR en 79 especies de Actinobacterias aisladas de madera en degradación. Para ello, se seleccionó unos cebadores

que amplificaban regiones conservadas de los genes que codifican para distintas PKSs I, PKSs II y NRPSs dentro de las Actinobacterias representados en la figura 3.2.10.

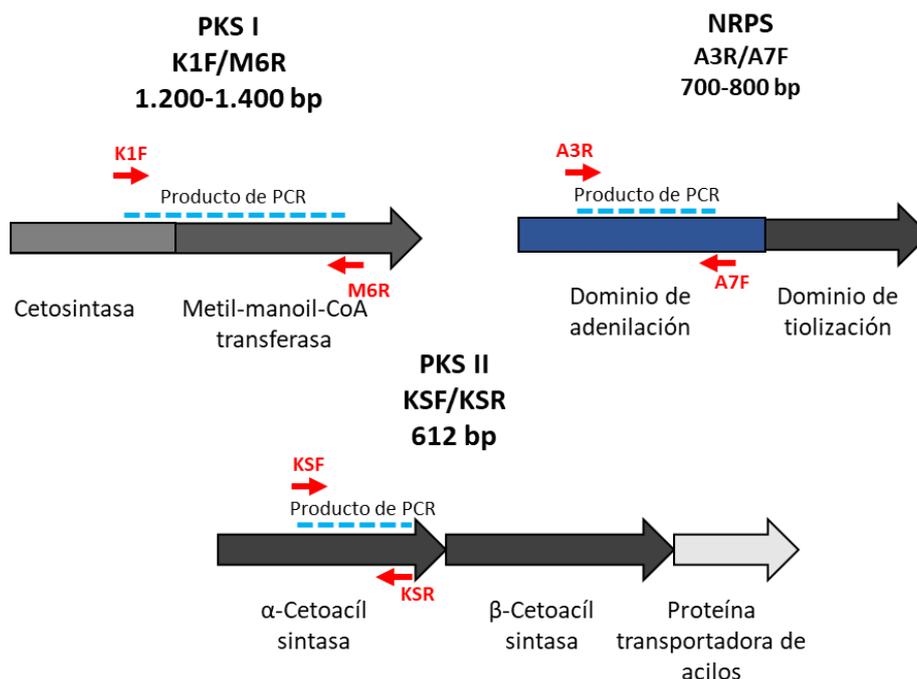
**Tabla 3.2. 10. Resumen de cepas de Actinobacterias testadas para presencia de genes biosintéticos.**

Clase	Orden	Familia	Género	N.º cepas
Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Leucobacter</i>	1
		Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	6
			<i>Kocuria</i>	1
			<i>Micrococcus</i>	4
		Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>	1
	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	1
		Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	8
		Williamsiaceae	<i>Williamsia</i>	2
	Micrococcales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	2
		Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	1
			<i>Oerskovia</i>	2
			<i>Sediminihabitans</i>	1
		Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium</i>	1
		Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i>	1
		Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	3
			<i>Curtobacterium</i>	4
			<i>Microbacterium</i>	6
			<i>Leifsonia</i>	1
	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>	1	
	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides</i>	2
Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	30	

Para amplificar las distintas PKS I de Actinobacterias se eligieron unos cebadores degenerados capaces de amplificar distintos PKS I dentro de las Actinobacterias, concretamente estos cebadores fueron diseñados para la amplificación de una región común en los genes involucrados en la síntesis de 11 compuestos bioactivos, con actividad antifúngica, antibacteriana, antihelmíntica, *etc.* Como son: rapamicina, rifamicina, avermectina, eritromicina, oleandomicina, niddamicina, picromicina, FK506, FK520, nistatina y pimamicina (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005).

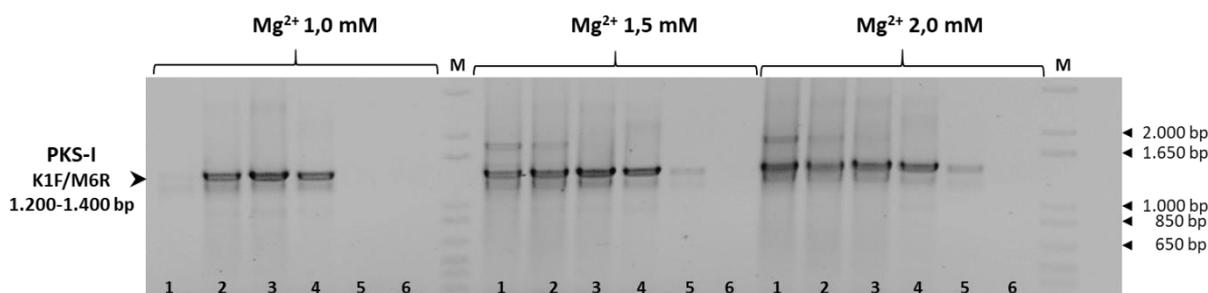
En el caso de las PKS II, los cebadores degenerados que se eligieron para la amplificación de la PKS mínima, el complejo enzimático responsable de la formación de la cadena policética, ya que están muy conservados en el género *Streptomyces* (Metsä-Ketelä *et al.*, 1999).

Por último, para la amplificación de distintas NRPS se eligieron unos cebadores degenerados que amplificaban una región conservada en un dominio de adenilación de NRPS involucradas en la síntesis de antibióticos como cefamicina, vancomicina, balhimicina, actonomicina, pristinamicina y cloroeremomicina (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005).



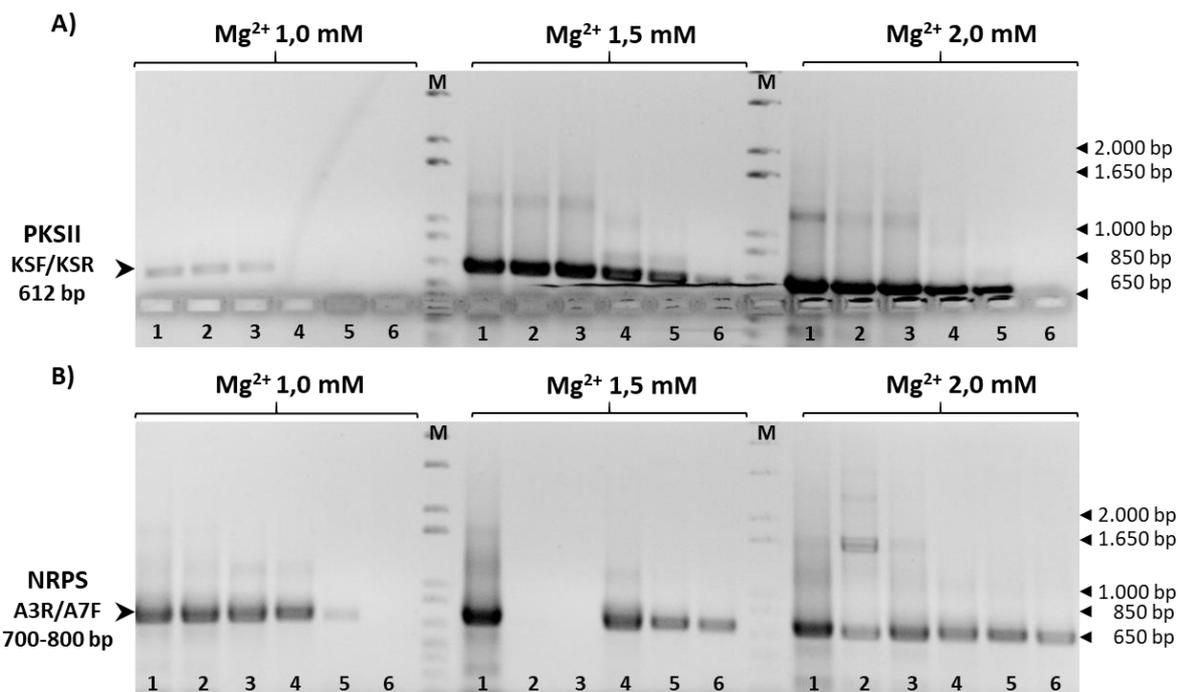
**Figura 3.2.10. Representación gráfica de los productos de PCR generados por los cebadores usados.** La unión a regiones conservadas, junto con la degeneración de los cebadores hacen que puedan amplificar genes biosintéticos en distintas especies de Actinobacterias (Modificado de Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005 y Metsä-Ketelä *et al.*, 1999).

El primer paso para la detección de los genes biosintéticos dentro de las Actinobacterias fue la puesta a punto de las condiciones de análisis con los cebadores elegidos. Para ello, partiendo de las condiciones descritas en la bibliografía se varió la temperatura de anillamiento entre los 50 °C y los 70 °C, y se modificó la concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) entre 1,0 mM, 1,5 mM y 2,0 mM. Además, se añadió 5 % de dimetil sulfoxido (DMSO) para una correcta separación de ambas cadenas de ADN.



**Figura 3.2.11. Puesta a punto de condiciones de PCR con el cebador K1F/M6R para la detección de PKS I en Actinobacterias.** Se modificaron las temperaturas de anillamiento desde 50 °C a 70 °C: 1 (50,6 °C), 2 (54,0 °C), 3 (58,8 °C), 4 (63,6 °C), 5 (68,1 °C) y 6 (70,0 °C). Se ajustó la concentración de  $MgCl_2$  entre 1,0 mM y 2,0 mM. M: marcador de peso molecular [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

La puesta a punto se realizó en las tres parejas de cebadores elegidos para la detección de los genes biosintéticos (figura 3.2.11 y 3.2.12), dando como resultado una temperatura óptima de anillamiento de las tres parejas de cebadores de **62 °C**, y una concentración óptima de  $Mg^{2+}$  de **1,5 mM** en el caso de la detección de PKS I, y de **2,0 mM** en el caso de PKS II y NRPS.



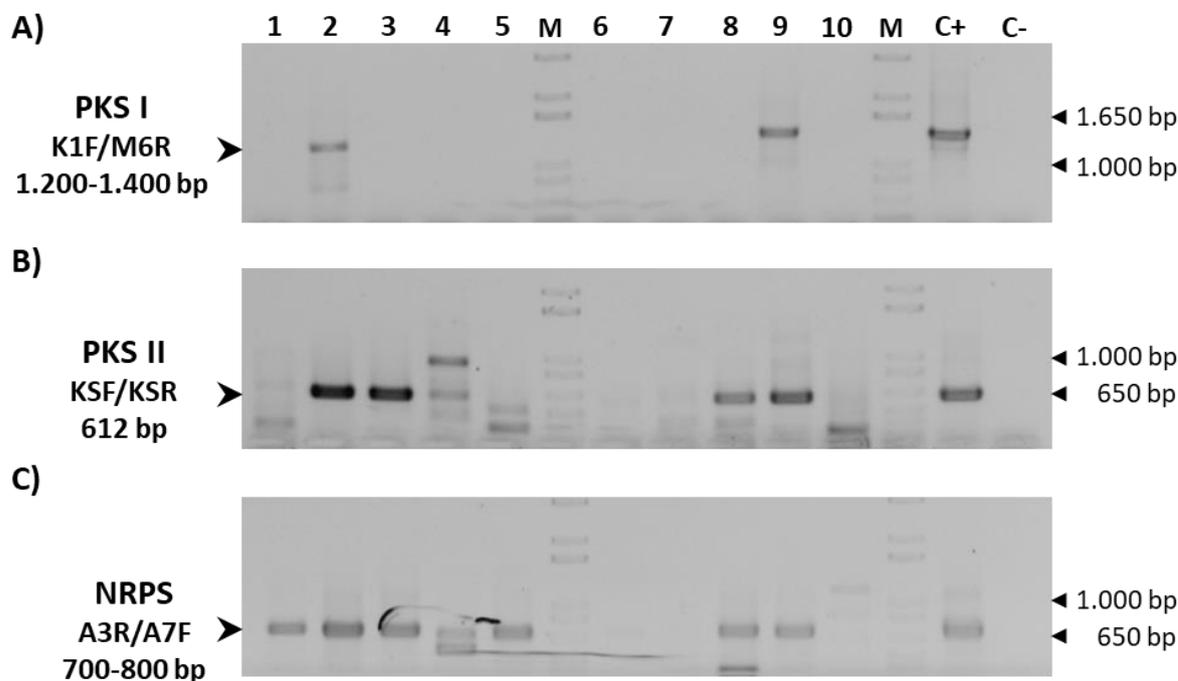
**Figura 3.2.12. Puesta a punto de las condiciones de PCR con los cebadores KSF/KSR y A3R/A7F para la detección de PKS II y NRPS en Actinobacterias.** Se modificaron las temperaturas de anillamiento desde 50 °C a 70 °C: 1 (50,6 °C), 2 (54,0 °C), 3(58,8 °C), 4 (63,6 °C), 5 (68,1 °C) y 6 (70,0 °C). Se ajustó la concentración de MgCl<sub>2</sub> entre 1,0 mM y 2,0 mM. **A)** Se representa la puesta a punto de los cebadores KSF/KSR para la detección de PKS II. **B)** Se representa la puesta a punto de los cebadores A3F/A7F para la detección de NRPS. En la parte izquierda, nombre de la clase de gen que se busca, nombre de los cebadores y tamaño de banda deseado. En la parte derecha, masas moleculares según el marcador de referencia (**M**), [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

Otros parámetros definidos fueron: **i)** la temperatura de desnaturalización, se fijó en 98 °C durante 5 min debido el gran porcentaje de G+C en los genomas de Actinobacterias, y **ii)** el tiempo de extensión se ajustó a 1,30 min a causa de la velocidad de extensión de la ADN polimerasa usada, *Go Taq<sup>®</sup> polymerase* (Promega) y el tamaño promedio de los amplicones buscados (entre 600-1.400 pares de bases). Todo esto genero el programa de PCR que se puede ver en la tabla 3.2.11.

**Tabla 3.2.11. Condiciones de amplificación para la detección de PKS I, PKS II y NRPS en Actinobacterias.**

<b>Desnaturalización inicial</b>		98 °C	1 ciclo
		5 minutos	
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	98 °C	35 ciclos
		30 segundos	
	Anillamiento	62 °C	
		30 segundos	
	Extensión	72 °C	1,30 minutos
		1,30 minutos	
<b>Extensión final</b>		72 °C	1 ciclo
		10 minutos	

Una vez los cebadores han sido optimizados se testaron 79 cepas de Actinobacterias para la presencia de los citados genes biosintéticos. Para ello, se extrajo y cuantifico el ADN genómico de los aislados.



**Figura 3.2.13. Ejemplo de cribado de genes biosintéticos PKS I, PKS II y NRPS en Actinobacterias.** Los tres paneles representan las amplificaciones por PCR del ADN genómico de las cepas aisladas. **A)** Análisis de presencia de PKS I. **B)** Análisis de presencia de PKS II. **C)** Análisis de presencia de NRPS. En la parte superior, se indica el número que representa la cepa: **1** *Arthrobacter* sp. (V12C2), **2** *S. kanamyceticus*. (V5i1), **3** *Streptomyces* sp. (V56C17), **4** *L. alluvii* (V36S5), **5** *S. flavogriseus* (V36C4), **6** *R. globerulus* (V2i2), **7** *A. r rhombi* (V2C5), **8** *Streptomyces* sp. (V5i2), **9** *Streptomyces* sp. (V2S3) y **10** *Microbacterium* sp. (V12C5). En la parte izquierda, aparece el nombre de la clase de gen que se busca, nombre de los cebadores y tamaño de banda esperado. En la parte derecha, se incluyen las masas moleculares según el marcador de referencia (**M**), *1Kb plus DNA ladder*. Control positivo (*S. tsukubaensis*) (**C+**) y control negativo (agua)(**C-**).

Aquellas cepas que presentaban banda en el tamaño esperado se determinaron como positivas a la presencia de los genes biosintéticos como se puede ver en la figura 3.2.13. Los resultados de todas las cepas se resumen en la tabla 3.2.12.

**Tabla 3.2.12. Resultados de la amplificación de genes biosintéticos en Actinobacterias aisladas de madera en degradación.** Se indica la especie, el código de la cepa y la amplificación (+) o no amplificación (-) de los genes biosintéticos testados.

Especie	Código (cepa)	Genes biosintéticos		
		PKS I	PKS II	NRPS
<i>Agromyces</i> sp.	V3C5	-	-	-
<i>Agromyces terreus</i>	V42i11	-	+	+
<i>Agromyces terreus</i>	V42i12	-	-	+
<i>Arthrobacter agilis</i>	V8C9	-	+	+
<i>Arthrobacter agilis</i>	V12i11	-	+	+
<i>Arthrobacter citreus</i>	V12C7	-	+	+

Especie	Código (cepa)	Genes biosintéticos		
		PKS I	PKS II	NRPS
<i>Arthrobacter rhombi</i>	V2C5	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp.	V12C2	-	+	+
<i>Arthrobacter aurescen</i>	V8C6	-	+	-
<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>	V2i6	-	-	-
<i>Brevibacterium</i> sp.	C7i1	-	-	-
<i>Brevibacterium</i> sp.	V42C46	-	+	-
<i>Cellulomonas</i> sp.	C7C14	-	+	+
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	V42C25	-	+	+
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	V2C4	-	+	+
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	V4C13	-	-	-
<i>Curtobacterium</i> sp.	V3C6	-	-	+
<i>Janibacter melonis</i>	V42C22	-	+	+
<i>Kocuria rhizophila</i>	V13S1	-	-	-
<i>Leifsonia poae</i>	C7C10	-	+	+
<i>Leucobacter alluvii</i>	V36S5	-	+	+
<i>Microbacterium oxydans</i>	V4C4	-	-	-
<i>Microbacterium oxydans</i>	V8C5	-	+	+
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	V4C3	-	-	-
<i>Microbacterium</i> sp.	V3C11	-	+	+
<i>Microbacterium</i> sp.	C7C3	-	+	+
<i>Microbacterium</i> sp.	V12C5	-	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	V12i9	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	V5i4	-	-	+
<i>Micrococcus luteus</i>	V4i7	-	-	+
<i>Micrococcus terreus</i>	V12C4	-	+	-
<i>Mycobacteroides salmoniphilum</i>	P41C4	-	+	+
<i>Nocardioides albus</i>	V56S2	-	-	-
<i>Nocardioides</i> sp.	C7C9	-	+	+
<i>Nocardioopsis umidischolae</i>	V3C7	-	-	-
<i>Oerskovia enterophila</i>	V3i1	-	-	-
<i>Oerskovia paurometabola</i>	V3i13	-	-	-
<i>Promicromonospora</i> sp.	V56C15	-	-	-
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	V8i7	-	-	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	C7S1	-	-	+
<i>Rhodococcus fascians</i>	C7C6	-	+	+
<i>Rhodococcus fascians</i>	P44C2	-	-	+
<i>Rhodococcus globerulus</i>	V2i2	-	-	-
<i>Rhodococcus globerulus</i>	V2S4	-	+	+
<i>Rhodococcus opacus</i>	C7i4	+	-	+
<i>Rhodococcus</i> sp.	V12C3	-	-	+
<i>Sediminihabitans luteus</i>	V3C22	-	+	-
<i>Streptomyces argenteolus</i>	P44C9	-	+	-
<i>Streptomyces candidus</i>	V12i3	+	+	+
<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	V3i17	+	+	+

Especie	Código (cepa)	Genes biosintéticos		
		PKS I	PKS II	NRPS
<i>Streptomyces fimicarius</i>	V56S1	-	+	+
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	V36C4	-	+	+
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	V1i7	+	+	+
<i>Streptomyces fractus</i>	V42C52	-	+	+
<i>Streptomyces griseus</i>	V3i9	-	+	+
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	V42C49	-	-	-
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	V5i1	+	+	+
<i>Streptomyces laculatispora</i>	C7S7	+	+	+
<i>Streptomyces lavendulae</i>	V5S6	-	-	+
<i>Streptomyces lavendulae</i>	V56C10	-	-	-
<i>Streptomyces niveus</i>	V56S7	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V17C6	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V5S7	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V56C17	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V2S3	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C42	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	C7C8	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V5i2	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V5C2	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp.	C7i7	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V12S5	-	-	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C43	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C48	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C50	-	+	-
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C51	-	+	+
<i>Streptomyces thinghirensis</i>	V42C55	+	+	+
<i>Streptomyces lividans</i>	V42C53	-	+	+
<i>Williamsia muralis</i>	V12C9	-	-	+
<i>Williamsia</i> sp.	C7C13	-	-	+

En términos generales como se puede ver en la tabla 3.2.12, las agrupaciones de genes biosintéticos más comunes en las Actinobacterias aisladas de madera fueron las NRPS, presentes en 55 cepas (69,6%), seguidas por las PKS II, presentes en 48 cepas (60,8%) y por último las PKS I, presentes únicamente en 10 aislados (12,7%).

Varias Actinobacterias aisladas presentan múltiples agrupaciones génicas. Así, 43 cepas (54,4%) presentan, al menos, 2 de las agrupaciones génicas buscadas. Siendo la presencia de PKS II y NRPS la más común (32 cepas, 40,5%). La detección de PKS I siempre está acompañada de la presencia de alguna otra agrupación génica. La PKS II se observa en 9 cepas (11,3%), y la NRPS en todas las cepas que presentan PKS I. Las tres agrupaciones génicas se han detectado únicamente en una misma cepa en 9 aislados (11,3%).

Por último, utilizando los resultados del análisis de capacidad antifúngica en Actinobacterias aisladas de madera en degradación, se evaluó si la presencia de más de una agrupación génica era indicativa de altos niveles de antagonismo, como se puede ver en la tabla 3.2.13.

**Tabla 3.2.13. Tabla combinada de resultados de amplificación de genes biosintéticos y bioensayos realizados en Actinobacterias.** Se indica la especie, el código de la cepa y la amplificación (+) o no amplificación (-) de los genes biosintéticos testados. Ordenada según capacidad antagónica frente a hongos degradadores de madera.

Especie	Codigo (cepa)	Genes biosintéticos			Bioensayo
		PKS I	PKS II	NRPS	
<i>Streptomyces fimicarius</i>	V56S1	-	+	+	1,8
<i>Streptomyces niveus</i>	V56S7	+	+	+	1,8
<i>Streptomyces</i> sp.	C7i7	-	+	+	1,8
<i>Nocardiopsis umidischolae</i>	V3C7	-	-	-	1,4
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	V5i1	+	+	+	1,4
<i>Streptomyces</i> sp.	V5i2	-	+	+	1,4
<i>Streptomyces</i> sp.	V5C2	-	-	-	1,4
<i>Microbacterium oxydans</i>	V8C5	-	+	+	1,3
<i>Cellulomonas</i> sp.	C7C14	-	+	+	1,2
<i>Arthrobacter rhombi</i>	V2C5	-	-	-	1,2
<i>Arthrobacter aurescen</i>	V8C6	-	+	-	1,2
<i>Rhodococcus globerulus</i>	V2i2	-	-	-	1,2
<i>Microbacterium</i> sp.	V12C5	-	+	+	1,1
<i>Leucobacter alluvii</i>	V36S5	-	+	+	1,1
<i>Arthrobacter</i> sp.	V12C2	-	+	+	1,0
<i>Rhodococcus opacus</i>	C7i4	+	-	+	1,0
<i>Streptomyces laculatispora</i>	C7S7	+	+	+	1,0
<i>Streptomyces lavendulae</i>	V5S6	-	-	+	1,0
<i>Streptomyces</i> sp.	C7C8	+	+	+	1,0
<i>Streptomyces</i> sp.	V42C42	-	+	+	0,8
<i>Streptomyces lividans</i>	V42C53	-	+	+	0,8
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	V42C25	-	+	+	0,8
<i>Janibacter melonis</i>	V42C22	-	+	+	0,8
<i>Rhodococcus fascians</i>	C7C6	-	+	+	0,8
<i>Streptomyces argenteolus</i>	P44C9	-	+	-	0,6
<i>Arthrobacter citreus</i>	V12C7	-	+	+	0,4
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	V4C3	-	-	-	0,4
<i>Microbacterium</i> sp.	C7C3	-	+	+	0,4
<i>Streptomyces griseus</i>	V3i9	-	+	+	0,4
<i>Streptomyces</i> sp.	V2S3	+	+	+	0,4
<i>Streptomyces thinghirensis</i>	V42C55	+	+	+	0,4
<i>Mycobacteroides salmoniphilum</i>	P41C4	-	+	+	0,2
<i>Streptomyces candidus</i>	V12i3	+	+	+	0,2
<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	V3i17	+	+	+	0,2
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	V36C4	-	+	+	0,2
<i>Streptomyces fractus</i>	V42C52	-	+	+	0,2

Especie	Codigo (cepa)	Genes biosintéticos			Bioensayo
		PKS I	PKS II	NRPS	
<i>Streptomyces</i> sp.	V56C17	-	+	+	0,2
<i>Agromyces terreus</i>	V42i11	-	+	+	0,0
<i>Arthrobacter agilis</i>	V8C9	-	+	+	0,0
<i>Leifsonia poae</i>	C7C10	-	+	+	0,0
<i>Microbacterium oxydans</i>	V4C4	-	-	-	0,0
<i>Microbacterium</i> sp.	V3C11	-	+	+	0,0
<i>Nocardioides</i> sp.	C7C9	-	+	+	0,0
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	V8i7	-	-	+	0,0
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	V42C49	-	-	-	0,0
<i>Streptomyces</i> sp.	V17C6	-	+	+	0,0
<i>Streptomyces</i> sp.	V5S7	-	+	+	0,0

La mayoría de las cepas testadas con presencia de dos o tres agrupaciones génicas no presentan unos niveles altos de antagonismo frente a las especies fúngicas seleccionadas. Esto puede deberse a varios motivos: **i)** la presencia de agrupaciones génicas no evidencia que la acción del compuesto secundario que se genere sea antifúngica o que vaya dirigida a este tipo de hongos en concreto, **ii)** estos metabolitos secundarios podrían tener otros efectos, por lo que sería necesario un cribado de otro tipo de funcionalidades como antibacteriana, citotóxica o antiparasitaria, y **iii)** estas agrupaciones génicas pueden ser crípticas, necesitando estímulos o condiciones especiales para su síntesis (Onaka, 2017). Por ello, sería recomendable el estudio en detalle de las cepas con varias agrupaciones génicas, para comprobar los metabolitos secundarios que son capaces de generar lo que abre la posibilidad a la detección de nuevas moléculas antibióticas.

### 3.2.4. Análisis de presencia de PKS y NRPS en *Penicillium*

El género *Penicillium* agrupa 483 especies de hongos filamentosos, que han estado vinculados a los seres humanos de muchas maneras. Por una parte, puede ser responsable de situaciones perjudiciales como el deterioro de alimentos, la producción de micotoxinas, su acción como alérgeno de interiores y hasta su papel como patógeno humano. Pero, por otra parte, se ha utilizado de maneras beneficiosas como son la producción de alimentos, energía, enzimas y productos biofarmacéuticos (Houbraken *et al.*, 2020).

Como en el caso de las Actinobacterias, la producción de compuestos fúngicos, en los cuales se incluyen compuestos antibióticos, anticancerígenos, inmunosupresores y hasta tratamientos para la hipercolesterolemia están mediados en muchos casos por grandes agrupaciones enzimáticas, las policétido sintasas (PKS) y las sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Assaf *et al.*, 2020).

Las PKS de hongos se agrupan mayoritariamente en las denominadas PKS I, enzimas multidominio que en el caso de los hongos trabajan de forma iterativa y donde los dominios

catalíticos se usan repetitivamente en un orden específico programado por la proteína (Schmitt *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, dentro de estas PKS I existen diferentes formas.

- PKS no reductoras (NR-PKS): Se suelen denominar de tipo WA (wA-PKS) (Mayorga & Timberlake, 1992).
- PKS altamente reductoras (HR-PKS): Suelen servir como precursores de toxinas como lovastatina y T-toxina (Scott *et al.*, 2003).
- PKS parcialmente reductoras (P-PKS). También son conocidas como MSAS-PKS (Beck *et al.*, 1990).

La utilización de dos parejas de cebadores para la amplificación de un mismo tipo de PKS parcialmente reducidos, se debe a las diferencias encontradas en estudios anteriores, donde en algunos dan relevancia a la pareja de cebadores de la serie KA (KAF2F/KAR1R), mostrando que fue capaz de amplificar más PKS en hongos procedentes de insectos (Alongkorn *et al.*, 2009), mientras que otros estudios ni la mencionan, utilizando únicamente los cebadores de la serie LC (LC3F/LC5R) (Lee *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2018).

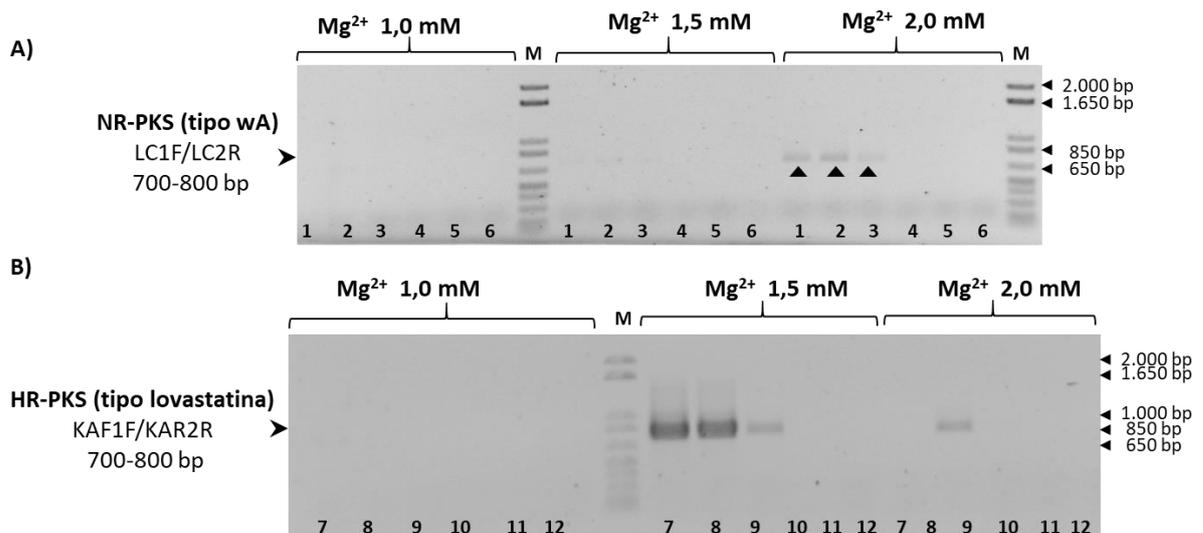
Dos de las parejas de cebadores se dirigen al dominio quetosintasa (KE), ya que es reconocido como el más conservado. La amplificación por medio de estos cebadores (LC3F/LC5R y LC1F/LC2R), denominados serie LC, permite la diferenciación entre PKS parcialmente reductoras (MSAS-PKS) y PKS no reductores (wA-PKS) respectivamente (Bingle *et al.*, 1999).

La segunda pareja de cebadores, que se denominaron serie KA, amplifica la unión entre un dominio quetosintasa (KE) y uno acetil transferasa (AT). Estas parejas de cebadores (KAF1F/KAR2R y KAF2F/KAR1R) permiten la diferenciación entre PKS reductoras y PKS parcialmente reductoras respectivamente (MSAS-PKS) (Amnuaykanjanasin *et al.*, 2005). Por otro lado, las NRPS fúngicas están formadas por cadenas proteicas unidas formando un gran polipéptido, que normalmente está codificado por un único gen. Estas NRPS fúngicas están compuestas por una disposición similar a una línea de ensamblaje de módulos multidominio biosintéticos, cada uno de los cuales es responsable de la adición de un aminoácido (u otra unidad biosintética) a la secuencia del péptido producido.

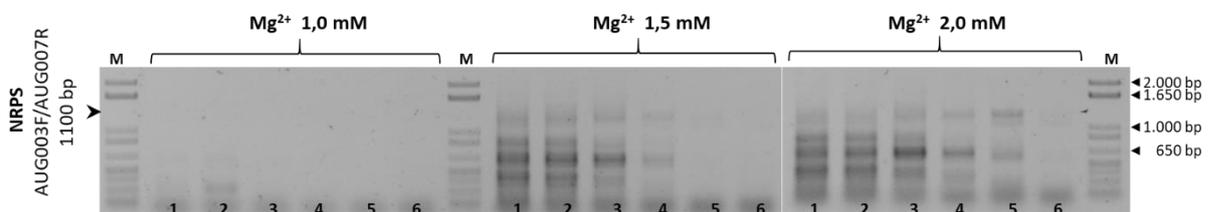
Para la amplificación de los NRPS fúngicos se escogió una pareja de cebadores que amplifican una región muy conservada dentro de los hongos, entre un dominio de adenilación y un dominio de tiolización (AUG003F/AUG007R) (Slightom *et al.*, 2009).

Todos estos cebadores habían sido utilizados con anterioridad en la búsqueda de PKS y NRPS en hongos de diferentes orígenes, como en esponjas marinas, insectos, fondo marino, nematodos y peonías (Alongkorn *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2011).

Como en el caso de las Actinobacterias, el primer paso fue la puesta a punto de las condiciones de análisis de los cebadores elegidos. A los que se les ajustó la temperatura de anillamiento y la concentración de Mg<sup>2+</sup>. En las figuras 3.2.14 y 3.2.15 se puede ver las condiciones probadas en tres de las cinco parejas de cebadores utilizados.



**Figura 3.2.14. Puesta a punto de las condiciones de análisis de los cebadores para la detección de PKS en *Penicillium*.** Se analizaron las temperaturas de anillamiento para LC1F/LC2R desde 45 °C a 65 °C: 1 (45,0 °C), 2 (46,9 °C), 3 (51,4 °C), 4 (56,2 °C), 5 (61,0 °C) y 6 (64,4°C). y para KAF1F/KAR2R desde 45°C a 70 °C: 7 (50,6 °C), 8 (54,0 °C), 9 (58,8 °C), 10 (63,6 °C), 11 (68,1 °C) y 12 (70,0 °C). Se ajustó la concentración de MgCl<sub>2</sub> entre 1,0 mM y 2,0 mM. A) Análisis de las condiciones para la serie LC con la pareja de cebadores LC1F/LC2R, Las puntas de flechas negras indican las bandas. B) Análisis de las condiciones para la serie KS con la pareja de cebadores KAF1F/KAR2R. En la parte izquierda, nombre de la clase de gen que se busca, nombre de los cebadores y tamaño de banda esperado. En la parte derecha, masas moleculares según el marcador de referencia (M) [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].



**Figura 3.2.15. Puesta a punto de las condiciones de análisis de los cebadores para la detección de NRPS en *Penicillium* con los cebadores AUG003F/AUG007R.** Se analizaron las temperaturas de anillamiento desde 45 °C a 60 °C: 1 (45,0 °C), 2 (46,4 °C), 3 (49,8 °C), 4 (53,4 °C), 5 (57,0 °C) y 6 (59,5 °C). Se ajustó la concentración de MgCl<sub>2</sub> entre 1,0 mM y 2,0 mM. En la parte izquierda, nombre de la clase de gen que se busca, nombre de los cebadores y tamaño de banda esperado. En la parte derecha, masas moleculares según el marcador de referencia (M) [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

Las temperaturas de anillamiento fueron: **50 °C** para LC3F/LC5R, LC1F/LC2R y KAF1F/KAR2R, **45 °C** para KAF2F/KAR1R y de **57 °C** para AUG003F/AUG007R. La concentración de Mg<sup>2+</sup> se fijó a **2,0 mM** en todos los casos menos en la pareja KAF1F/KAR2R que se seleccionó en **1,5 mM**.

En el caso de los hongos no fue necesaria la adición de DMSO para realizar la PCR. Otras condiciones que se ajustaron fueron:

- i) Temperatura de desnaturalización: Se fijó en 98 °C durante 55 minutos.

ii) Tiempo de extensión: Se ajusto a 2,0 min por la velocidad de extensión de la ADN polimerasa usada [Go Taq® polymerase (Promega)].

Todo esto genero el programa de PCR que se puede ver en la tabla 3.2.16.

**Tabla 3.2.16. Condiciones de amplificación para la detección de PKS I, PKS II y NRPS en *Penicillium*.**

<b>Desnaturalización inicial</b>		98 °C	1 ciclo
		5 minutos	
<b>Amplificación</b>	Desnaturalización	98 °C 30 segundos	35 ciclos
	Anillamiento	50 °C/45 °C/57 °C 30 segundos	
	Extensión	72 °C 2 minutos	
<b>Extensión final</b>		72 °C 10 minutos	1 ciclo

Con todo ello se realizó el análisis de genes biosintéticos para PKS y NRPS en 36 cepas distintas de *Penicillium* aisladas de madera en degradación, en la figura 3.2.16 se puede ver un ejemplo de 11 de ellas y en la tabla 3.2.15 se resumen los resultados obtenidos.

El análisis general indica la presencia de alguna de las agrupaciones génicas en casi todas las cepas testadas, únicamente 6 cepas (16,7%) no han presentado ninguna. La agrupación génica más común han sido las PKS altamente reductoras (HR-PKS), observadas en 29 cepas (80,6%), la segunda han sido las PKS no reductoras (N-PKS), que se han encontrado en 19 cepas (52,8%).

Los cebadores de la serie LC han amplificado las agrupaciones génicas que codifican para PKS parcialmente reductoras en la mitad de las cepas testadas, 18 cepas (50%), mientras que los cebadores de la serie KA, únicamente han amplificado este tipo de genes en 9 cepas (25%).

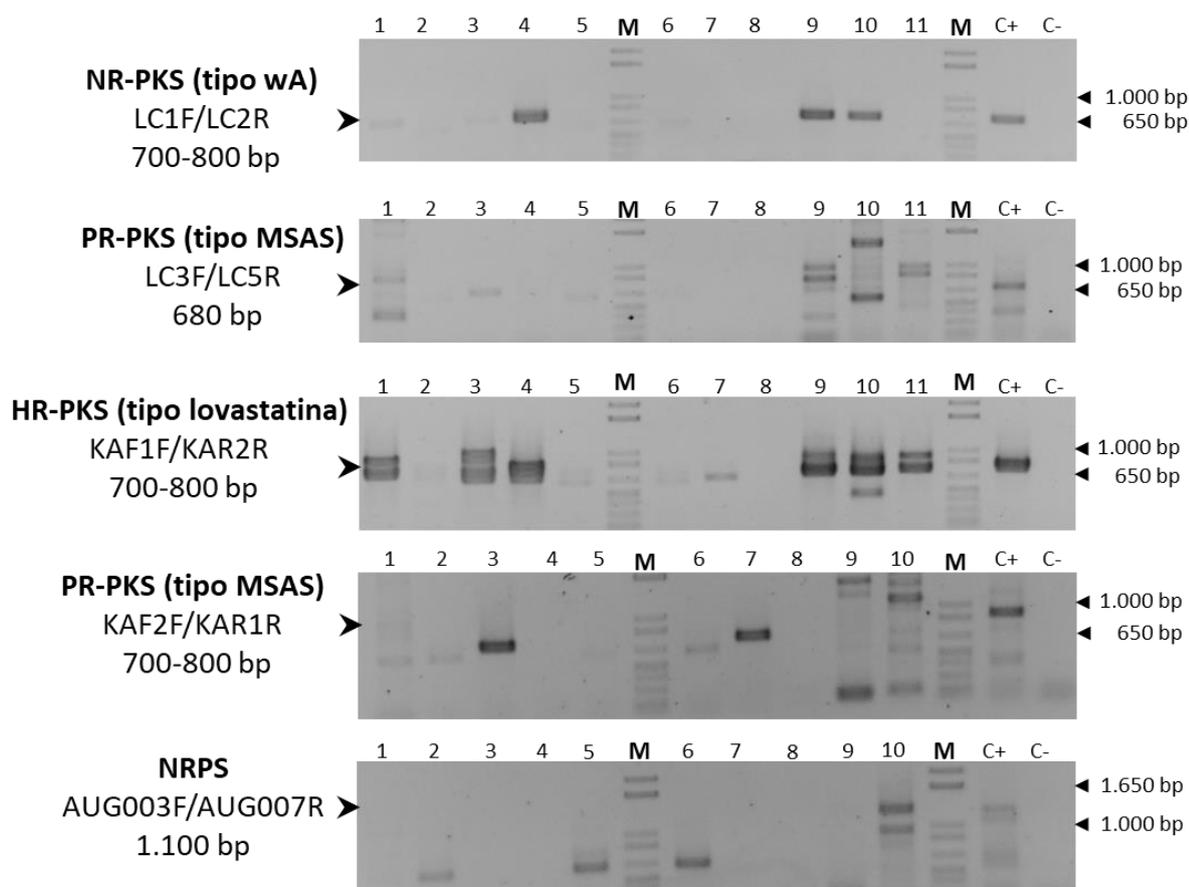
En este estudio la serie LC ha sido más útil en la amplificación de PKS parcialmente reductoras, amplificando en el doble de cepas que la serie KA, a diferencia de lo visto en estudios antes mencionados (Alongkorn *et al.*, 2009).

Por otro lado, la presencia de NRPS en los hongos testados fue muy reducida, encontrando únicamente una sola cepa, *Penicillium* sp. (E2i14), con esta agrupación génica. Este número tan bajo en la detección de NRPS también se ha visto en otros estudios como en el realizado por Yang *et al* (2018), en el que aislaron hongos endofíticos de peonias (*Paeonia suffruticosa* y *Paeonia ostii*) encontrando únicamente 8 cepas con NRPS de 157 testadas.

La presencia de varias agrupaciones génicas en una misma cepa se da en 24 (66,7%) de las 36 cepas testadas. Apareciendo únicamente 6 cepas con una sola agrupación génica y 6 cepas sin ninguna (16,7%). De estas 24 cepas, 8 de ellas tendrían dos agrupaciones génicas (22,2%), 8 cepas tres agrupaciones génicas y 7 cepas tendrían cuatro de las cinco agrupaciones génicas buscadas (19,4%).

**Tabla 3.2.15. Resultados de la amplificación de genes biosintéticos en hongos del género *Penicillium* aislados de madera en degradación.** Se indica la especie, el código de la cepa y la amplificación (+) o no amplificación (-) de los genes biosintéticos testados.

Especie	Código (cepa)	PKSs				NRPS
		LC1F/ LC2R	LC3F/ LC5R	KAF1F/ KAR2R	KAF2F/ KAR1R	AUG3/ AUG7
<i>Penicillium aeneum</i>	V42C66	+	-	+	-	-
<i>Penicillium aff. melinii</i>	E2C16	+	+	+	-	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	V12S13	-	+	+	-	-
<i>Penicillium charlesii</i>	V42C63	+	+	+	+	-
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	E2C22	+	+	+	+	-
<i>Penicillium citrinum</i>	V8C33	+	+	+	-	-
<i>Penicillium corylophilum</i>	V8C26	+	+	+	+	-
<i>Penicillium crustosum</i>	V12S27	+	-	+	-	-
<i>Penicillium decaturense</i>	V8C31	-	-	+	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	V8C64	-	-	+	-	-
<i>Penicillium fellutanum</i>	V12C22	-	-	+	+	-
<i>Penicillium glabrum</i>	C7C19	-	-	-	-	-
<i>Penicillium kojigenum</i>	V1C11	+	+	+	-	-
<i>Penicillium. citreonigrum</i>	V42C34	-	-	+	-	-
<i>Penicillium murcianum</i>	V8i77	-	-	-	-	-
<i>Penicillium pancosmium</i>	V8i103	+	-	+	-	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	P48C16	-	-	-	-	-
<i>Penicillium raistrickii</i>	V4i29	+	-	+	-	-
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	C7C18	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sanguifluum</i>	C7S22	+	+	+	+	-
<i>Penicillium spinulosum</i>	C7C21	-	-	+	-	-
<i>Penicillium steckii</i>	V8i101	-	-	+	+	-
<i>Penicillium toxicarium</i>	V8C126	+	+	+	-	-
<i>Penicillium ubiquetum</i>	V12C15	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	E2i14	+	-	+	+	+
<i>Penicillium sp.</i>	P52i11	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	E2S10	+	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V12C13	-	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V3i21	-	+	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V3i25	+	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V4S2	+	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V8C58	-	-	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V8i58	+	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	P44C17	-	+	+	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	P51S8	+	+	+	+	-
<i>Penicillium sp.</i>	V4C32	+	+	+	+	-



**Figura 3.2.16. Ejemplo de cribado de genes biosintéticos codificantes de PKS y NRPS en *Penicillium*.** Los cinco paneles representan las amplificaciones por PCR del ADN genómico de once cepas aisladas. En cada panel se muestra el número que representa a la cepa: 1: *P. citreosulfuratum* (E2C22), 2: *P. citrinum* (V8C33), 3: *P. corylophilum* (V8C26), 4: *P. crustosum* (V12S27), 5: *P. decaturense* (V8C31), 6: *P. expansum* (V8C64), 7: *P. fellutanum* (V12C22), 8: *P. glabrum* (C7C19), 9: *P. kojigenum* (V1C11), 10: *Penicillium* sp. (E2i14), 11: *P. citreonigrum* (V4C34), como control positivo (C+) se utilizó DNA total de *P. chrysogenum* ASP-78 y como control negativo (C-) agua. En la parte izquierda, nombre de la clase de gen que se busca, nombre de los cebadores y tamaño de banda esperado. En la parte derecha, masas moleculares según el marcador de referencia (M) [1Kb plus DNA ladder].

Como final del análisis se intentó observar la correlación entre la presencia de grupos de genes biosintéticos y la capacidad antifúngica de las cepas de *Penicillium* probadas, al unir los resultados existentes, se obtuvieron 17 de las cepas donde se han realizado ambos análisis. Estos resultados indican que, como en el caso de las Actinobacterias, no existe una relación clara entre la presencia de varios genes biosintéticos y una gran actividad en los hongos aislados durante este estudio, tabla 3.2.16.

De todas maneras, aquellos hongos, con actividad biológica y con los genes biosintéticos detectados como: *Penicillium* sp. (E2S10), *Penicillium* sp. (P51S8), *P. aff. melinii* (E2C16), *P. charlesii* (V42C63) y *P. citrinum* (V8C33) son interesantes para la caracterización genética de esos genes, de esta manera poder comprobar si la actividad antifúngica hallada puede deberse a compuestos secundario sintetizado por estos genes biosintéticos encontrados.

**Tabla 3.2.16. Tabla combinada de resultados de amplificación de genes biosintéticos y bioensayos realizados en hongos del género *Penicillium*.** Se indica la especie, el código de la cepa y la amplificación (+) o no amplificación (-) de los genes biosintéticos testados. Ordenada según capacidad antagónica frente a hongos degradadores de madera

Especie	Código	PKSs				NRPS	Bioensayo
		LC1F/ LC2R	LC3F/ LC5R	KAF1F/ KAR2R	KAF2F/ KAR1R	AUG003/ AUG007	
<i>Penicillium expansum</i>	V8C64	+	-	-	-	-	1,8
<i>Penicillium</i> sp.	E2S10	+	+	+	-	-	1,6
<i>Penicillium</i> sp.	P51S8	+	+	+	+	-	1,6
<i>Penicillium aff. melinii</i>	E2C16	+	+	+	-	-	1,4
<i>Penicillium charlesii</i>	V42C63	+	+	+	+	-	1,4
<i>Penicillium citrinum</i>	V8C33	+	+	+	-	-	1,4
<i>Penicillium aeneum</i>	V42C66	+	-	+	-	-	1,2
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	E2C22	+	+	+	+	-	1,0
<i>Penicillium corylophilum</i>	V8C26	+	+	+	+	-	1,0
<i>Penicillium toxicarium</i>	V8C126	+	+	+	-	-	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	V12C13	+	+	-	-	-	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	V4S2	+	+	+	-	-	1,0
<i>Penicillium murcianum</i>	V8i77	-	-	-	-	-	0,8
<i>Penicillium decaturense</i>	V8C31	+	-	-	-	-	0,4
<i>Penicillium</i> sp.	V4C32	+	+	+	+	-	0,4
<i>Penicillium brevicompactum</i>	V12S13	+	+	-	-	-	0,2
<i>Penicillium ubiquetum</i>	V12C15	-	-	-	-	-	0,0

### 3.2.5. Presencia de actividades enzimáticas de interés en *Penicillium*

Los hongos son capaces producir un gran número de enzimas que les permiten degradar desde biopolímeros simples hasta compuestos contaminantes. Esta gran capacidad para producir y secretar enzimas ha desembocado en que más de la mitad de las enzimas usadas para aplicaciones industriales provengan de hongos (de Vries *et al.*, 2020).

Dentro de estas enzimas fúngicas, las enzimas utilizadas para la degradación de la biomasa lignocelulósica, por su gran disponibilidad y su posible aprovechamiento en diversos campos como el farmacéutico, producción de papel o de biocarburantes han sido estos últimos años especialmente estudiadas. Dentro de estas enzimas se pueden destacar tres que serían centrales en la biodegradación de la celulosa a azúcares utilizables: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas.

Además, otras enzimas son necesarias para la completa degradación de la pared vegetal, tales como hemicelulasas, o enzimas capaces de romper los enlaces fenólicos existentes entre las cadenas de hemicelulosa y la lignina. Estos enlaces están constituidos por ácidos hidroxycinámicos como el ácido ferúlico y el ácido p-cumarílico, la ruptura de los enlaces por

medio de enzimas, como las feruloil esterases (FAEs) liberan estos ácidos pudiendo ser extraídos y utilizados. El ácido ferúlico ha demostrado tener propiedades antioxidantes y fotoprotectoras, siendo muy interesante para la industria farmacéutica y cosmética, al estar asociado a propiedades antidiabéticas, anticancerígenas o anti edad. Asimismo, el ácido ferúlico puede ser utilizado como precursor de la vainillina, el saborizante más demandado en el mercado (Kumar & Pruthi, 2014; Ou & Kwok, 2004; Palani Swamy & Govindaswamy, 2015).

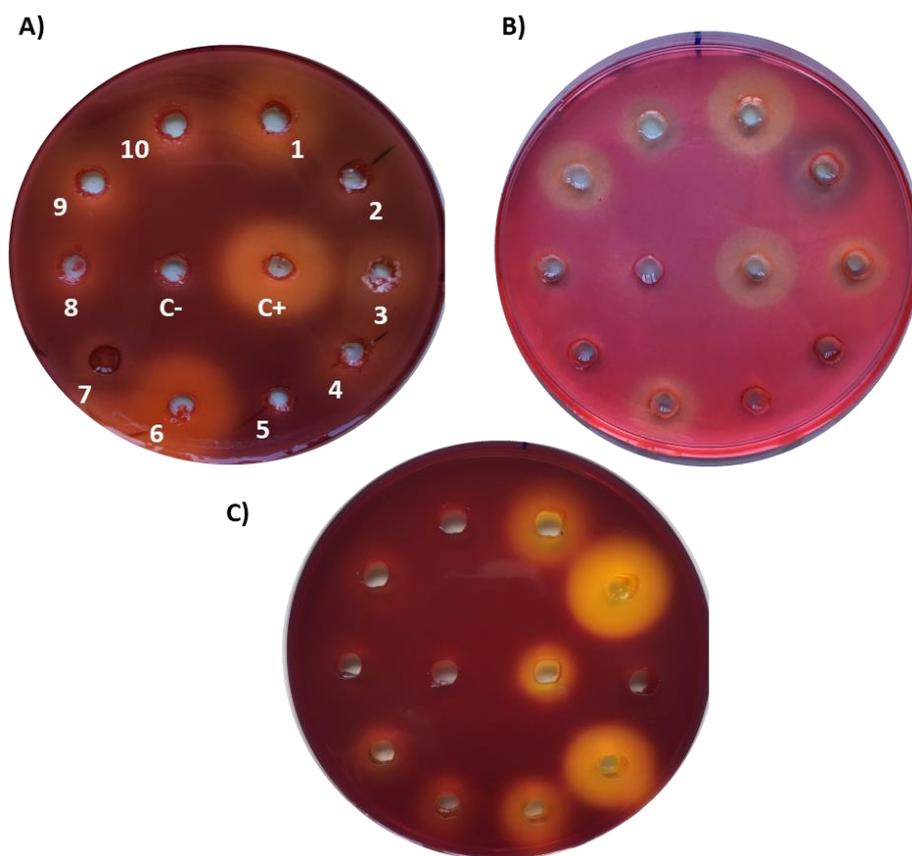
Para la realización de los ensayos enzimáticos se escogió el género *Penicillium* por la gran presencia que ha tenido en los aislamientos de madera en degradación durante este estudio, siendo el género fúngico más frecuentemente aislado, además, estudios recientes señalan al género *Penicillium* como productor de celulasas, ya que es capaz de producir todas las enzimas necesarias para el proceso de degradación de la celulosa (Vaishnav *et al.*, 2018). Por ello, se realizó una prueba de concepto en la que se probó la capacidad enzimática de 21 cepas aisladas (tabla 3.2.17).

**Tabla 3.2.17. Resultados de las actividades enzimáticas en cepas de *Penicillium* aisladas de madera en degradación.** Se indica la especie, el código de la cepa y presencia (+) o ausencia (-) de actividad enzimática.

Especie	Código (cepa)	Actividad		
		Endoglucanasa	Celulasa	Feruloil esterasa
<i>Penicillium aeneum</i>	V42C66	+	+	+
<i>Penicillium aff. melinii</i>	E2C16	+	+	+
<i>Penicillium brevicompactum</i>	V12S13	+	+	-
<i>Penicillium charlesii</i>	V42C63	+	+	+
<i>Penicillium citreonigrum</i>	V42C34	+	-	-
<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	E2C22	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	V8C33	+	+	+
<i>Penicillium corylophilum</i>	V8C26	+	-	+
<i>Penicillium decaturense</i>	V8C31	+	+	+
<i>Penicillium expansum</i>	V8C64	+	+	-
<i>Penicillium glabrum</i>	C7C19	+	+	-
<i>Penicillium kojigenum</i>	V1C11	+	-	-
<i>Penicillium murcianum</i>	V8i77	+	+	-
<i>Penicillium sp.</i>	P52i11	-	-	+
<i>Penicillium sp.</i>	E2S10	-	+	+
<i>Penicillium sp.</i>	V12C13	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	V3i25	+	+	-
<i>Penicillium sp.</i>	V4S2	+	-	+
<i>Penicillium sp.</i>	P51S8	+	+	-
<i>Penicillium sp.</i>	V4C32	-	-	+
<i>Penicillium toxicarium</i>	V8C126	+	+	+

La actividad enzimática de las cepas seleccionadas se analizó utilizando dos ensayos distintos. Uno de ellos, utiliza medios con presencia de celulosa o de metilcelulosa junto con rojo Congo para revelar la presencia de enzimas celulolíticas, mientras que el otro utiliza un indicador de pH (azul de bromofenol) para comprobar la hidrólisis del etil-ferulato a ácido ferúlico, reduciendo el pH y creando un halo amarillo en aquellos ensayos positivos (García-Calvo, 2018).

La elección de dos sustratos distintos para la evaluación de la actividad celulosa, se realizó para medir independientemente la actividad endoglucanasa y degradación general de la celulosa. Para el primero, se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa (CMC), compuesto derivado de la celulosa formado por grupos carboximetil enlazados a algunos grupos hidroxilo, para testar la actividad endoglucanasa. Para el segundo, se usó celulosa microcristalina. En ambos ensayos se utilizó rojo Congo para revelar la actividad celulosa, éste es un colorante con gran afinidad por los enlaces entre unidades de glucopiranososa, la hidrólisis de estos crea zonas sin teñir alrededor de las cepas con actividad celulosa, figura 3.2.17A y B.



**Figura 3.2.17. Ejemplo de ensayos para medir la actividad enzimática de las cepas de *Penicillium* aisladas de madera en degradación. A)** Ensayo enzimático para comprobar la acción celulosa general. **B)** Ensayo enzimático para comprobar la acción endoglucanasa. **C)** Ensayo para comprobar la acción feruloil esterasa. Los números se corresponden con las cepas probadas, el orden en todas las placas ha sido respetado: 1: *P. citreosulfuratum* (E2C22), 2: *Penicillium* sp. (V4S2), 3: *Penicillium* sp. (V3i25), 4: *Penicillium* sp. (E2S10), 5: *Penicillium* sp. (P52i11), 6: *P. charlesii* (V42C63), 7: *Penicillium* sp. (V4C32), 8: *Penicillium* sp. (V12C13), 9: *P. citreonigrum* (V42C34) y 10: *P. kojigenum* (V1C11). Como control positivo se usó una cepa de *Penicillium rubens* B13 (C+) y como control (C-) medio estéril.

De las 21 cepas analizadas 14 (66,7%) presentaban acción celulasa general, siendo capaces de degradar la celulosa cristalina, 17 cepas (80,9%) han presentado actividad endoglucanasa, siendo comprobada mediante la degradación del CMC. Algunas cepas han presentado actividad mayor a la presentada por la cepa considerada como control positivo (*Penicillium rubens* B13), por su caracterización en estudios anteriores (Rodríguez-Castro *et al.*, 2017).

En cuanto a la actividad feruloil esterasa, ésta ha sido menos frecuente al observarse únicamente 12 cepas (57,1%) con actividad enzimática. En este caso, también se han encontrado cepas con actividad enzimática superior al control positivo (*Penicillium rubens* B13), un ejemplo ha sido *Penicillium* sp. (V4S2), figura 3.2.17C pocillo 2, el cual ha tenido un halo con un radio de 12,5 mm, siendo la media de los halos presentados por el control positivo de 6,75 mm. Esta alta capacidad de producir enzimas queda también patente en las 7 cepas que han presentado las tres actividades enzimáticas, como se muestra en la tabla 3.2.17.

## CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *BACILLUS PUMILUS*

### 3.3.1. Introducción y objetivos del capítulo

El género *Bacillus*, pertenece al Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae, incluye 414 diferentes especies (según LPSN, consultado el 10/12/2022) de bacterias Gram positivas, forma bacilar y formadoras de endosporas. Esta habilidad de generar endosporas, junto con una gran diversidad metabólica han otorgado a esta especie una enorme diseminación en todos los ambientes imaginables, pudiendo ser encontrada desde muestras de suelo hasta en condiciones extremas, como fondos oceánicos o la estación espacial internacional (Liu *et al.*, 2013; Vaishampayan *et al.*, 2012).

Se pueden distinguir hasta 17 clados diferentes, de los cuales los más característicos serían el de *B. cereus* y el de *B. subtilis* (Gupta *et al.*, 2020). Dentro de este último se encuentran algunas bacterias con interés industrial encontradas en la madera en degradación durante este trabajo. Entre ellas, la especie *B. pumilus*, que fue aislado por primera vez por Meyer y Gottheil (1901), ha tenido relevancia por su capacidad de producir compuestos antimicrobianos y enzimas, pero sobre todo por la gran resistencia que presentaban sus esporas, siendo la cepa *B. pumilus* SAFR-032, resistente a condiciones espaciales (Vaishampayan *et al.*, 2012).

Además de las cepas encontradas en madera en degradación, para realizar una caracterización más completa de estas cepas se escogieron dos cepas aisladas de superficies metálicas corroídas procedentes de un proyecto anterior (BIOCORIN: <https://cordis.europa.eu/project/id/282881>). La cepa *B. pumilus* PSA procedente de una superficie metálica localizada en el puerto de Pontevedra (España), y la cepa DEVA aislada de un puente de Madrid (España).

Como cepa control de la caracterización se utilizó la cepa tipo representativa de esta especie *B. pumilus* DSM27 (colección de cultivos tipo alemana) que se corresponde con la cepa *B. pumilus* ATCC 7061 (*American Type Culture Collection*).

Con todo ello los objetivos de este capítulo fueron:

- Caracterizar el crecimiento y la producción de esporas de las diferentes cepas de *B. pumilus*
- Describir la actividad antifúngica y antimicrobiana de las especies testadas.
- Extraer, secuenciar y analizar el genoma de las cepas de *B. pumilus* aisladas de madera, y compararlo con la cepa de colección DSM27.
- Realizar una comparación del proteoma de las diferentes cepas.

### 3.3.2. Selección del mejor candidato

Esta tesis se encuadra en el proyecto europeo ProWood (*Protection of Wood by novel bio-based solutions*) del que el objetivo final era la integración de microorganismos, enzimas o compuestos derivados de estos en soluciones protectoras que ayudaran a proteger la madera de la degradación. Por ello, el primer filtro utilizado fue determinar aquellos microorganismos capaces de antagonizar de manera efectiva el crecimiento de los hongos degradadores de la madera (apartado 3.2.2). De esta forma se seleccionaron tres especies/cepas de tres géneros distintos (*Bacillus*, *Streptomyces* y *Trichoderma*) como candidatos para la integración de estos en las soluciones protectoras de la madera. Estas cepas se resumen en la tabla 3.3.1 y 3.3.2.

Tabla 3.3.1. Cepas con alto antagonismo candidatas para su estudio en profundidad. *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Nombre	Código	A. b	A. p	C. p	P. c	T. v	Media
<i>B. pumilus</i>	P48C1	2	2	2	2	2	2,0
<i>B. pumilus</i>	V17C11	2	2	2	2	2	2,0
<i>B. pumilus</i>	E2i1	2	2	2	2	2	2,0
<i>Streptomyces</i> sp.	C7i7	1	2	2	2	2	1,8
<i>S. fimicarius</i>	V56S1	2	2	2	2	1	1,8
<i>S. niveus</i>	V56S7	1	2	2	2	2	1,8
<i>T. citrinoviride</i>	C7C15	2	2	2	2	2	2,0
<i>T. gamsii</i>	V5C7	2	2	2	2	2	2,0
<i>T. koningii</i>	P44C12	2	2	2	1	2	1,8

Para seleccionar con que especie se debía continuar la investigación se realizaron una serie de pruebas en las que se evaluaron distintos parámetros importantes para la utilización de las cepas, estos resultados están resumidos en la tabla 3.3.2.

- **Antagonismo.** Las tres especies de los tres géneros presentaron un alto antagonismo.
- **Patogenicidad.** Ninguna de las especies está considerada como un patógeno humano.
- **Localización geográfica.** Para evitar una posible liberación de microorganismos en ambientes donde no estuvieran antes, otro de los requisitos fue la universalidad en la localización de estas especies. Las tres especies son de localización ubicua.
- **Esporulación.** Para la integración de los microorganismos en las soluciones protectoras de madera, se buscó una especie capaz de esporular, y así, poder utilizar estas formas de resistencia como forma de inoculación.
- **Condiciones de esporulación.** Se testaron diferentes condiciones de esporulación para obtener un gran número de esporas de la manera más económica y fácil posible.

- *Trichoderma*. Se consiguió la esporulación en medio sólido (Power II) pero se falló en la esporulación en medio líquido definido por Said (2007).
  - *Streptomyces*. Se consiguió una alta esporulación en medios sólidos de esporulación de *Streptomyces* como MS y TBO.
  - *Bacillus*. Se consiguió una alta esporulación en medios sólidos simples como TSA, y en medios líquidos simples como LB. Más adelante se elaboró un protocolo para estandarizar las condiciones de esporulación.
- **Resistencia de las esporas a la liofilización.** Para facilitar su incorporación en los barnices protectores se necesitaba la eliminación del agua de la disolución de esporas. Para ello, se llevó a cabo una liofilización de las esporas de todas las cepas analizadas seguido de un recuento del número de esporas viables. Todas las cepas consiguieron aguantar adecuadamente la liofilización.
  - **Resistencia de las esporas a la acetona.** Una de las soluciones para la protección de la madera consistía en aceites funcionalizados. Para su integración dentro de esta solución no se podía disolver las esporas en una solución acuosa, por lo que se optó por un disolvente orgánico, la acetona. Para comprobar si las esporas aguantaban la inmersión en acetona, se disolvieron esporas de los tres géneros (*Trichoderma*, *Streptomyces* y *Bacillus*) previamente liofilizadas en una solución de acetona pura a una concentración final de  $1.10^6$  esporas/mL, se mantuvieron en la solución de acetona 1 hora y sembraron en medio sólido para comprobar su viabilidad. Únicamente las esporas pertenecientes a cepas de *B. pumilus* fueron capaces de aguantar la disolución en acetona.
  - **Proceso de escalado.** Uno de los objetivos del proyecto era el escalamiento a nivel industrial de la producción de las nuevas soluciones protectoras de la madera, por ello, se necesitaba un candidato que fuera fácilmente cultivable en medio líquido y del que las esporas fueran recogidas de forma segura y eficiente. Como únicamente se pudo realizar la recogida de esporas de medio líquido en las cepas de *B. pumilus*, se seleccionó esta especie para continuar con la investigación.
  - **Razones adicionales.** Además, las diferentes cepas de *B. pumilus* han sido reconocidas como microorganismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA: *U.S. Food & Drug Administration*) (Pudova *et al.*, 2022), y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA: *The European Food Safety Authority*) (Panel *et al.*, 2020).

**Tabla 3.3.2. Parámetros evaluados para la elección de las cepas a utilizar.** En liofilización y acetona se valora la resistencia que han tenido las esporas para aguantar ambas condiciones.

Cepa	Antagonismo	Patógeno	Localización	Esporulación	Liofilización	Acetona	Escalado
<i>B. pumilus</i> (V17C11)	Alto	No	Ubicuo	Líquida y sólida	Alta	Alta	Fácil
<i>B. pumilus</i> (P48C1)	Alto	No	Ubicuo	Líquida y sólida	Alta	Alta	Fácil
<i>B. pumilus</i> (E2i1)	Alto	No	Ubicuo	Líquida y sólida	Alta	Alta	Fácil
<i>S. fimicarius</i> (V56S1)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil
<i>S. niveus</i> (V56S7)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil
<i>Streptomyces</i> sp. (C7i7)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil
<i>T. citrinoviride</i> (C7C15)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil
<i>T. gamsii</i> (V5C7)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil
<i>T. konigii</i> (P44C12)	Alto	No	Ubicuo	Sólida	Alta	Baja	Difícil

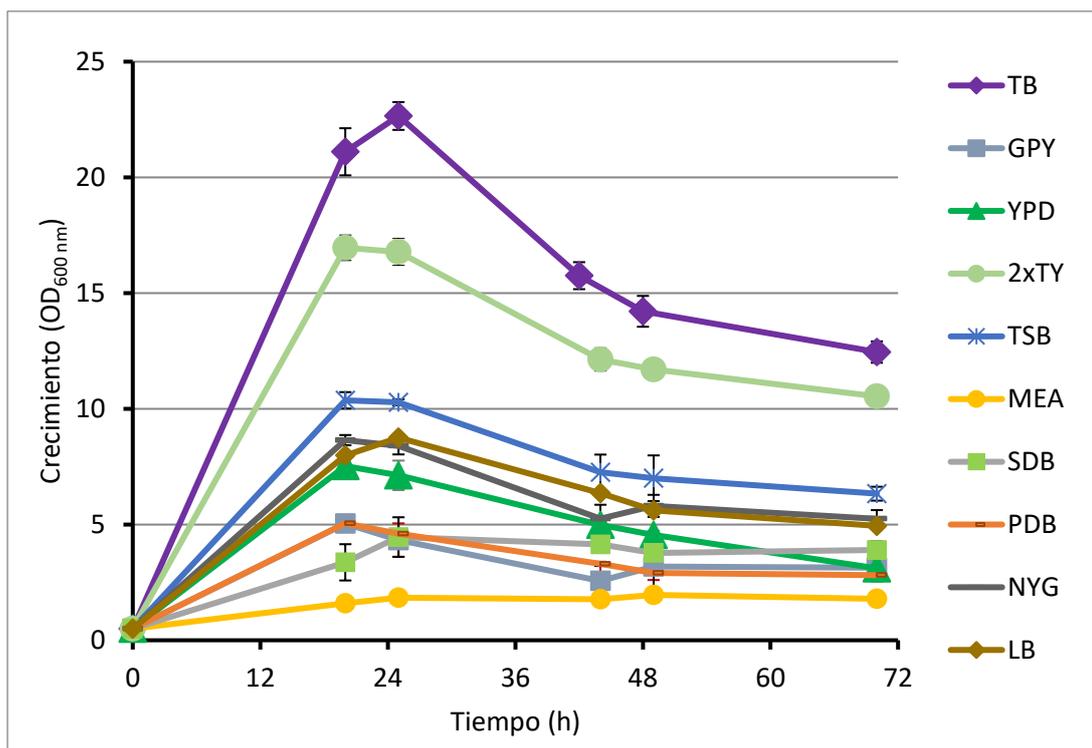
### 3.3.3. Condiciones de crecimiento de cepas de *B. pumilus*

El primer paso fue la elección del medio donde cultivar *B. pumilus*, se probaron 9 medios de cultivo distintos [TB (*Terrific Broth*), GPY (*Glucose Yeast Peptone Broth*), YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Broth*), 2xTY (*Tryptone Yeast Extract Broth*), TSB (*Tryptone Soy Broth*), MEA (*Malt Extract Agar*), SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), NYG y LB (*Luria-Bertani Broth*)].

Entre los medios seleccionados se probaron medios típicamente utilizados en bacterias como TB, LB o TSB, donde el crecimiento de *B. pumilus* ya ha sido descrito, pero también se utilizaron medios tradicionalmente usados para levaduras, YPD y para hongos, MEA, SDB o PDB, donde se testó el crecimiento de esta especie bacteriana.

Como se puede ver en la figura 3.3.1 el crecimiento de *B. pumilus* fue superior en aquellos medios tradicionalmente usados para bacterias, como *Terrific Broth* (TB), *Tryptone Yeast Extract Broth* (2xTY) o *Tryptone Soy Broth* (TSB). Entre los medios probados en el presente mayor crecimiento fue en TB.

El medio TB fue diseñado en 1987 para incrementar el rendimiento de los plásmidos en *E. coli* al extender su fase exponencial (Tartoff & Hobbs, 1987), pero se ha usado en numerosos estudios con diferentes especies de *Bacillus* incrementado tanto el crecimiento como la producción de metabolitos secundarios (Wu *et al.*, 2020).



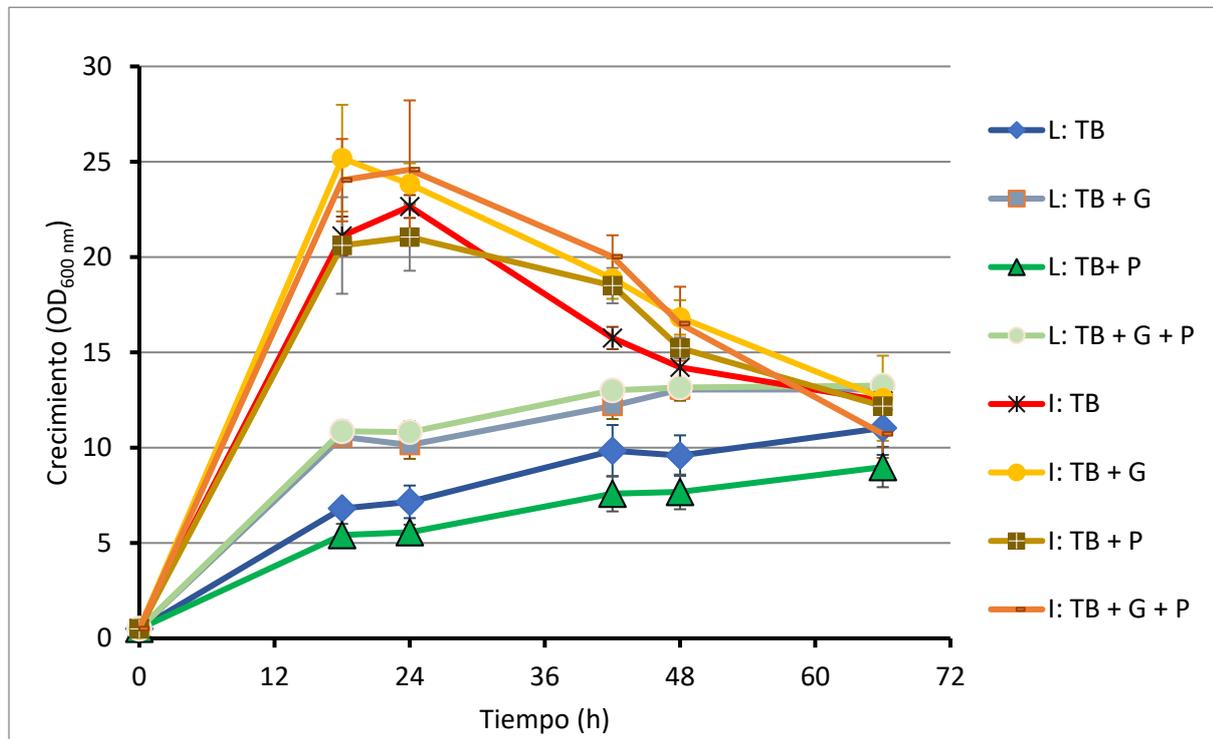
**Figura 3.3.1. Comparación del crecimiento de *B. pumilus* V17C11 en medios distintos.** Los medios utilizados han sido TB (*Terrific Broth*), GPY (*Glucose Yeast Peptone Broth*), YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Broth*), 2xTY (*Tryptone Yeast Extract Broth*), TSB (*Tryptone Soy Broth*), MEA (*Malt Extract Agar*), SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), NYG y LB (*Luria-Bertani Broth*).

Además, se realizó una comparación entre el crecimiento de *B. pumilus* V17C11 en medio TB modificando el tipo de matraces utilizados, lisos o indentados, y suplementado el medio con peptona, glucosa o ambas, los resultados se recogen en la figura 3.3.2. La utilización de matraces indentados aumenta la aireación del cultivo, dando en algunos casos mayores índices de crecimiento (McDaniel *et al.*, 1965).

Como se puede apreciar en la figura 3.3.2, la fermentación de *B. pumilus* (V17C11) en matraces indentados aumento su crecimiento sobre todo durante las primeras 24 horas, donde se alcanzaron los valores de crecimiento máximos, densidad óptica ( $DO_{600}$ ) entre 19 y 27. A partir de ese momento el cultivo empezó a decaer rápidamente. La suplementación con peptona no parece tener efecto en el crecimiento máximo del cultivo, pero si en la fase de muerte retrasándola ligeramente. En cambio, la suplementación con glucosa si tiene efecto en la densidad total del cultivo, aumentando la densidad óptica a las primeras horas de crecimiento. La adición de ambas ha sido la condición donde mayor crecimiento bacteriano se ha observado.

Los matraces lisos han presentado densidades ópticas inferiores a las presentadas por los matraces indentados. Como en el caso de los matraces indentados, la presencia de glucosa ha aumentado la densidad óptica del cultivo, siendo la combinación de ambos nutrientes, glucosa y peptona, la condición que ha conseguido una mayor densidad óptica. En los matraces lisos,

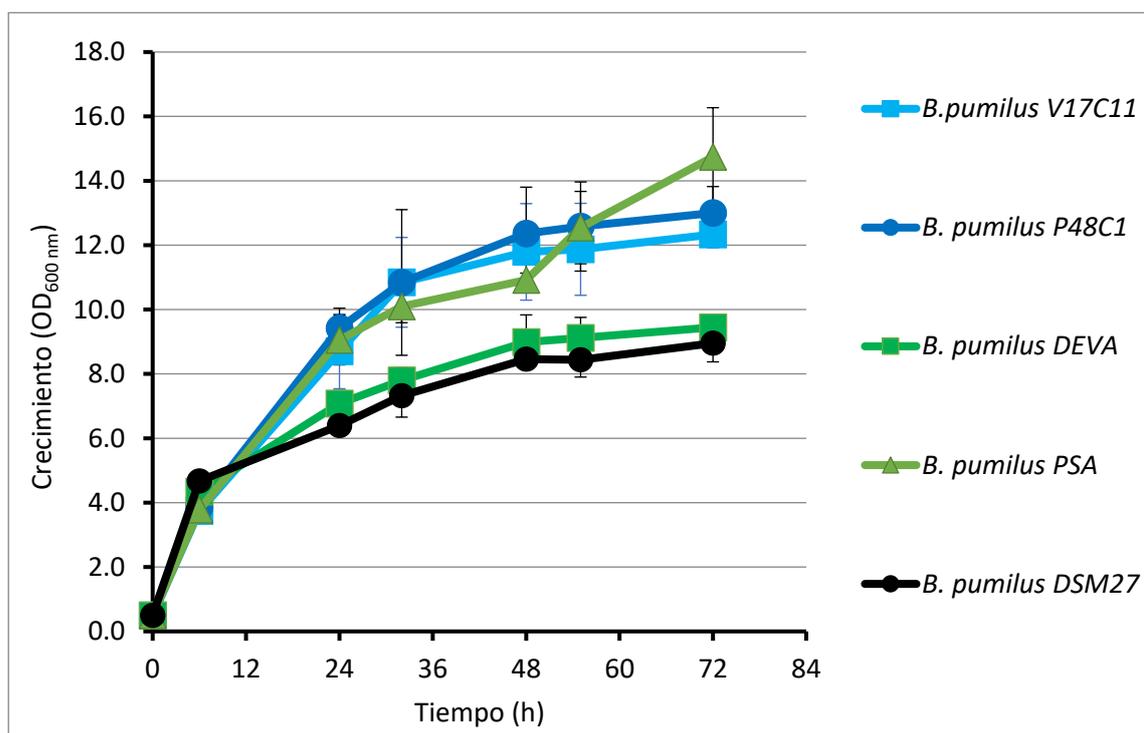
la densidad óptica del cultivo ha aumentado progresivamente a lo largo del cultivo, sin alcanzar una fase de muerte clara en las horas de cultivo analizadas.



**Figura 3.3.2. Comparación de crecimiento de *B. pumilus* (V17C11) entre matraces lisos e indentados.** Se utilizó el medio Terrific Broth (TB). Matraces indentados en la parte superior de la figura en colores cálidos. Matraces en la parte inferior de la figura en colores fríos. L: liso, I: indentado, G: 2,0% de glucosa y P: 2,5% de peptona.

El uso de matraces indentados se lleva utilizando durante años para el cultivo y producción de metabolitos, principalmente en microorganismos filamentosos como hongos, Actinobacterias (Katzner *et al.*, 2001) o levaduras (Donzella *et al.*, 2022). El uso de este tipo de matraces en especies del género *Bacillus* ha sido utilizado anteriormente para la producción de metabolitos útiles para la industria como, ácido poli-glutámico en cepas de *B. licheniformis* o *B. subtilis* (Qiao *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 1963). En cuanto a *B. pumilus*, el estudio de Fulbright *et al.* (2016) demuestra la capacidad de una cepa que fue aislada de un fermentador y cultivada con matraces indentados para producir sustancias que ocasionan la inhibición del crecimiento de algas (*Nannochloropsis salina*).

Por último, se realizó la comparación de crecimiento de cepas de *B. pumilus* aisladas de diferentes ambientes y la cepa de colección DSM27 en el medio de elección TB. Como se puede ver en la figura 3.3.3 el crecimiento de las cepas comparadas ha sido desigual. Así, las cepas aisladas de madera en degradación y la cepa *B. pumilus* PSA presentaron un mayor crecimiento. Siendo muy parecido en las cepas aisladas de madera en degradación, aunque un poco superior en el caso de la cepa aislada de Noruega (P48C1). El crecimiento de las cepas aisladas de metales el crecimiento ha sido muy desigual, siendo *B. pumilus* PSA claramente superior a *B. pumilus* DEVA. En cuanto a la cepa de colección *B. pumilus* DSM27, el crecimiento ha sido inferior a todas las cepas encontradas en ambientes silvestres.



**Figura 3.3.3. Comparación de crecimiento de diferentes cepas de *B. pumilus*.** Las cepas aisladas de madera en degradación en colores azules (V17C11 y P48C1), se comparan con aquellas aisladas de superficies metálicas en colores verdes (PSA y DEVA) y con la cepa de colección *B. pumilus* DSM27 en color negro.

### 3.3.4. Optimización de las condiciones de esporulación de *B. pumilus*

El género *Bacillus* se encuentra entre los pocos géneros bacterianos capaces de sobrevivir a condiciones extremas gracias a la formación de endosporas. Las endosporas son formas metabólicamente durmientes con gran resistencia a condiciones adversas de calor, desecación, radiación, falta de nutrientes, agentes químicos o solventes orgánicos (Aleksandra *et al.*, 2012). Dentro de este género, cepas pertenecientes a la especie *B. pumilus* han demostrado ser más resistentes a condiciones de alta radiación, como aquella que puede darse en el espacio, que otras especies del mismo género (Vaishampayan *et al.*, 2012).

La elección de las esporas de *B. pumilus* para ser añadidas a los barnices responde a lo explicado anteriormente en el apartado 3.3.2, la necesidad de obtener formas de resistencia capaces de soportar los agentes químicos con los que se realizan los barnices. Por ello, se puso a punto un método para la producción de esporas de las cepas aisladas de madera en degradación.

El primer paso fue elección del medio de cultivo donde crecer *B. pumilus* para la producción de esporas. Para ello se probaron tres medios de cultivo distintos: *Terrific Broth* (TB), Luria-Bertani (LB) y *Sporulation Bacillus Media* (SBM), este último especialmente diseñado para la esporulación de *B. subtilis* (Posada *et al.*, 2015). Se comparó el nivel de esporulación de forma cualitativa a través de preparaciones al microscopio que permiten ver el nivel de esporulación

del cultivo. De esta manera se comprobó que *B. pumilus* creciendo en TB necesita más horas de cultivo (144 horas) para empezar a esporular, mientras que en los otros medios (LB y SBM) la esporulación comienza entre las 48-72 horas. Al necesitar una rápida esporulación, que agilizara el proceso de obtención de esporas y con ello que permitiera un fácil escalado industrial, el medio TB fue descartado como medio de esporulación.

El proceso de esporulación es un mecanismo complejo donde las condiciones de cultivo afectan a la resistencia final de las esporas. Esta resistencia puede ser condicionada debido a diferencias en el medio de cultivo, o a través de tratamientos térmicos durante el proceso de esporulación. Por lo tanto, aunque el principal estímulo para el inicio de la esporulación en *Bacillus* es la falta de nutrientes, se realizó un tratamiento térmico de los cultivos para conseguir esporas más resistentes (Bressuire-Isoard *et al.*, 2018; Sedlák *et al.*, 1993).

Para poner en práctica lo anteriormente descrito, se testó la capacidad de producir esporas de *B. pumilus* V17C11 en medio LB y SBM a 24 y 72 horas de cultivo. Este cultivo se recogió, a través de centrifugado, y se le sometió a un choque térmico de 80 °C durante 5, 15 o 20 minutos. Para comprobar el grado de esporulación del cultivo se observaron al microscopio óptico preparaciones de cada una de las condiciones, comprobando el nivel de esporulación. Para valorar este análisis se puntuó con; **0** si el cultivo estaba poco o no esporulado, **1** si el cultivo estaba esporulado y **2** si la mayoría de las bacterias del cultivo habían desarrollado esporas. Los resultados de los experimentos se recogen en las tablas 3.3.3 y 3.3.4.

**Tabla 3.3.3. Cultivo y recuperación de *B. pumilus* V17C11 durante el protocolo de esporulación. 0 cultivo no o poco esporulado, 1 cultivo esporulado y 2 cultivo mayormente esporulado.**

Medio de cultivo	Medio post-choque térmico	Cultivo (horas)	
		24	72
SBM	Agua MQ	1	2
	SBM	0	2
LB	Agua MQ	1	2
	LB	1	2

Como se puede ver en la tabla 3.3.3, en lo relativo al tiempo de cultivo eran necesarias 72 horas para una esporulación completa de los cultivos, y con respecto al medio de recuperación (post-choque térmico) se vio que no era necesario emplear el mismo medio para la recuperación de las esporas, siendo el agua MQ (ultra pura) una alternativa igualmente eficaz.

Además, se observó que tanto el tiempo de choque térmico, como el tiempo de recuperación es importante para obtener cultivos completamente esporulados. Los mejores resultados se dieron con un choque térmico de 20 minutos y un tiempo de recuperación de 30 minutos a 4 °C. Se vio que la utilización de SBM no era necesaria, ya que el nivel de esporulación era similar al obtenido con un medio de uso común como el LB.

Tabla 3.3.4. Choque térmico en cultivos de *B. pumilus* V17C11 durante el protocolo de esporulación. 0 cultivo no o poco esporulado, 1 cultivo esporulado y 2 cultivo mayormente esporulado.

Choque térmico 80°C (minutos)	Tiempo de recuperación (minutos)	Medio LB	Medio SBM
5	5	1	0
	15	1	2
	30	1	1
10	5	1	2
	15	2	2
	30	2	2
20	5	1	1
	15	2	2
	30	2	2

Para la incorporación de las esporas dentro de los barnices es necesario que estas adquieran una forma que permita una fácil y segura aplicación y distribución. Por ello, se testó la liofilización como forma de obtener una forma de administración y conservación de las esporas conseguidas. El proceso de liofilización conlleva primero la congelación de aquello que se quiera liofilizar, por ello, se realizó una comparación entre la viabilidad de las esporas de *B. pumilus* en tres momentos del proceso, justo después de realizar el choque térmico, una vez las esporas han sido congeladas y tras su liofilización. Los resultados se muestran en la figura 3.3.4.

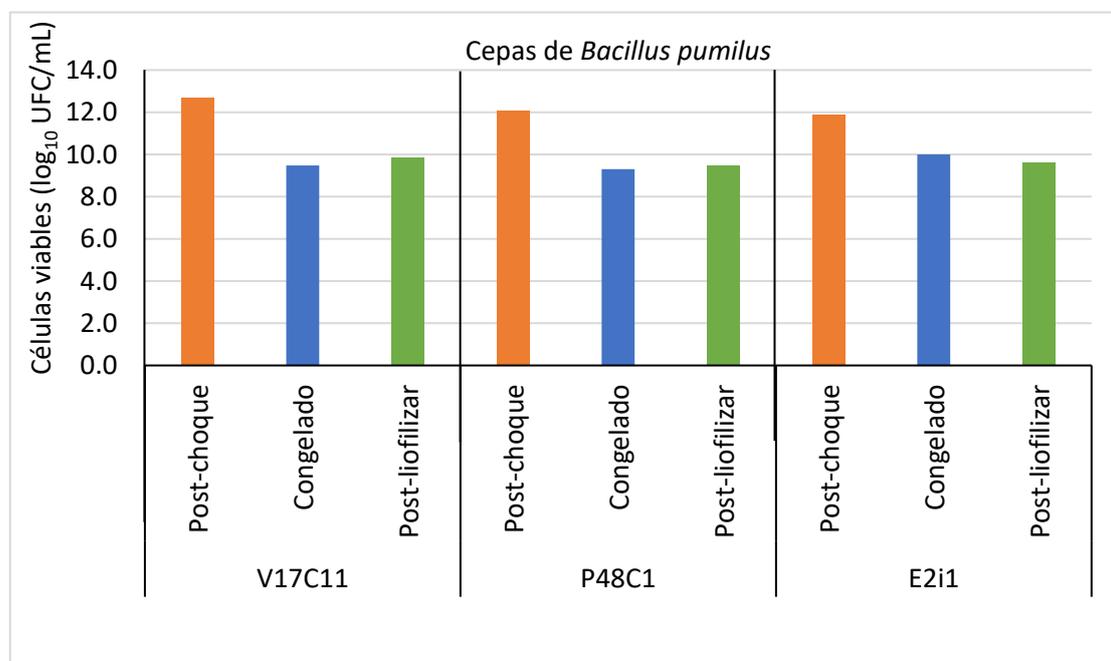
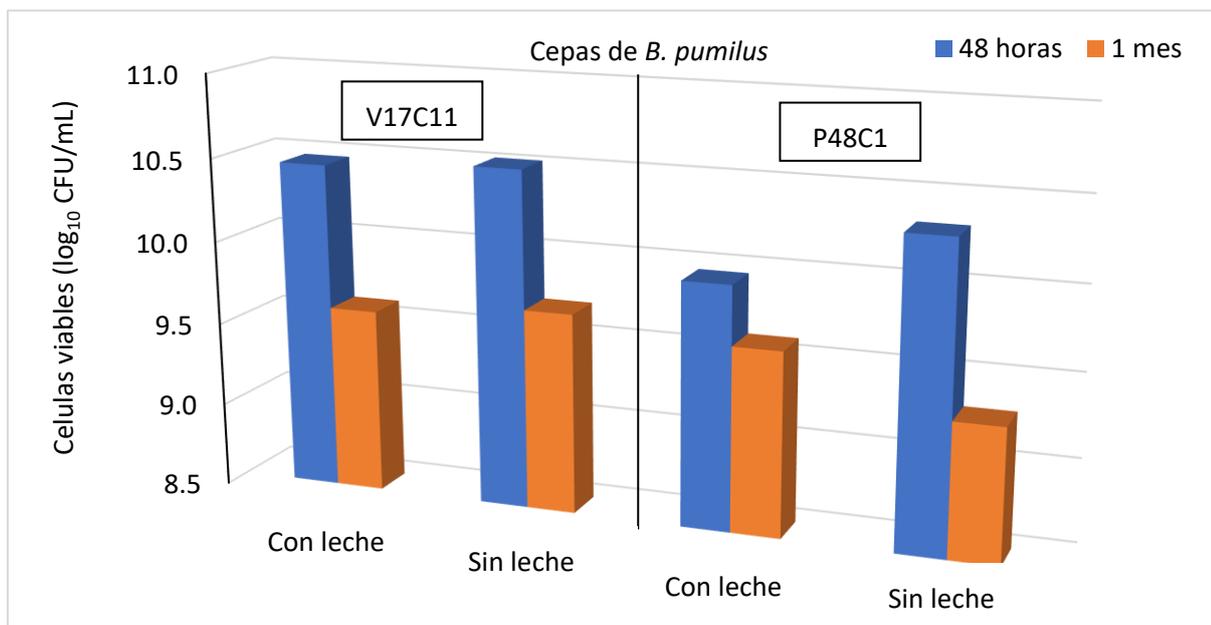


Figura 3.3.4. Viabilidad de las esporas en el proceso de liofilización. La concentración de esporas se representó como Log<sub>10</sub>.

Se puede apreciar la gran diferencia existente entre la primera condición y las otras dos, siendo la viabilidad post-choque térmico siempre muy superior a las otras. Esto puede explicarse, ya que, aunque se haya sometido a los cultivos bacterianos a un choque térmico pueden seguir existiendo bacterias viables no esporuladas durante la fase post-choque. En las otras dos condiciones, se ve que la congelación de los cultivos disminuye el número de esporas viables, pero la concentración de estas sigue siendo alta (entorno a los  $5 \cdot 10^9$  UFC/mL). En cuanto al proceso de liofilización de las muestras, la viabilidad de las esporas no disminuye con respecto a la fase de congelación, siendo factible para la aplicación de las esporas dentro de los barnices.



**Figura 3.3.5. Viabilidad de las esporas utilizando leche como protector celular.** La concentración de esporas se representó como  $\text{Log}_{10}$ .

Por último, se quiso saber si la liofilización utilizando leche descremada como protector celular tradicional era una forma efectiva de proteger las esporas frente a este proceso, tal y como se ha descrito en bibliografía (Nasran *et al.*, 2020), y si ésta influye en la viabilidad de las esporas al paso del tiempo.

Como se puede ver en la figura 3.3.5, la utilización de leche como protector celular no pareció afectar a la viabilidad de las esporas. En ambas cepas analizadas la viabilidad fue similar. En cuanto a la diferencia existente entre los dos tiempos, sí que se puede ver una pérdida de viabilidad celular al mes de haberse liofilizado. De todas formas, la concentración existente en los viales tras un mes de liofilización sigue siendo alta ( $4 \cdot 10^9$  UFC/mL).

Por último, al haber seleccionado el medio LB como medio para la producción de esporas se realizó una optimización de las condiciones de cultivo de *B. pumilus* en dicho medio variando las condiciones de temperatura, agitación y las concentraciones de glucosa y peptona, utilizando tres valores diferentes para cada condición. Para encontrar los valores óptimos de crecimiento en el menor número de experimentos se utilizó un diseño experimental factorial usando la metodología de superficie de respuesta (MSR). Para ello, se diseñó un ensayo

utilizando 27 experimentos por triplicado combinado las distintas variables mencionadas, tal y como se puede ver en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

El análisis de la varianza (ANOVA) indica que 12 de los 14 factores han sido estadísticamente significativos para la variación de la biomasa de *B. pumilus*. De todos ello, se destaca la temperatura siendo el que mayor impacto ha tenido (tabla 3.3.5).

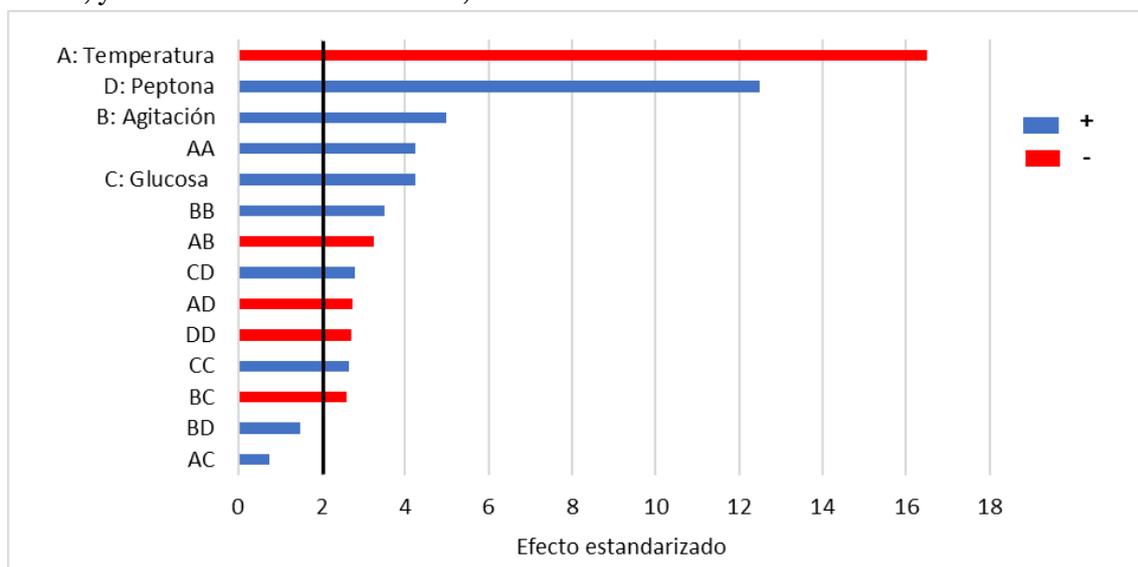
**Tabla 3.3.5. Análisis de la varianza de biomasa para el modelado de superficie de respuesta (MSR).** Los datos en verde son estadísticamente significativos ( $p > 0,5$ ). Las combinaciones de letras representan la combinación de los dos factores.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Error cuadrático medio	Ratio F	Valor p
A: Temperatura	358,35	1	35,35	272,13	0,00E+00
B: Agitación	31,55	1	31,55	23,96	0,00E+00
C: Glucosa	23,85	1	23,85	18,11	1,00E-04
D: Peptona	202,68	1	202,68	153,92	0,00E+00
AA	23,86	1	23,86	18,12	1,00E-04
AB	12,98	1	12,98	9,86	2,60E-03
AC	0,65	1	0,65	0,50	4,84E-01
AD	9,47	1	9,47	7,19	9,30E-03
BB	16,47	1	16,47	12,50	8,00E-04
BC	5,82	1	5,82	4,42	3,94E-02
BD	3,27	1	3,27	2,48	1,20E-01
CC	8,32	1	8,32	6,32	1,45E-02
CD	10,72	1	10,72	8,14	5,80E-03
DD	8,77	1	8,77	6,66	1,21E-02
Bloques	0,21	2	0,11	0,08	9,22E-01
Error total	84,00	64	1		
Total (corr.)	810,00	80			

La estadística R-cuadrado indica que el modelo explica el 89,59 % de la variabilidad de la biomasa.

El estadístico R cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 86,99 %. El error estándar de la estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,14. El error absoluto medio (MAE) es de 0,80. La estadística de Durbin-Watson (DW) prueba los valores residuales para determinar

si existe alguna correlación significativa según el orden en que se procesan los datos. Dado que el valor P es superior al 5,0 %, no hay indicios de autocorrelación serial. Este impacto puede verse en la gráfica de Pareto, figura 3.3.6, que indica la importancia que ha tenido cada condición, y las combinaciones de ellas, en la biomasa del cultivo.



**Figura 3.3.6. Diagrama de Pareto estandarizado para la biomasa de *B. pumilus*.** Cada una de las barras representa el efecto estandarizado que tiene sobre el aumento de la biomasa de *B. pumilus*. Las variables representadas en azul afectan positivamente al desarrollo de biomasa de *B. pumilus*, mientras que las representadas en rojo afectan negativamente. La línea vertical negra señala el límite de la significancia.

Se puede apreciar claramente en el diagrama de Pareto, que el aumento de la temperatura ha sido el factor que más ha afectado negativamente a la producción de biomasa en el cultivo, mientras que los demás factores agitación y suplementación con glucosa y peptona, han afectado positivamente. Únicamente dos condiciones propuestas, la combinación de temperatura-glucosa, y la combinación de agitación-peptona, no han sido estadísticamente significativos en el aumento de la biomasa del cultivo. Estos datos se pueden representar de una manera gráfica que permite observar la importancia de cada una de las variables a la biomasa total del cultivo, figura 3.3.7. Además, permiten saber cuáles fueron las condiciones ideales de crecimiento para la obtención de biomasa. En este caso estas condiciones se resumen en la tabla 3.3.6.

**Tabla 3.3.6. Resultados óptimos de crecimiento mediante metodología de superficie de respuesta (MSR).** El objetivo fue la obtención del crecimiento máximo de *B. pumilus* a las 48 horas de cultivo.

Variables	Óptimo
<u>Temperatura</u>	20°C
<u>Agitación</u>	250 rpm
<u>Suplementación con glucosa</u>	1,0%
<u>Suplementación con peptona</u>	5,0%
<u>Valor de biomasa optimo (OD<sub>600</sub>)</u>	<b>17,17</b>

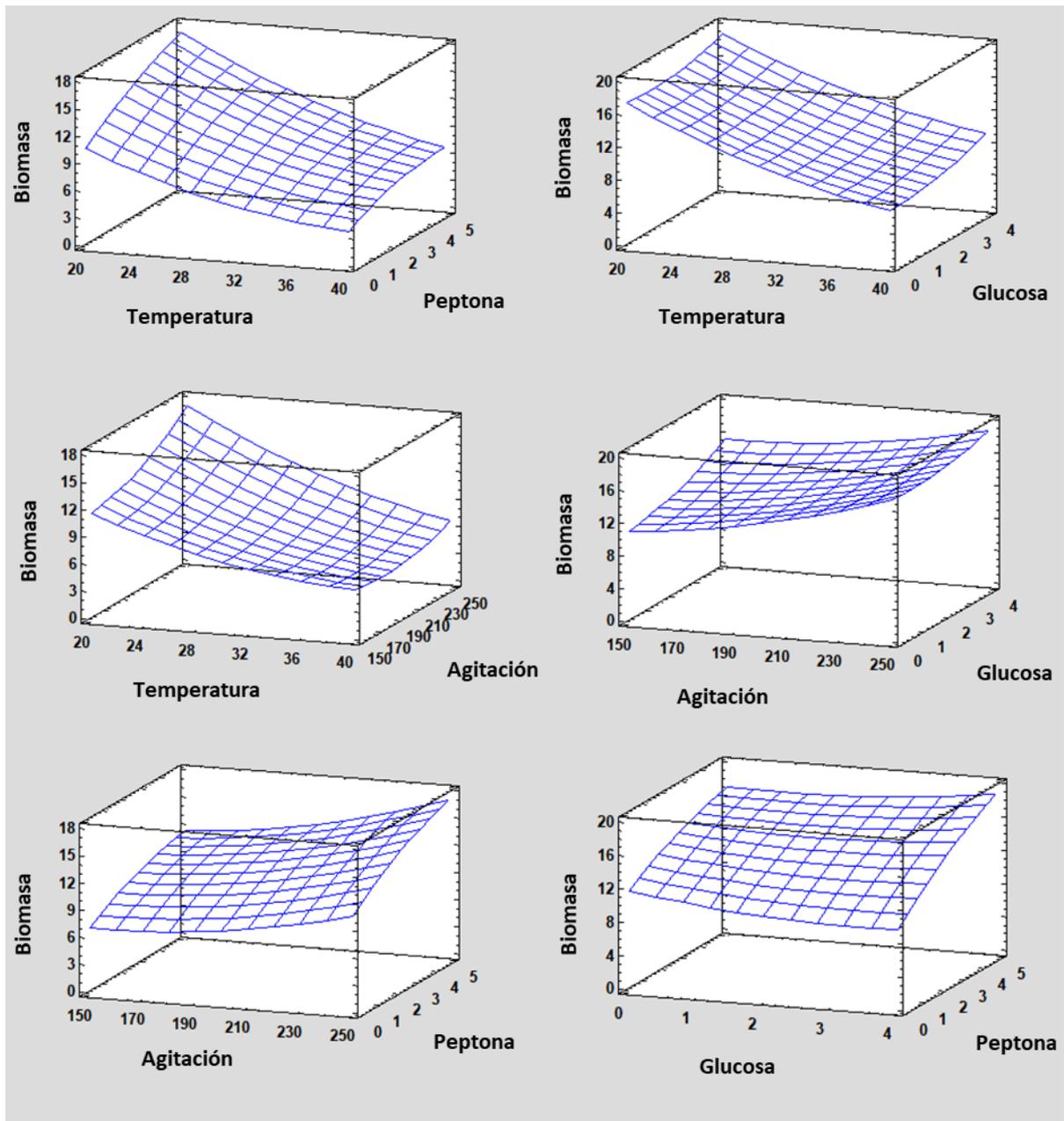


Figura 3.3.7. Diagramas de superficies de respuesta para la producción de biomasa en *B. pumilus*. Las gráficas de obtuvieron para cada par de factores manteniendo el valor óptimo para los otros dos factores.

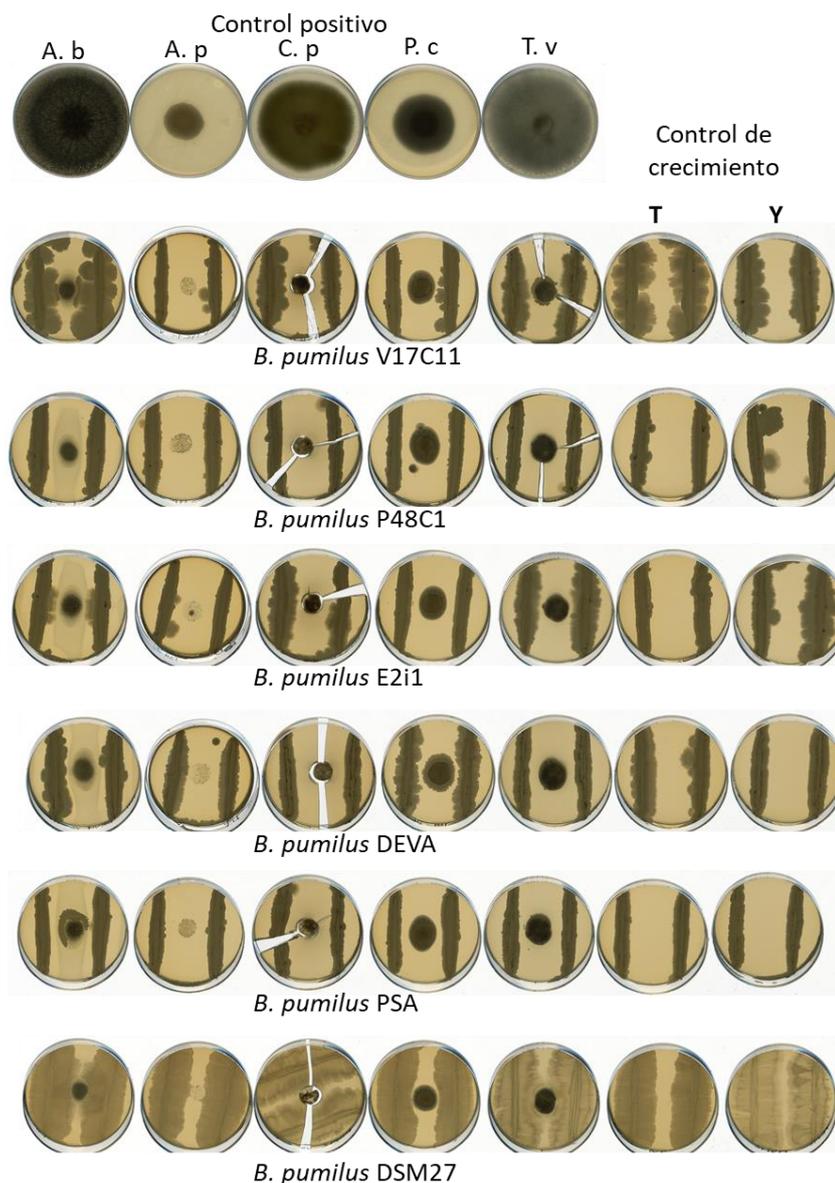
### 3.3.5. Caracterización de la capacidad antimicrobiana de *B. pumilus*

La capacidad antimicrobiana de diferentes especies dentro del género *Bacillus* es bien conocida (Sansinenea & Ortiz, 2011), convirtiéndolo en un género interesante para el control de enfermedades con impacto en la agricultura, silvicultura o acuicultura (Kuebutornye *et al.*, 2019; Nikolić *et al.*, 2019; Sajitha *et al.*, 2018). Dentro de este género la capacidad biosintética frente a hongos y bacterias de la especie *B. pumilus* le ha puesto en el foco de atención de numerosas investigaciones (Freitas-Silva *et al.*, 2020; Fulbright *et al.*, 2016; Morita *et al.*,

2019; Saggese *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2015). La capacidad antifúngica y antibacteriana de las cepas aisladas de madera en degradación se comparó frente a cepas aisladas de estructuras metálicas y se utilizó como control de la especie la cepa de colección *B. pumilus* DSM27.

### 3.3.5.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La primera evaluación de la actividad antifúngica de las cepas de *B. pumilus* testados se realizó a través de un bioensayo de antagonismo frente a especies fúngicas degradadoras de madera, como se puede ver en la figura 3.3.8.



**Figura 3.3.8. Ensayos de antagonismo de todas las cepas de *B. pumilus* testadas frente a hongos causantes de la degradación de la madera.** Panel superior: controles positivos de especie indicadora. Últimas dos placas de la derecha: controles de crecimiento del antagonista, medio TSA (T) y YEME (Y). *A. brasiliensis* (A. b), *A. pullulans* (A. p), *P. chrysogenum* (P. c), *C. puteana* (C. p) y *T. versicolor* (T. v).

Este bioensayo corrobora la capacidad antifúngica que tiene esta especie, ya que todas las cepas utilizadas tienen una alta actividad inhibitoria frente a todos los hongos testados. El crecimiento de todos los hongos se ve completamente bloqueado por las cepas de *B. pumilus*. Cabe destacar de la figura 3.3.8, que en muchos de los casos de inhibición no es necesario un contacto directo entre las cepas bacterianas y los hongos para que se de esta inhibición. Esto nos indica que la capacidad inhibitoria estaría mediada, al menos en parte, por sustancias solubles secretadas al medio o por sustancias volátiles.

### Compuestos volátiles

Así, para comprobar la capacidad de inhibición por medio de sustancias volátiles se realizó una prueba inicial frente a *Aspergillus brasiliensis*, que presenta una rápida y sencilla inoculación en los bioensayos por medio de esporas cuantificadas. Ambas placas fueron situadas una encima de la otra, con las caras donde estaban los microorganismos enfrentadas, y selladas por medio de film transparente (Morita *et al.*, 2019). Se sembró a su vez una placa de PDA con *A. brasiliensis* creciendo solo como control.

Para conocer la capacidad inhibitoria de las distintas cepas se midió el radio de crecimiento de *A. brasiliensis* a los 4 días de inoculación, y se comparó el crecimiento de este con respecto a los ensayos control, obteniendo el porcentaje de inhibición radial que ha causado cada cepa. En la figura 3.3.9 se puede observar el efecto de las sustancias volátiles en el crecimiento de *A. brasiliensis*, inhibiendo el crecimiento de esta hasta casi un 40% en el caso de *B. pumilus* P48C1. La capacidad inhibitoria de las cepas silvestres es parecida entre 37%-40%, mientras que la cepa de colección tiene una capacidad mucho más moderada, 17%.

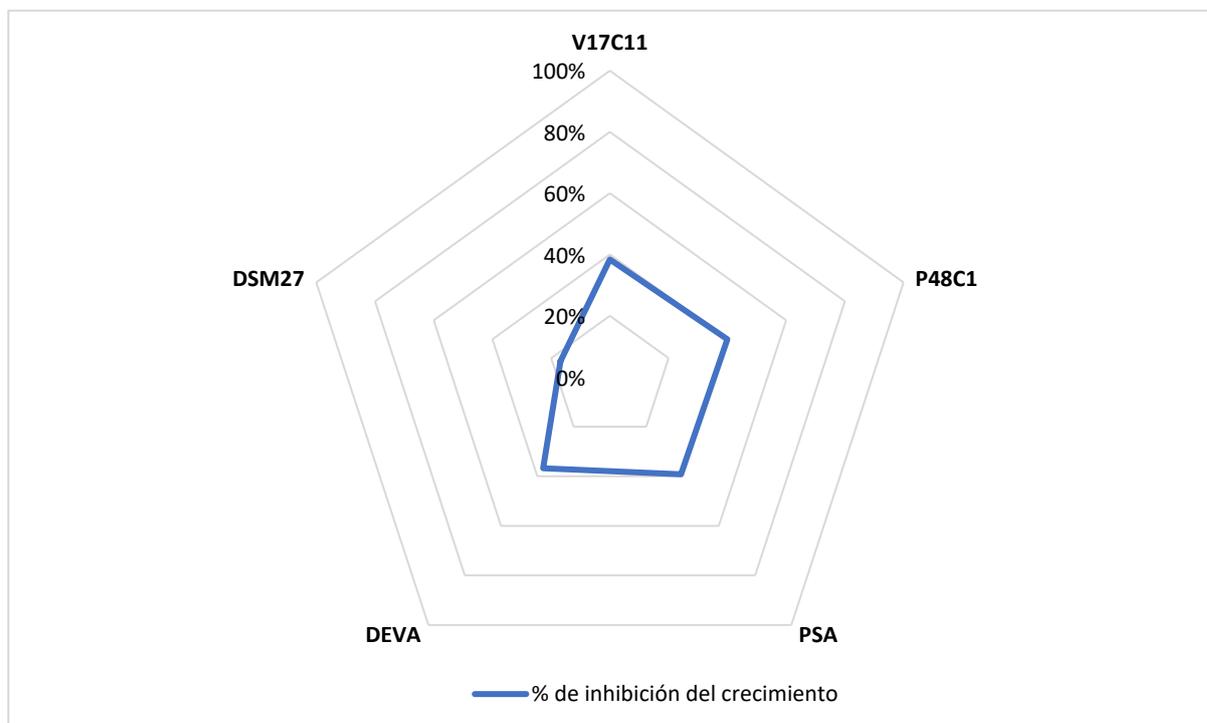
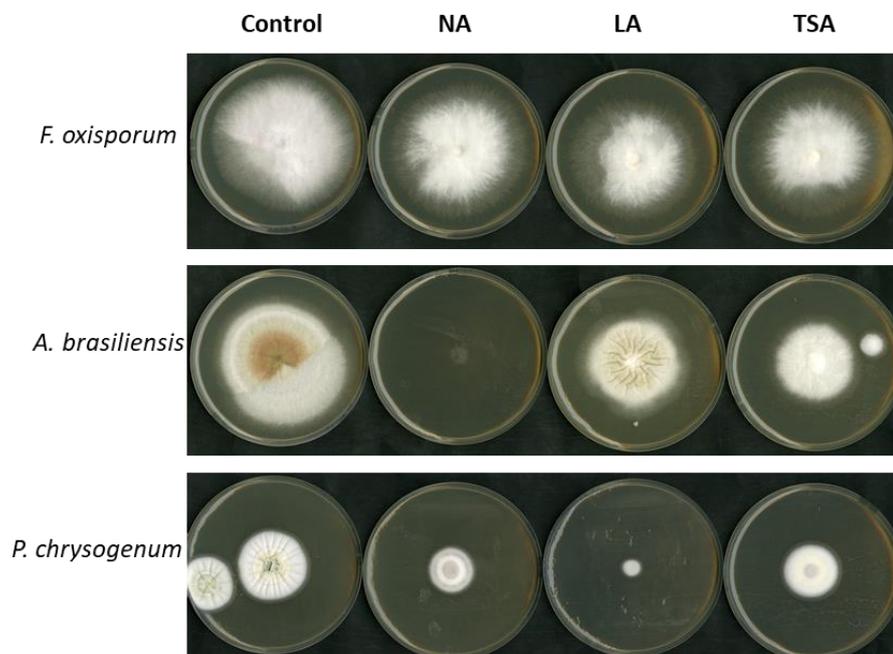


Figura 3.3.9. Ensayos de inhibición expresados en porcentaje por sustancias volátiles de las distintas cepas de *B. pumilus* frente a *A. brasiliensis*.

Se comprobó de la misma manera si esta capacidad de inhibición del crecimiento de los hongos está influenciada por el medio de cultivo, por ello se sembró *B. pumilus* P48C1 en tres medios distintos, tanto en el crecimiento inicial de la cepa en medio líquido (NB, TSB y LB) como en medio sólido (NA, TSA y LA), y se enfrentó a *A. brasiliensis*, *F. oxysporum* y *P. chrysogenum*, los resultados se pueden ver en la figura 3.3.10 y 3.3.11



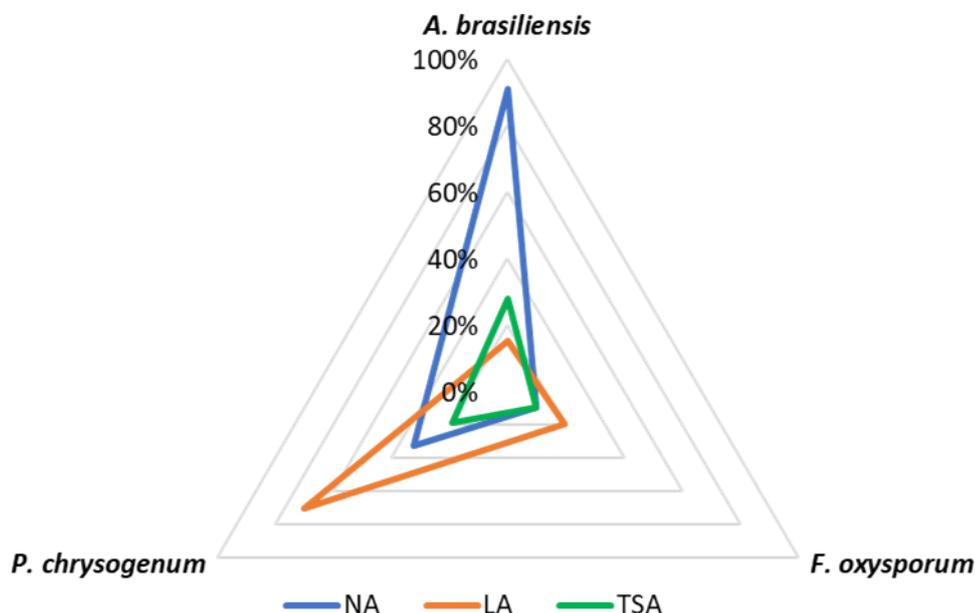
**Figura 3.3.10. Ensayos de inhibición por sustancias volátiles de *B. pumilus* P48C1 creciendo en distintos medios.** Imágenes de los ensayos. Los medios usados fueron *Nutrient Agar* (NA), *Luria-Bertani Agar* (LA) y *Tryptone Soy Agar* (TSA).

En este caso, se observó una clara diferencia dependiendo del medio que se utilice para realizar el ensayo de inhibición, además, queda patente que los volátiles secretados por *B. pumilus* son capaces de inhibir distintas especies fúngicas como *P. chrysogenum* o *F. oxysporum*.

En la figura 3.3.10, se puede apreciar que la cepa de *B. pumilus* utilizada es capaz de inhibir el crecimiento de los hongos, en algunos casos, esta inhibición fue casi completa, observándose en la placa únicamente el sitio de inoculación del hongo marcador, como es el caso de *A. brasiliensis* en NA y *P. chrysogenum* en LA. También es interesante señalar, que la inhibición del crecimiento no es la única forma en la que los compuestos volátiles afectan al crecimiento de los hongos, en el caso de *A. brasiliensis* y *P. chrysogenum* se pueden ver claras diferencias en la morfología de la colonia en todos los casos, mientras que las colonias de *F. oxysporum* se mantienen estables variando únicamente el radio de esta.

Esta inhibición se presenta de forma gráfica en la figura 3.3.11. Existe una gran variación del crecimiento de los hongos dependiendo del medio de cultivo empleado. Esto puede señalar la producción de distintos compuestos volátiles en los diferentes medios, y que estos afecten de forma selectiva a las cepas fúngicas indicadoras.

Dentro de estos resultados se destaca la alta inhibición que se ha producido en *A. brasiliensis* cuando *B. pumilus* crecía en NA, y la alta inhibición de *P. chrysogenum* cuando *B. pumilus* crecía en LA.



**Figura 3.3.11. Ensayos de inhibición por sustancias volátiles de *B. pumilus* P48C1 creciendo en distintos medios.** Diagrama radial representando el porcentaje de inhibición producido por los compuestos de *B. pumilus*. Los medios usados fueron Nutrient Agar (NA), Luria-Bertany Agar (LA) y Tryptone Soy Agar (TSA).

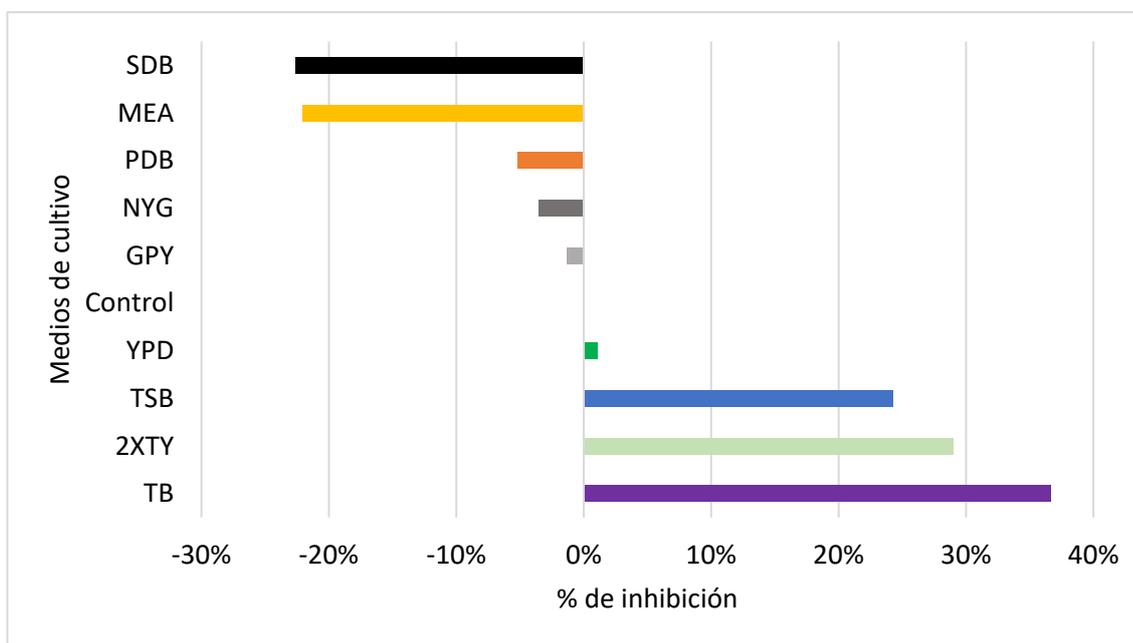
La presencia de compuestos volátiles en cepas de *B. pumilus* ha sido demostrada en varias ocasiones, donde los compuestos volátiles que generan son capaces de inhibir diversas cepas fúngicas, en lo que respecta a la diferencia de medios, se ha demostrado la producción de diferentes volátiles dependiendo del medio (Morita *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2013). En el estudio diseñado por Morita *et al.* (2019) identifican 32 diferentes compuestos volátiles de *B. pumilus*, siendo 8 de estos responsables de la inhibición del crecimiento de *Penicillium italicum*. La alta inhibición por medio de volátiles también se encuentra presente en este estudio, lo que demuestra la efectividad de estos compuestos para dificultar el crecimiento fúngico.

### Compuestos solubles

Por otro lado, la capacidad de generar compuestos al medio de cultivo se testó a través del cultivo de las cepas de *B. pumilus* en medio líquido y posterior análisis su capacidad inhibitoria.

Primero se evaluó la capacidad inhibitoria de *B. pumilus* frente a *A. brasiliensis* en los diferentes medios de cultivo probados [TB (*Terrific Broth*), GPY (*Glucose Yeast Peptone Broth*), YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Broth*), 2xTY (*Tryptone Yeast Extract Broth*), TSB (*Tryptone Soy Broth*), MEA (*Malt Extract Agar*), SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), NYG y LB (*Luria-Bertani Broth*)]. Para ello, se mezcló el sobrenadante, previamente esterilizado por filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ), con TSA 2% en una dilución

1/5 y se sembró a *A. brasiliensis* en ellos. Como control de crecimiento se sembró *A. brasiliensis* en TSA 2%, los resultados se recogen en la figura 3.3.12.



**Figura 3.3.12. Ensayo de inhibición de *A. brasiliensis* por compuestos solubles de *B. pumilus* comparando diferentes medios de cultivo.** TB (*Terrific Broth*), GPY (*Glucose Yeast Peptone Broth*), YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Broth*), 2xTY (*Tryptone Yeast Extract Broth*), TSB (*Tryptone Soy Broth*), MEA (*Malt Extract Agar*), SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), NYG y LB (*Luria-Bertani Broth*).

En la figura 3.3.12 destaca la inhibición producida cuando *B. pumilus* crece en TB, 2xTY y TSB. Esta capacidad inhibitoria del 37% en el caso de TB puede ser atribuida a los compuestos antifúngicos secretados al medio de cultivo. Además, estos datos coinciden con la capacidad de crecimiento de *B. pumilus*, que como se mostró en la figura 3.3.1 era máxima en TB. Por otro lado, en medios normalmente utilizados para el cultivo de hongos (PDB, SDB, NYG y GPY) existe un mayor crecimiento de *A. brasiliensis* (inhibiciones negativas). Esto puede deberse al pobre crecimiento que tubo *B. pumilus* en esos medios (figura 3.3.1), y por otro lado al aporte de nutrientes a *A. brasiliensis* al mezclar estos medios de cultivo con TSA 2%.

Una vez seleccionado el medio de cultivo donde realizar los demás ensayos, se testaron las diferentes cepas seleccionadas, figura 3.3.13.

Como ocurría en el caso de los compuestos volátiles (figura 3.3.9) la capacidad inhibitoria de las cepas silvestres es superior a la cepa de colección. Entre las cepas testadas la capacidad inhibitoria de *B. pumilus* V17C11, P48C1 y DEVA es muy parecida siendo superior al 60% de inhibición de crecimiento de *A. brasiliensis*, mientras que la cepa de colección DSM27 y la cepa PSA presentaron capacidades inhibitorias inferiores, menores al 50% de inhibición el crecimiento de *A. brasiliensis*. Por ello, el resto de experimentos se continuaron con la cepa V17C11.

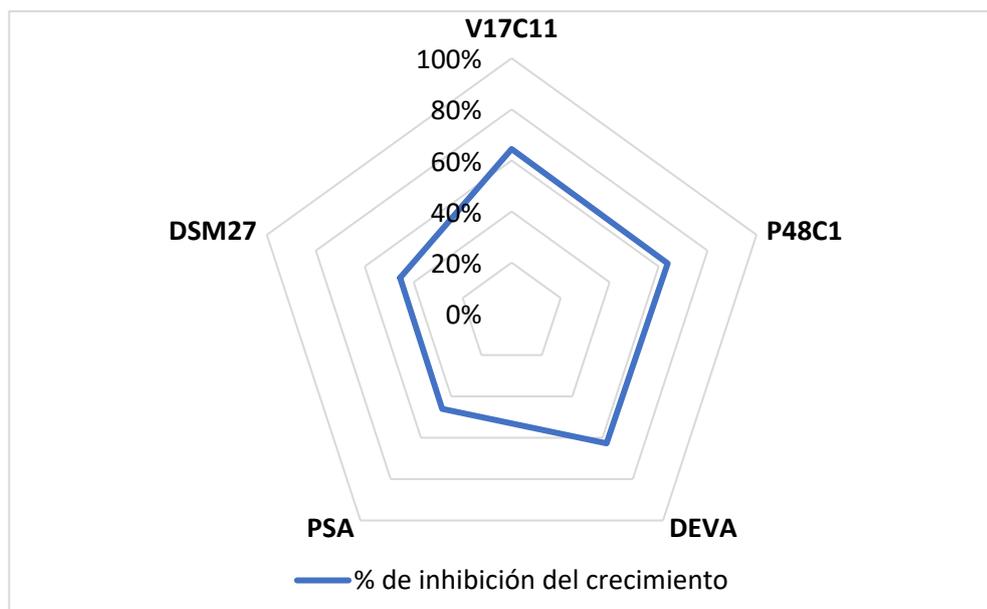


Figura 3.3.13. Ensayo de inhibición de *A. brasiliensis* por sustancias solubles comparando diferentes cepas de *B. pumilus*. El medio utilizado fue TB.

Atendiendo a lo observado en los matraces indentados, un crecimiento superior de las cepas de *B. pumilus* (figura 3.3.2), se quiso averiguar si este mayor crecimiento estaba relacionado con una inhibición del crecimiento de *A. brasiliensis* aumentada. Como se puede observar en la figura 3.3.14, este mayor crecimiento sí que parece estar relacionado con una mayor actividad antifúngica, siendo la inhibición producida bastante mayor que en el caso de los matraces lisos.

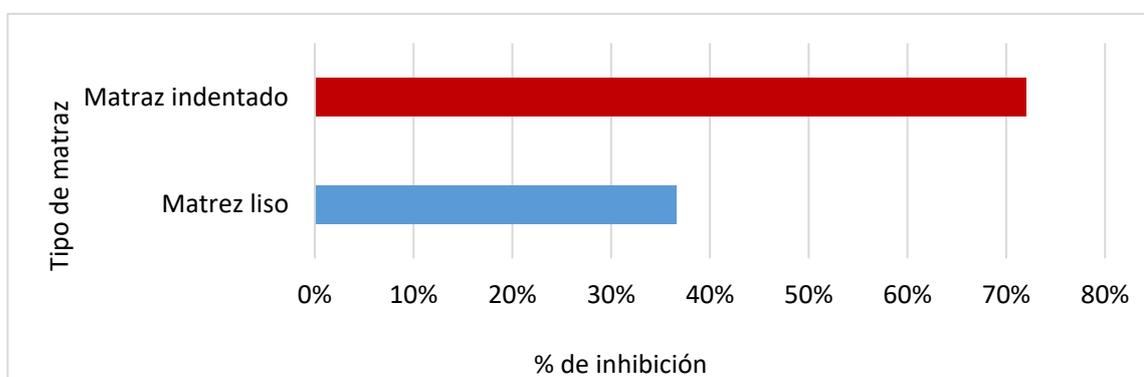


Figura 3.3.14. Ensayo de inhibición frente a *A. brasiliensis* por sustancias solubles de *B. pumilus* comparando diferentes tipos de matraces. El medio utilizado fue TB y la cepa *B. pumilus* V17C11.

Esta capacidad inhibitoria del sobrenadante del cultivo de *B. pumilus* creciendo en matraces indentados fue además testada con otras cepas fúngicas degradadoras de madera (*P. chrysogenum*, *T. versicolor* y *C. puteana*) (figura 3.3.15).

La gran capacidad de inhibición que presentaba el sobrenadante de *B. pumilus* frente a la mayoría de los hongos, con una inhibición del 100% en el caso de *T. versicolor* y *C. puteana* concordaba con el gran crecimiento de *B. pumilus* que existía en este medio de cultivo. No obstante, las complicaciones técnicas que presentaba el uso de este sobrenadante descartaron

el uso de matraces indentados en los siguientes experimentos. Estas dificultades fueron debido a que la gran densidad óptica de los cultivos junto con un aumento de la viscosidad del medio, lo que hacía muy difícil su completa esterilización por medio de filtración.

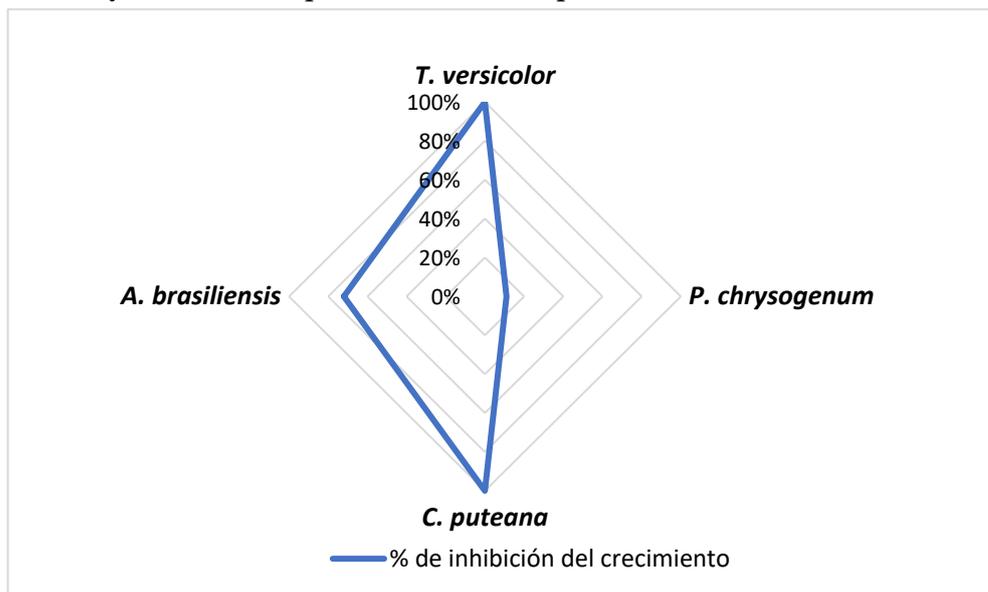


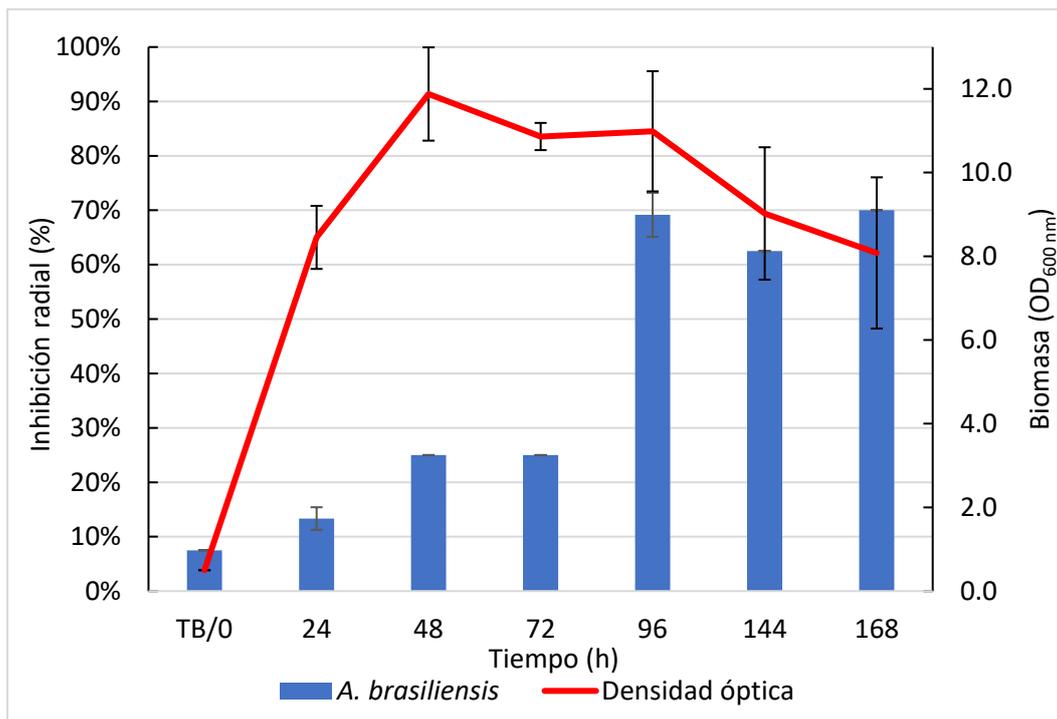
Figura 3.3.15. Ensayo de inhibición frente a *A. brasiliensis*, *C. puteana*, *P. chrysogenum* y *T. versicolor* por sustancias solubles de *B. pumilus* creciendo en matraz indentado. El medio utilizado fue TB y la cepa *B. pumilus* V17C11.

Para completar la caracterización de la capacidad antifúngica de *B. pumilus* se realizó una comparación de la capacidad inhibitoria del sobrenadante del cultivo a diferentes horas, viendo que la capacidad máxima de inhibición se sitúa a las 96 horas de cultivo. Para completar esta visión se comparó la capacidad inhibidora a diferentes tiempos con densidad óptica del cultivo y la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante, figuras 3.3.16 y 3.3.17.

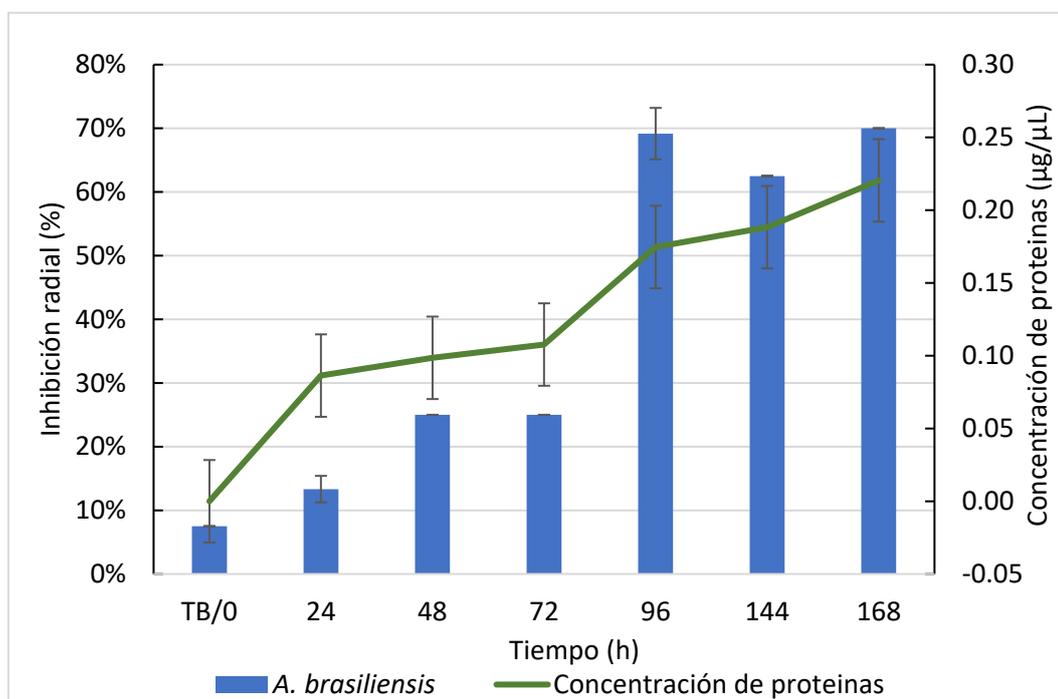
Se puede observar como existe un aumento de la capacidad inhibidora a medida que aumenta las horas y la biomasa del cultivo, hasta las 96 horas, donde el cultivo empieza a decaer y la capacidad inhibidora aumenta considerablemente. Esto parece indicar que la síntesis de sustancias antifúngicas se da en las primeras etapas de la fase de muerte de *B. pumilus*.

Esto coincide con lo que se ve en la figura 3.3.17, en las que la concentración de proteínas en el sobrenadante aumenta a medida que aumenta las horas de cultivo, sobre todo, cuando se da la disminución de la densidad óptica del cultivo a las 96 horas. Este parece el inicio de la fase de muerte de *B. pumilus*, donde la muerte celular de las bacterias liberaría el contenido de su citoplasma aumentando la concentración de proteínas y podría liberar metabolitos tóxicos que sean restos del metabolismo, disminuyendo la densidad óptica del cultivo.

Esta alta capacidad antifúngica durante la fase de muerte ya ha sido descrita en otra especie de *Bacillus* donde eran secretadas moléculas como la miriocina que inhibían el crecimiento de una cepa de *F. oxysporum* (Xu *et al.*, 2019).



**Figura 3.3.16. Ensayo de inhibición comparando la capacidad inhibitoria de *B. pumilus* y la biomasa del cultivo.** En rojo: crecimiento de *B. pumilus* V17C11. Barra azul: porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. brasiliensis*. El medio utilizado fue TB.



**Figura 3.3.17. Ensayo de inhibición comparando la capacidad inhibitoria de *B. pumilus* la concentración de proteínas en el sobrenadante.** En verde: concentración de proteínas en el sobrenadante del caldo de cultivo donde crecía *B. pumilus* V17C11. Barra azul: porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. brasiliensis*. El medio utilizado fue TB.

### 3.3.5.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana de las diferentes cepas de *B. pumilus* fue también estudiada para completar su caracterización antimicrobiológica. Para ello se realizó un ensayo de inhibición directa frente a dos especies típicas indicadoras, una Gram – (*E. coli*) y una Gram + (*M. luteus*). Para ello se inoculó el sobrenadante previamente esterilizado en placas que contenían las bacterias indicadoras, la capacidad antibacteriana se muestra a través de un halo alrededor del pocillo, figura 3.3.18.

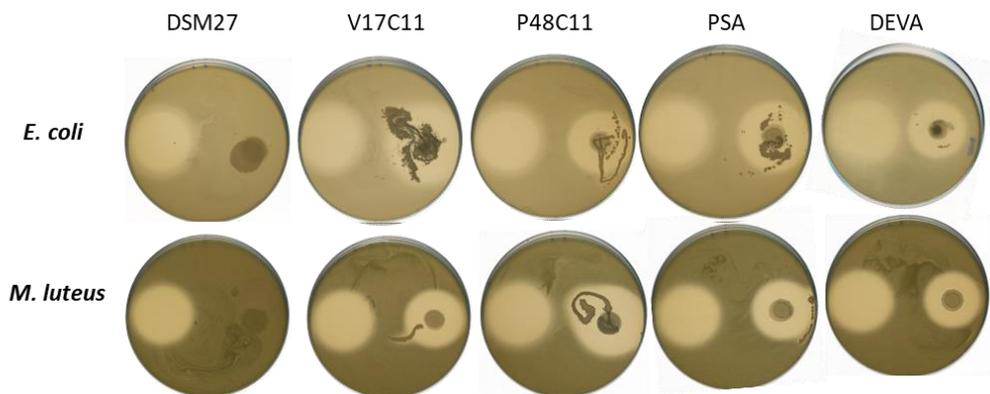


Figura 3.3.18. Ensayo de inhibición bacteriana por parte de las cepas de *B. pumilus*. Parte izquierda de la placa, control positivo. Parte derecha, cepas de *B. pumilus*.

Tanto en la figura 3.3.18 como en la figura 3.3.19, se puede apreciar la diferencia en la actividad antibacteriana que presentan las cepas silvestres comparada con la cepa de colección, donde esta capacidad es nula.

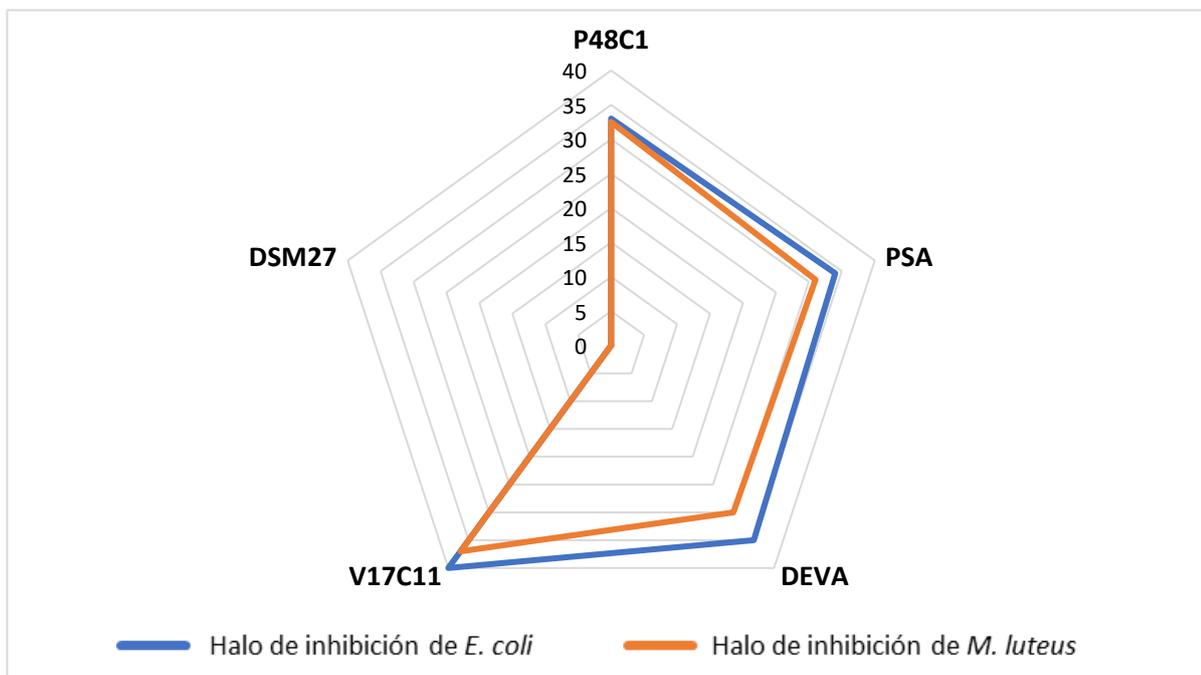


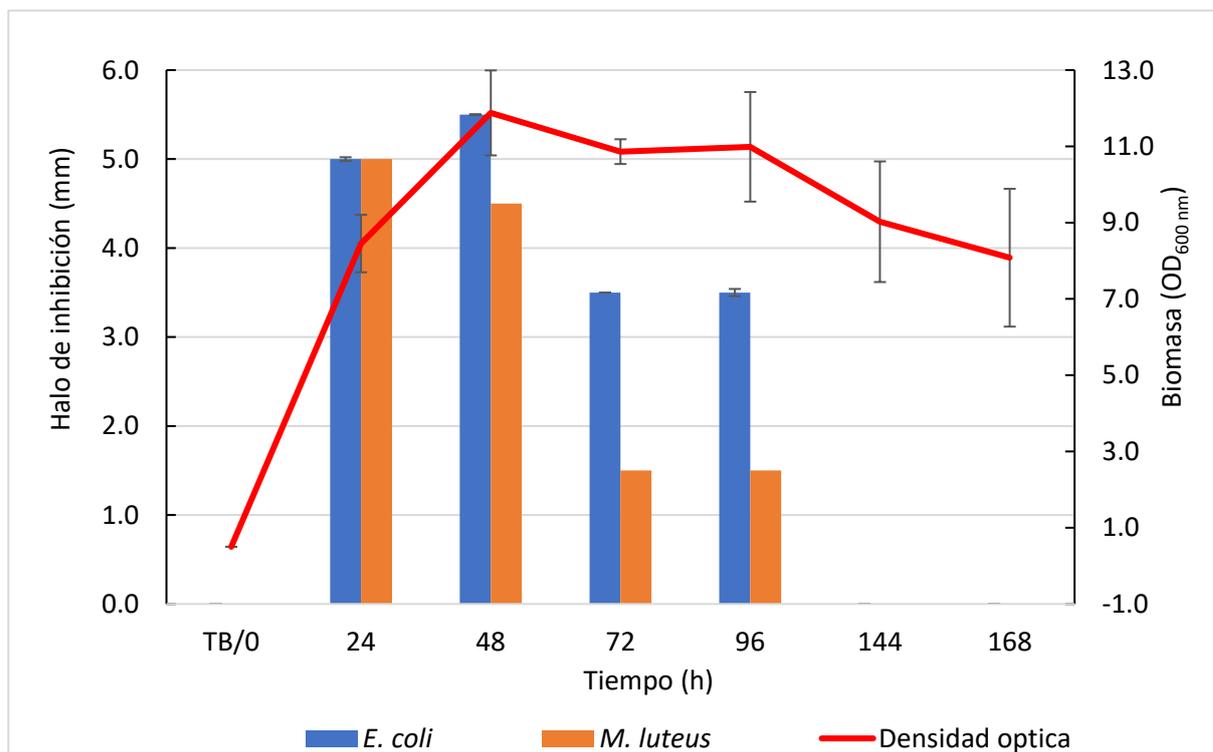
Figura 3.3.19. Representación de la medida de inhibición (mm) del ensayo de inhibición bacteriana por parte de las cepas de *B. pumilus*. Se midió el halo (mm) de inhibición que las cepas de *B. pumilus* producían en cultivos de *E. coli* y *M. luteus*.

Entre las cepas silvestres se puede ver ligeramente una mayor inhibición por parte de la cepa aislada de madera en España (V17C11), pero en general la inhibición generada por todas las cepas es parecida. En cuanto a las especies indicadoras, se ve un mayor halo en *E. coli* en todas las cepas menos en P48C1, donde los halos fueron iguales.

Por último, se comparó la capacidad de producir estos metabolitos antibacterianos a diferentes horas del crecimiento de *B. pumilus*. Como se puede observar en la figura 3.3.20, la capacidad antibacteriana se encuentra en las primeras horas de crecimiento, siendo máxima entre las 24-48 horas y completamente nula a partir de las 144 horas.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Hasan *et al.* (2009) y por Saggese *et al.* (2018) donde la síntesis de compuestos antimicrobianos se da entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento de *B. pumilus*. El estudio publicado por Saggese *et al.* se identifica a una de las moléculas responsables como pumilacidina que se incluye dentro de la familia de las surfactinas.

Es interesante señalar la diferencia de tiempos entre la capacidad antifúngica y antibacteriana que se encuentran en las cepas aisladas de madera en degradación, siendo en las primeras fases de crecimiento mayormente antibacteriana, y en las últimas fases, ya en la fase de muerte, antifúngica.



**Figura 3.3.20. Ensayo de inhibición bacteriana de *B. pumilus* V17C11 a diferentes cepas bacterianas y a distintos tiempos de cultivo.** Línea roja: crecimiento de *B. pumilus*. Barra azul: halo de inhibición en *E. coli* en milímetros. Barra marrón: halo de inhibición en *M. luteus* en milímetros.

### 3.3.6. Secuenciación y análisis genómico de cepas de *B. pumilus*

#### 3.3.6.1. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA Y DATOS GENERALES.

Con el objetivo de completar la caracterización funcional y profundizar en las actividades antimicrobianas presentes en las cepas aisladas se procedió a secuenciar y analizar el genoma de ellas. Para ello, primero se extrajo y purificó el ADN genómico de las cepas de V17C11 y P48C1 con el kit “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*”.

Se comprobó la estabilidad del genoma extraído a través de electroforesis, figura 3.3.21 y la pureza y concentración mediante el espectofotómetro tipo NanoDrop, tabla 3.3.7. Tanto la concentración como la pureza del ADN extraído fueron lo suficientemente elevadas como para poder proceder en la secuenciación de los genomas.

Tabla 3.3.7. Concentración y pureza del ADN genómico de cepas de *B. pumilus*. Medido a través de NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)

Cepa de <i>B. pumilus</i>	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
V17C11	1787,50	2,21	2,35
P48C1	1463,00	2,23	2,34

Al observar el ADN genómico se puede apreciar que no está degradado. Además, se puede ver la presencia de un plásmido en la cepa V17C11 (figura 3.3.21).

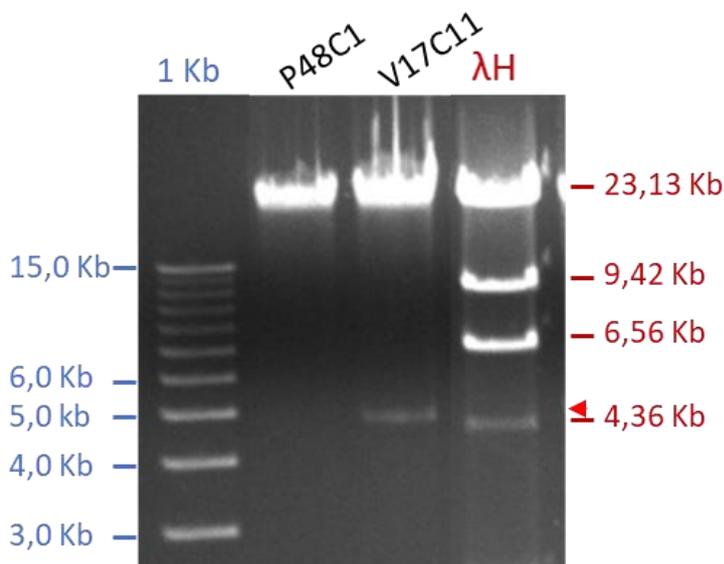


Figura 3.3.21. Electroforesis de los DNA genómicos extraídos de cepas de *B. pumilus*. El plásmido está marcado a la derecha con una punta de flecha roja. Como marcadores se usaron 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) y fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Hind*III.

Una vez comprobada la integridad y pureza de los genomas extraídos fueron mandados a SINTEF (Thronheim, Noruega) para su secuenciación. El proceso de secuenciación se realizó

por medio de dos secuenciadores. Por un lado, Illumina MiniSeq, con el que se obtienen lecturas cortas de extremos emparejados con una media de 300 pb y muy alta precisión (De Maio *et al.*, 2019). Por otro lado, *Oxford Nanopore Technologies MinION* (MinION), que es capaz de secuenciar grandes lecturas de hasta 100 kb, pero con menos precisión (Laver *et al.*, 2015). La utilización de ambos equipos de secuenciación permite obtener genomas híbridos completos con más información y más precisa que utilizando un único sistema (Neal-McKinney *et al.*, 2021). Con ello se obtuvieron las secuencias desde ambos equipos, cuyos resultados se resumen en la tabla 3.3.8 y 3.3.9.

**Tabla 3.3.8. Datos de secuenciación por Illumina MiniSeq de las cepas de *B. pumilus*.**

<b>Cepas de <i>B. pumilus</i></b>	<b>V17C11</b>	<b>P48C1</b>
Número de contigs	49	79
Número total de lecturas	4.700.604	2.174.411
Media de longitud de lecturas	204,15	170,5
Longitud total leída	959.627.727	370.727.662
Media de longitud de contig	73.167	45.377
Longitud total de contig	3.585.213	3.584.786
% de GC	41,84	41,86
<b>Cobertura</b>	<b>267,7X</b>	<b>103,4X</b>

Los datos obtenidos por la secuenciación por Illumina MiniSeq proporcionan un gran número de lecturas (media 3.437.507) con una longitud media de 187,3 pb.

**Tabla 3.3.9. Datos de secuenciación por *Oxford Nanopore Technologies MinION* de las cepas de *B. pumilus*.**

<b>Cepas de <i>B. pumilus</i></b>	<b>V17C11</b>	<b>P48C1</b>
Longitud total leída	731.368.571	1.322.061.165
Numero de lecturas	146.362	142.206
Media	4.997	9.296
Mediana	2.535	5.800
Máxima	140.780	132.984
<b>Cobertura</b>	<b>201,9X</b>	<b>366,1X</b>

En cambio, los datos de MinION dan un numero moderado de lecturas, de media 144.284 con longitudes de lectura mucho mayores, de media 7.146, y lecturas máximas de hasta 140.780 pares de bases. Todo ello resulto en una cobertura media de 284X.

El ensamblaje de los datos obtenidos a través de ambas secuenciaciones se realizó por medio de *Unicycler version 0.4.4*, dando finalmente un solo contig para cada cepa. La diferencia entre ambos cromosomas es de 18.173 pares de bases, siendo el de P48C1 mayor. Como se había visto al visualizar en ADN genómico en el gel de electroforesis la cepa V17C11 contiene un plásmido

de 7,240 pares de bases, estando éste ausente en la otra cepa. Estos datos se agrupan en la tabla 3.3.10.

**Tabla 3.3.10. Datos generales de las secuencias ensambladas de las cepas de *B. pumilus*.**

Cepas de <i>B. pumilus</i>	P48C1	V17C11
Cromosoma (pb)	3.621.790	3.603.617
Plásmido (pb)	0	7.240
Total (pb)	3.621.790	3.610.857
Cobertura	304,3X	631,8X

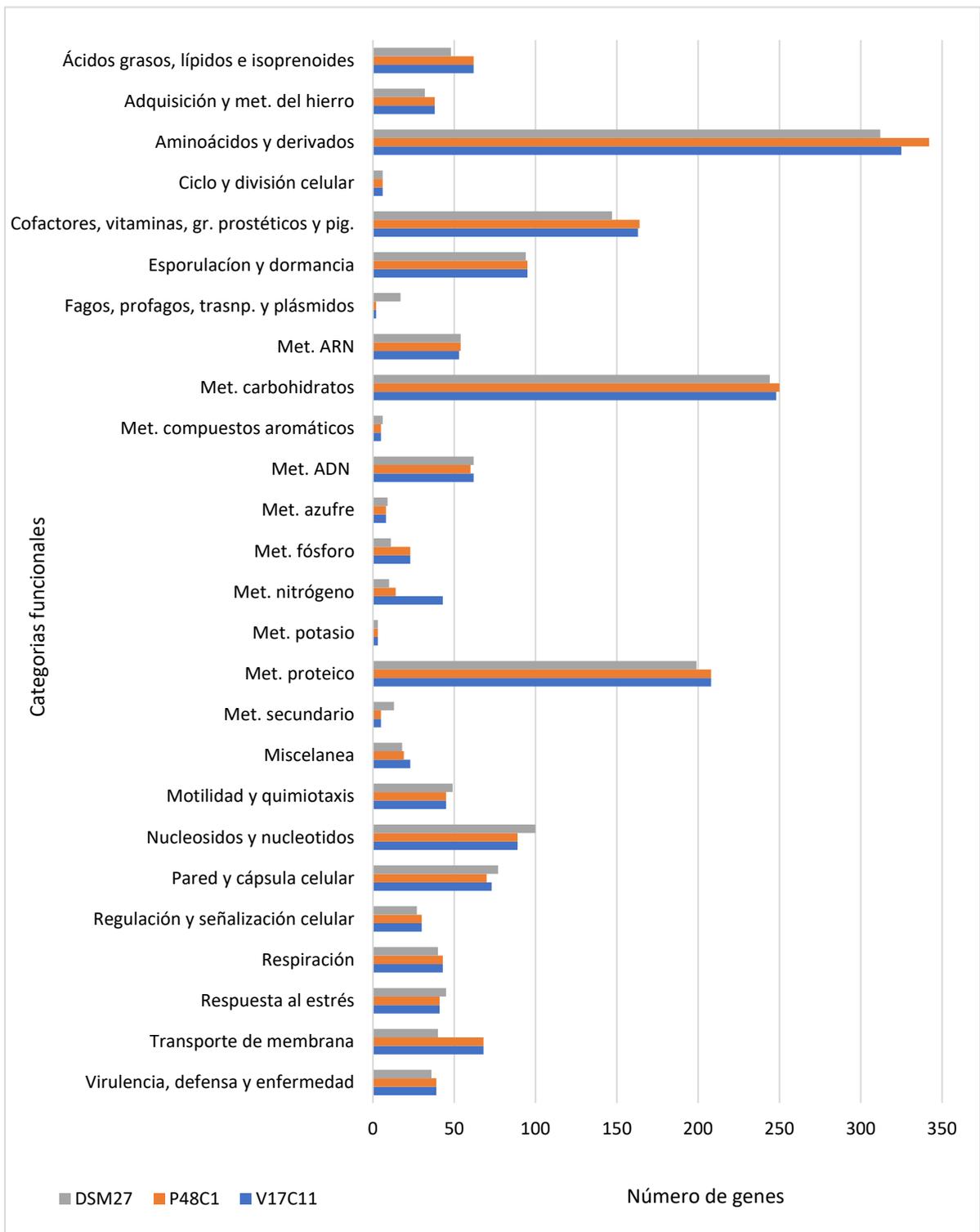
Para poder comparar las cepas, como ya se había estado haciendo en la caracterización antimicrobiana, se secuenció la cepa DSM27, de la misma forma que las anteriores.

El proceso de anotación de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*), tabla 3.3.11. Donde se pueden observar diferencias sobre todo entre DSM27 y las cepas silvestres, tanto en el tamaño del genoma, como en el número de genes que codifican para proteínas.

**Tabla 3.3.11. Resumen de características principales de los genomas de *B. pumilus*. Anotación a través de RAST.**

	Cepas de <i>B. pumilus</i>		
	DSM27	V17C11	P48C1
Tamaño (PB)	3.860.957	3.610.857	3.621.790
GC%	41,7	41,9	41,9
Genes que codifican proteínas (CDS)	4.048	3.713	3.723
Repeticiones	66	50	53
tRNA	81	81	81
5S RNA	8	8	8
16S RNA	8	8	8
23S RNA	8	8	8

Al realizar las anotaciones de los genes a través de RAST estos se clasificaron según categorías funcionales (Aziz *et al.*, 2008). Este sistema de clasificación de genes dividió los genes codificantes de proteínas en 26 categorías distintas. En las tres cepas analizadas las categorías que agrupaban la mayor parte de los genes fueron las mismas: aminoácidos y derivados, carbohidratos y metabolismo proteico, los resultados de la comparación entre las tres cepas se resumen en la figura 3.3.22.



**Figura 3.3.22. Comparación de anotaciones de RAST de los genomas de las cepas de *B. pumilus*.** Abreviaturas: met. (metabolismo), gr. prostéticos (grupos prostéticos), pig. (pigmentos) y transp. (transposones).

Las características de las cepas analizadas coinciden con otros genomas publicados de diferentes cepas de *B. pumilus*, algunos ejemplos aparecen en la tabla 3.3.12, donde el tamaño

del genoma se sitúa entre 3,61 y 3,94, el porcentaje de GC entre 41,2 y 42,0 y el número de CDS entre 3.278 y 3.910.

**Tabla 3.3.12. Genomas de cepas de *B. pumilus* usados en el análisis filogenético.** Se selecciono aquellos genomas que habían sido completamente secuenciados en un único *contig*.

Especie	Cepa	Ensamblado	Mb	GC%	CDS	Referencia
<i>B. pumilus</i>	MTCC B6033	GCA_000590455.1	3,76	41,40	3723	(Villanueva <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. pumilus</i>	150a	GCA_003571425.1	3,75	41,40	3642	(Zarza <i>et al.</i> , 2018)
<i>B. pumilus</i>	TUAT1	GCA_001548215.1	3,72	41,40	3708	(Okazaki <i>et al.</i> , 2019)
<i>B. pumilus</i>	AR03	GCA_020520205.1	3,66	41,80	3574	-
<i>B. pumilus</i>	ZB201701	GCA_004006455.1	3,64	41,90	3567	(Zhang <i>et al.</i> , 2019)
<i>B. pumilus</i>	EB130	GCA_019710455.1	3,61	41,80	3448	-
<i>B. pumilus</i>	SAFR-032	GCA_000017885.4	3,70	41,30	3606	(Stepanov <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. pumilus</i>	SF-4	GCA_009937765.1	3,77	41,20	3702	(Iqbal <i>et al.</i> , 2021)
<i>B. pumilus</i>	3-19	GCA_000714495.3	3,61	42,00	3398	(Ulyanova <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. pumilus</i>	C4	GCA_001687085.1	3,66	41,40	3647	(Fellahi <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. pumilus</i>	NCTC10337	GCA_900186955.1	3,86	41,70	3814	-
<i>B. pumilus</i>	145	GCA_003431975.1	3,94	41,20	3910	(Zarza <i>et al.</i> , 2018)
<i>B. pumilus</i>	SH-B11	GCA_001578165.1	3,86	41,30	3808	-
<i>B. pumilus</i>	UAMX	GCA_013423765.1	3,85	41,70	3827	(Reyes-Cortes <i>et al.</i> , 2021)
<i>B. pumilus</i>	7P	GCA_000691485.4	3,62	41,99	3278	(Shagimardanova <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. pumilus</i>	SH-B9	GCA_001578205.1	3,88	41,46	3850	-
<i>B. pumilus</i>	PDSLzg-1	GCA_001704975.1	3,71	41,99	3652	(Hao <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. pumilus</i>	NDY-10	GCA_024498355.1	3,74	41,65	3674	n/a
<i>B. pumilus</i>	ONU 554	GCA_014489355.1	3,74	41,75	3701	(Іваниця <i>et al.</i> , 2020)
<i>B. pumilus</i>	BIM B-171	GCA_020535425.1	3,82	41,69	3821	(Evdokimova <i>et al.</i> , 2018)

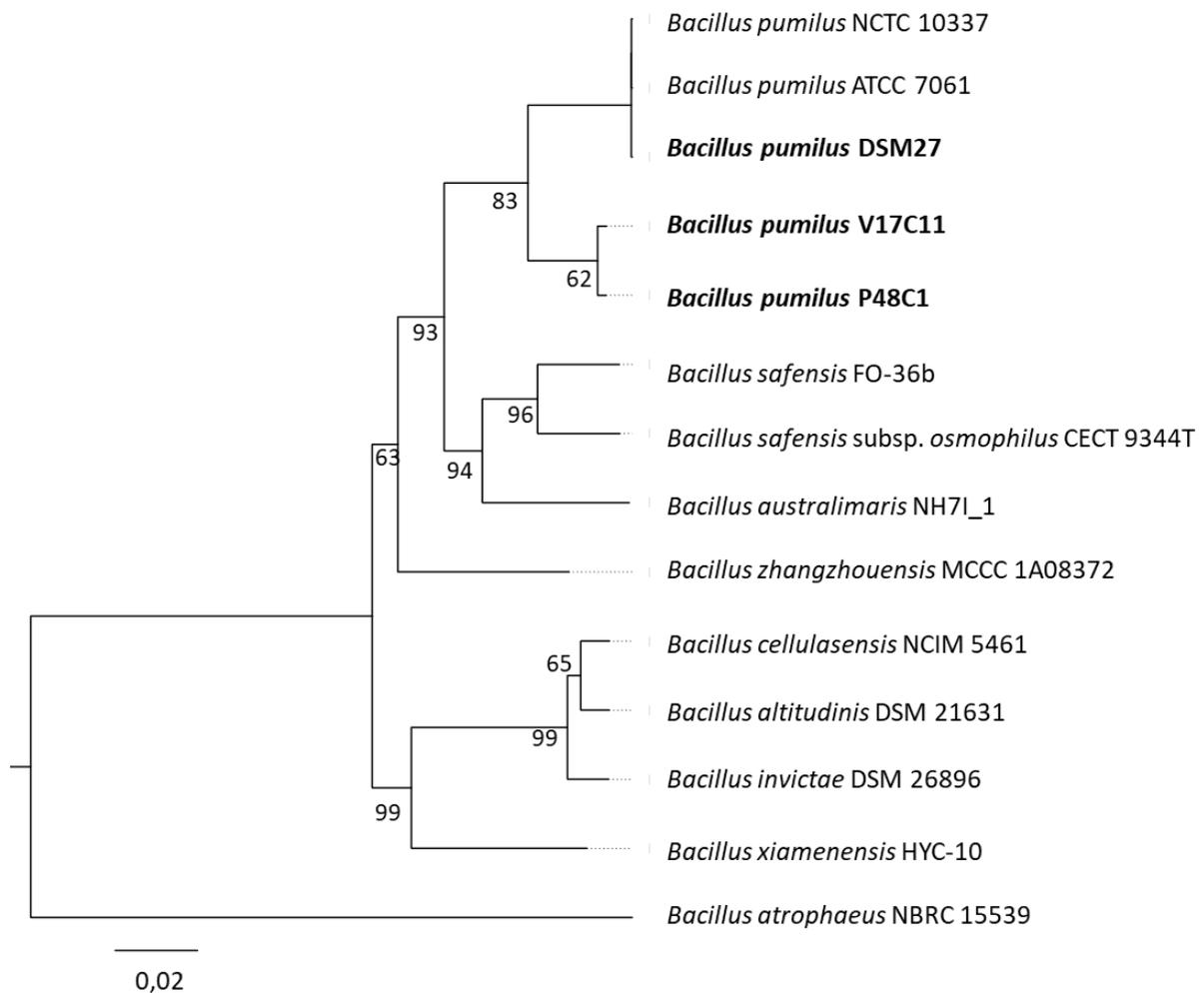
### 3.3.6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y TAXONÓMICO DEL GENOMA DE LAS CEPAS

Las cepas aisladas de madera en degradación habían sido identificadas previamente secuenciando su 16S. No obstante, para conocer mejor y caracterizar filogenéticamente estas cepas se realizó un árbol filogenético comparándolas con cepas tipo de *Bacillus* spp. a través de *Type Strain Genome Server* obteniendo la figura 3.3.23.

El análisis realizado a través del árbol filogenético muestra claramente la pertenencia de las especies secuenciadas a *B. pumilus*. A su vez, también demuestra que la cepa DSM27 es la misma que la cepa de colección ATCC 7031 y que NCTC 10337.

Finalmente, se compararon los genomas de las cepas aisladas con una muestra de las secuencias de los genomas completos de *B. pumilus* (tabla 3.3.12) publicados hasta el momento (figura 3.3.24).

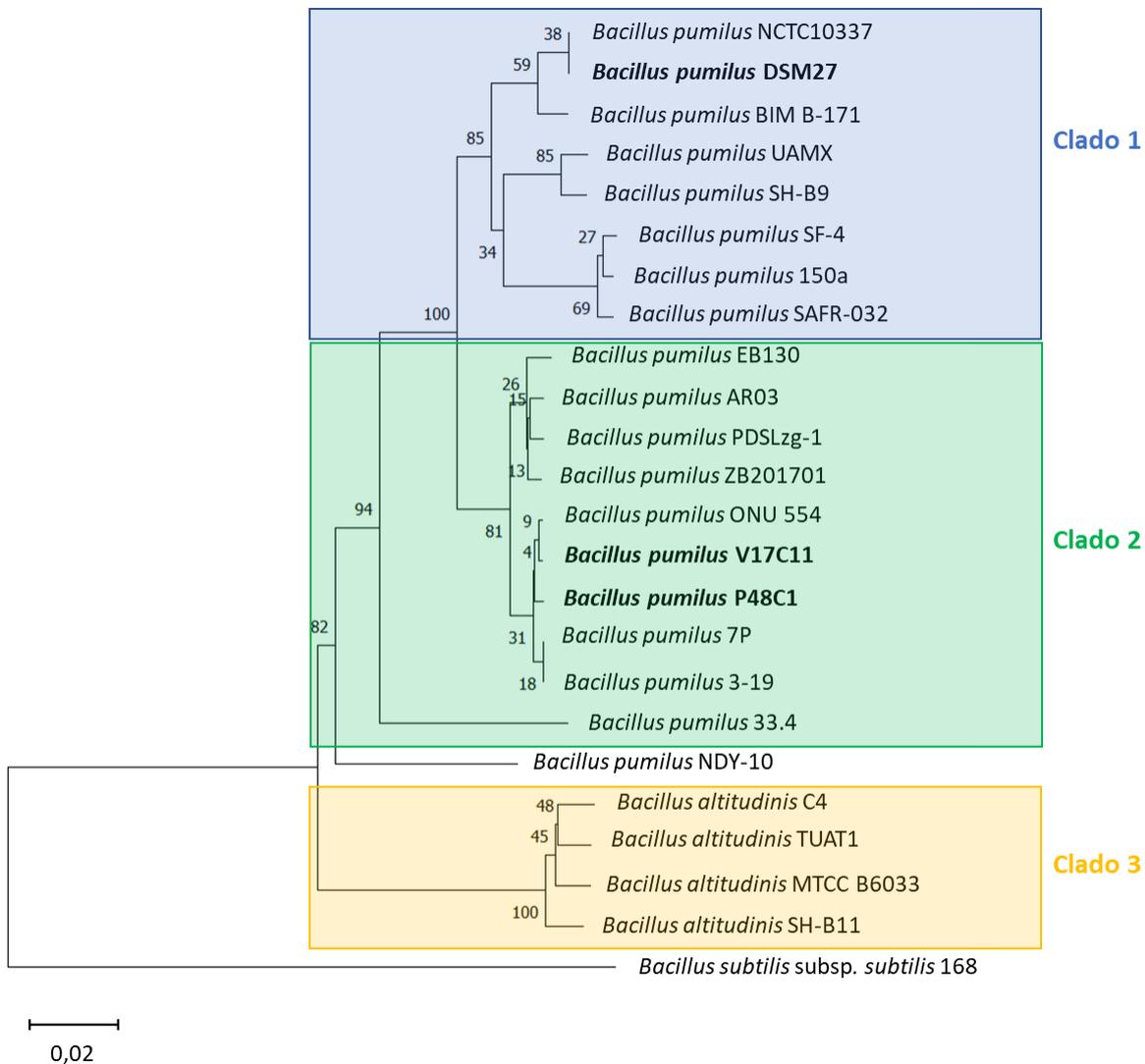
En el árbol resultante se puede apreciar que todas las cepas secuenciadas de *B. pumilus* son bastante parecidas a nivel de genoma.



**Figura 3.3.23** Árbol inferido mediante el software FastME 2.1.6.1 a partir de distancias GBDP (Lefort *et al.*, 2015). Las longitudes de las ramas están escaladas en términos de la fórmula de distancia GBDP  $d_5$ . Los números anteriores a las ramas son valores de soporte de GBDP pseudo-bootstrap > 60 % de 100 réplicas, con un soporte de sucursal promedio de 83,8 %. El árbol estaba enraizado en el punto medio (Meier-Kolthoff & Göker, 2019).

Atendiendo a lo publicado por Wang *et al.* (2022), las cepas analizadas se podrían clasificar en tres clados. Clasificando a la cepa DSM 27 en el clado 1, junto a otras cepas de colección como NCTC10337, otra cepa considerada de referencia como *B. pumilus* SAFR-032, cepa aislada en la estación espacial. Mientras, las cepas aisladas de madera en degradación se situarían en el clado 2, junto a otras cepas salvajes aisladas de diferentes lugares como *B. pumilus* PDSLzg-1, de tierra contaminada de petróleo, *B. pumilus* ARO3 de tabaco, *B. pumilus* ONU 554, de sedimentos del Mar Negro (Hao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Іваниця *et al.*, 2020). Y todas ellas separadas del clado 3, donde se encontraría cepas como *B. pumilus* TUAT1 de tierra en Japón o *B. pumilus* SH-B11 procedente de la rizosfera en Países Bajos (Win *et al.*, 2019). Este último clado ha sido renombrado hace poco por el estudio de Bach *et al* a *B. altitudinis* (Bach *et al.*, 2022), no obstante las secuencias permanecen en el NCBI como *B. pumilus*. La única cepa que quedaría fuera de este análisis sería la cepa *B. pumilus* NDY-10,

aislada de muestras de tierra de un patio de almacenamiento de carbón en la provincia de Mongolia del Interior (China).

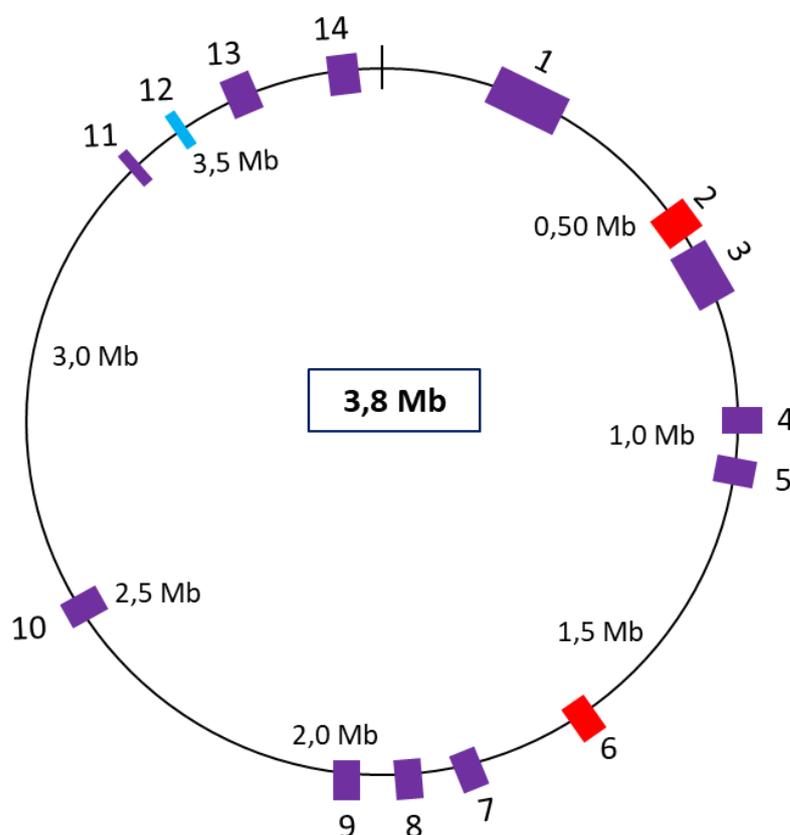


**Figura 3.3.24. Árbol inferido con FastME 2.1.6.1 a partir de distancias GBDP calculadas a partir de secuencias genómicas**(Lefort *et al.*, 2015). Las longitudes de las ramas están escaladas en términos de la fórmula de distancia GBDP d5. Los números anteriores a las ramas son valores de soporte de GBDP pseudo-bootstrap > 60 % de 100 replicaciones, con un soporte de sucursal promedio de 49,5 %. El árbol estaba enraizado en el punto medio. [La clasificación en los diferentes clados fue establecida según lo descrito en los estudios de Bach *et al.* (2022), Iqbal *et al.* (2021) y Wang *et al.* (2022)].

No parece haber ninguna relación en la procedencia de los *B. pumilus*, ya que todos ellos proceden de diversas partes del mundo. En cuanto a las cepas más cercanas a las aisladas de madera en degradación, ninguna de las dos procede ni de bosques ni de materia vegetal. Por lo que se puede descartar una relación en cuanto a la procedencia de las muestras.

### 3.3.6.3. GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO SECUNDARIO

Para la predicción de grupos génicos biosintéticos (BGCs) asociados a la producción de metabolitos secundarios se analizó el genoma de las tres cepas a través del software antiSMASH (Blin *et al.*, 2021). De las cepas silvestres secuenciadas V17C11 y P48C1 se identificaron las mismas 12 agrupaciones génicas, que se dividen en: 2 NRPS (sintetasas de péptidos no ribosomales), 1 policétido sintasa tipo 3 (PKS III), 1 híbrido NRPS- PKS I (híbrido NRPS-policétido sintasa tipo I), 3 terpenos, 2 betalactonas, 2 péptidos sintetizados ribosómicamente y modificado post-transcripcionalmente (RiPPs). Además de las anteriormente mencionadas, en el genoma de la cepa de colección (DSM27) se identificaron 2 agrupaciones génicas adicionales pertenecientes a RiPPs (figura 3.3.25 y tabla 3.3.13).



**Figura 3.3.25. Secuencias detectadas dentro del genoma de *B. pumilus* V17C11, P48C1 y DSM27 por antiSMASH.** Secuencias en morado, presente en los tres genomas. Secuencias en rojo, presentes únicamente en DSM27. Secuencia en azul, presente únicamente en V17C11/P48C1. Los números 1-14 se corresponden con los grupos de la tabla 3.3.13. Se ha usado el genoma de DSM27 para representar la figura, el punto de inicio se ha situado en el gen que codifica para la DnaA.

Además de las anteriormente mencionadas, en el genoma de la cepa de colección (DSM27) se identificaron 2 agrupaciones génicas adicionales pertenecientes a RiPPs. Los resultados se resumen en la figura 3.3.25 y en la tabla 3.3.13.

**Tabla 3.3.13. Genes asociados al metabolismo secundario encontrados en *B. pumilus* V17C11, P48C1 y DSM27 por antiSMASH.** NRPS (sintetasas de péptidos no ribosomales), PKS (policétido sintasa), RiPPs (péptidos sintetizados ribosómicamente y modificado post-transcripcionalmente y RRE (elementos de reconocimiento de RiPPs).

Grupo	Tipo	Grupo génico similar	% homología	
			V17C11/P48C1	DSM27
1	NRPS	Lichenisina	85%	85%
2	Tipo RiPP	Kijanimicina	-	4%
3	Hibrido NRPS-PKS I	Zwittermicina A	18%	18%
4	Elemento que contiene RRE-		N/A	N/A
5	Terpeno, siderofo	Carotenoide	50%	50%
6	Elemento que contiene RRE-	Plantazolicina	-	91%
7	Betalactona	Fengicina	53%	53%
8	Terpeno		N/A	N/A
9	PKS III		N/A	N/A
10	Tipo RiPP		N/A	N/A
11	Betalactona		N/A	N/A
12	Terpeno	Subtinlina	23%	-
13	Otro	Bacilisina	85%	85%
14	NRPS	Bacillibactina	53%	53%

Uno de los grupos de genes biosintéticos (BGC) encontrados en las cepas aisladas de madera en degradación tiene un 85% de homología del gen de la lichenisina perteneciente a *Bacillus licheniformis* DSM 13 (grupo 1). La lichenisina es un potente biosurfactante de lipoheptapéptidos cíclicos aniónicos con importantes e interesantes propiedades como actividad hipocolesterolémica, antivírica, antibacteriana, antitumoral, entre otras (Grangemard *et al.*, 2001). Además, se ha encontrado otro BGC con 85% de homología con la bacilisina de *B. velezensis* FZB42 (grupo 3), este compuesto es un dipéptido sintetizado no ribosómicamente, que actúa como inhibidor por competición de la glucosamina-6-fosfato sintetasa, inhibiendo un precursor primario en la síntesis de la pared bacteriana y fúngica, lo que explica su amplio rango de inhibición microbiana (Wang *et al.*, 2018).

Por encima del 53% de similitud también se encontraron otras agrupaciones génicas como la bacillibactina de *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 (grupo 14), la cual es un sideróforo tipo catecol con propiedades para la promoción del crecimiento de los cultivos, así como para la lucha contra fitopatógenos (Nithyapriya *et al.*, 2021) y el gen de síntesis de fengicina de *B. velezensis* FZB42 (grupo 7), que es un ciclo lipo-depsipéptidos con fuerte acción antifúngica (Gimenez *et al.*, 2021).

Con menor porcentaje de homología se encontraron un gen que sintetiza carotenoides en *Halobacillus halophilus* DSM 2266 (grupo 5) y un gen híbrido NRPS-PKS I que sintetizaría zwittermicina A en *B. cereus* (grupo 3), un potente antibiótico con efecto sobre bacterias y hongos (Emmert *et al.*, 2004).

La cepa DSM27 presenta BGC propios, como el que codifica para la platazolicina y la kijanimicina (grupos 6 y 2). El primero pertenece a la familia de *tiazole/oxazole-modified microcin* (TOMM) con actividad frente a bacterias filogenéticamente cercanas como *B. anthraxis* (Wada *et al.*, 2015), y el segundo, con solo un 4% de homología con la secuencia de la Actinobacteria *Actinomadura kijaniata*, sería un espirotetronato con acción frente a Gram +, bacterias anaerobias y *Plasmodium falciparum* (Zhang *et al.*, 2007).

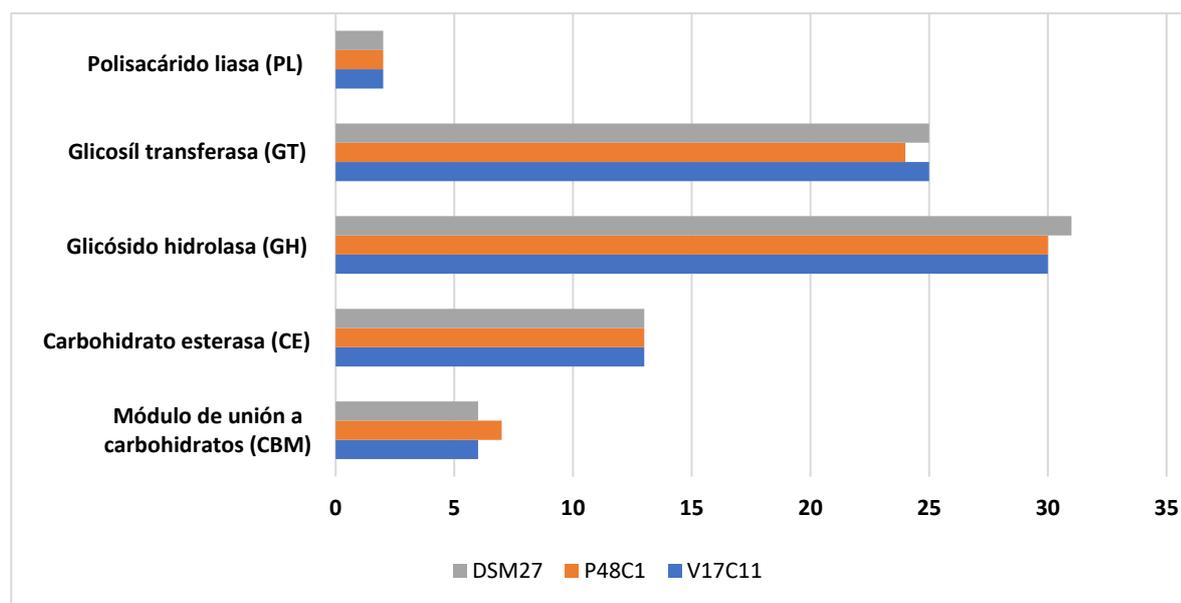
En paralelo, también se realizó un análisis con el software BAGEL4 que permite la búsqueda de bacteriocinas y de RiPPs dentro de un genoma. El análisis dio en ambos genomas dos posibles áreas de interés, una de ellas codifica para la pumilarina de *B. pumilus* B4107. Este compuesto es una bacteriocina con actividad antibacteriana de gran espectro (van Heel *et al.*, 2017), y la otra es homóloga a UviB, una bacteriocina propia de *Clostridium perfringens*, pero que también se ha hallado en especies del género *Bacillus* (Dupuy *et al.*, 2005; Petrillo *et al.*, 2021).

#### **3.3.6.4. GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS ACTIVAS FRENTE A CARBOHIDRATOS**

La clasificación CAZy es una clasificación de enzimas que son capaces de sintetizar o de romper carbohidratos, estas CAZymas (*Carbohydrate-Active Enzyme*) están involucradas en importantes procesos biológicos como la generación de energía, la señalización y la síntesis de la pared celular. Su estudio se ha visto relevante en la producción de energía a partir de biomasa, en estudios involucrados en la utilización de carbohidratos para producción de compuestos o en las relaciones entre plantas y microorganismos. La base de datos CAZy contiene el mayor repositorio de Cazymas, proporcionando una base de datos curada con toda la información de interés de los diferentes grupos de enzimas, entre la que se incluye su estructura 3D, número de acceso dentro del GenBank, taxonomía y número EC (Park *et al.*, 2010). Su creación se basa en el concepto de que la secuencia génica define la estructura proteica, y ésta la función de la proteína. Esta funcionalidad puede extenderse a otros miembros de una misma familia proteica, dando un marco sobre el cual basar hipótesis comprobables de la estructura y función de una enzima (The CAZyepedia Consortium, 2018).

Esta clasificación separa las enzimas que detecta dentro de un genoma en 5 grupos: módulo de unión de carbohidratos (CBM), carbohidrato esterasa (CE), glicósido hidrolasa (GH), glicosil transferasa (GT) y polisacárido liasa (PL).

Se analizaron los tres genomas de *B. pumilus* para la búsqueda de CAZymas a través de la herramienta bioinformática dbCAN2 (Zhang *et al.*, 2018) prediciendo las secuencias que codificarían enzimas, o partes de estas, con actividad frente a carbohidratos. Los resultados en las tres cepas analizadas fueron muy parejos. Se obtuvieron 76 genes en las cepas V17C11 y P48C1 que potencialmente codifican para CAZymas, mientras que en DSM27 se obtuvieron 77 genes. El mayor grupo de genes encontrados pertenecían a las glicósido hidrolasas (GH) (30 genes en V17C11 y P48C1, y 31 en DSM27) y a las glicosil transferasa (GT) (25 genes en V17C11 y DSM27, y 24 en P48C1). El resto se distribuye tal y como se puede ver en la figura 3.3.26.



**Figura 3.3.26. Comparación de enzimas predichas por *dbCAN2 metasever* en los tres genomas de *B. pumilus*.** Únicamente se han contabilizado aquellas enzimas que se han encontradas por los tres algoritmos utilizados (HMMER, DIAMOND y Hotpep).

Entre V17C11 y P48C1 se encontraron en dos conjuntos génicos diferentes, el primero codificaría para un módulo de unión de carbohidratos (CBM), concretamente CBM50, un módulo que suele estar unido a glicósido hidrolasas e involucrado en la degradación de quitina y peptidoglucano. El segundo para una enzima perteneciente a la familia 4 de las glicosil transferasas (GT4).

En comparación en estudios realizados en otras especies del género *Bacillus*, las cepas aisladas de madera en degradación han presentado menos enzimas que cepas parecidas como *B. pumilus* SAFR-032, con 94 genes, y menos que otras cepas de colección cercanas filogenéticamente como *B. subtilis* subsp. *subtilis* str.168 con 131, y *B. amyloliquefaciens* DSM7 con 115 (Manzo *et al.*, 2011).

Además, estos algoritmos pueden dar información sobre que los sustratos donde actúan las enzimas codificadas por los genes encontrados, de esta manera, predecir rutas de síntesis o degradación de carbohidratos concretos. Los genes encontrados se resumen en la tabla 3.3.14.

Dentro de estos genes, que es solo una pequeña parte de los genes descubiertos, se pueden apreciar grupos de genes involucrados en la degradación de quitina, celulosa, peptina o xilano. La presencia de varios grupos enzimáticos para la degradación del xilano, que también han sido descritos en otras cepas de *B. pumilus*, ha señalado a esta especie para su utilización en la industria como degradador de residuos orgánicos o en el procesos de blanqueado de papel (Battan *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2000)

**Tabla 3.3.14. CAZy potencialmente involucradas en la síntesis o degradación de carbohidratos.** Los resultados se ordenaron según el sustrato donde las CAZy eran potencialmente activas. Glicósido hidrolasas (GH), glicosil transferasa (GT), módulos de unión de carbohidratos (CBM), carbohidrato esterasas (CE), polisacárido liasas (PL).

Sustrato	Posibles Enzimas CAZy detectadas		
	<i>B. pumilus</i> V17C11	<i>B. pumilus</i> P48C11	<i>B. pumilus</i> DSM27
Arabinano	GH51	GH51	GH51
Proteína arabinogalactano	GH42	GH43	GH53, GH42
Beta-galactano	GH1	GH1	GH1
Beta-glucano	GH4, GH1, CBM6	GH16, GH4, GH1, CBM6	GH4, GH1, GH16, CBM6
Beta-manano	-	-	GH5
Celulosa	CBM6, CBM63, CBM3	CBM6, CBM63, CBM3	CBM63, CBM3, GH9, GH48
Cefalosporina C	-	-	CE7
Quitina	CBM3, GH18, CBM50	CBM3, CBM50,	GH48, CBM3, GH3, GH18, CBM50
Peptina	GH28, PL1	CE12, PL1	CE12, GH105, CE19, GH28, PL1
Peptidoglicano	CBM50, GH171, GH73	CBM50, GH171, GH23	CBM50, GH23, GH73, GH171
Polifenol	GH1	GH1	GH1
Rafinosa	-	-	GH4
Sacarosa	-	GH13	GH13
Trehalosa	-	GH13	GH13
Xilano	GH11, GH10, GH30, CBM91, GH1, CBM6	GH10, GH30, GH43, CBM6,	GH11, GH10, GH30, GH43, CBM91

Entre las cepas analizadas, la cepa DSM27 presenta enzimas con actividad frente a sustratos únicos, como rafinosa, beta-manano y cefalosporina C. Esta última, estaría mediada por una enzima de la familia CE7, que puede ser acetil xileno esterasa (EC 3.1.1.72) o cefalosporina-C deacetilasa (EC 3.1.1.41), enzimas que han sido aisladas con anterioridad de *Bacillus* spp. y tiene gran utilidad en la industria de producción de antibióticos (Tian *et al.*, 2014).

### **3.3.6.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

Para identificar los posibles genes de resistencia a antibióticos en las cepas de *B. pumilus* se utilizó *Resistance Gene Identifier tool* de la base de datos completa de resistencia a antibióticos (CARD: *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (Alcock *et al.*, 2020).

Como se expone en la tabla 3.3.15, las cepas analizadas presentan genes con homología a genes de resistencia. El gen con mayor porcentaje de homología fue *cat86* de *B. pumilus*, este gen codifica para una cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), aunque estudios realizados en

cepas de *B. pumilus* indican que la presencia de este gen no implica la resistencia a cloranfenicol (Freitas-Silva *et al.*, 2021).

Tabla 3.3.15. Potenciales genes de resistencia identificados por *Resistance Gene Identifier tool*. SMR, Small Molecule Resistance

Término ARO	Familia de genes	Tipo de antimicrobiano	Mecanismo de defensa	% de homología de la región		
				V17C11	P48C1	DSM27
<i>vanT</i>	Gen de resistencia a glucopéptidos vanT	Antibióticos glicopeptídicos	Alteración de la diana del antibiótico	33,15	33,42	33,42
<i>vanY</i>	Gen de resistencia a glucopéptidos vanY	Antibióticos glicopeptídicos	Alteración de la diana del antibiótico	37,11	37,11	37,11
<i>cat86</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa CAT	Antibióticos fenícolos	Inactivación del antibiótico	91,36	88,64	94,55
<i>qacJ</i>	Bomba de eflujo de antibióticos SMR	Antisépticos y agentes desinfectantes	Eflujo del antimicrobiano	42,42	54,21	42,42
<i>qacG</i>	Bomba de eflujo de antibióticos SMR	Antisépticos y agentes desinfectantes	Eflujo del antimicrobiano	44,00	44,00	46,00

### 3.3.7. Análisis comparativo del proteoma de diferentes *B. pumilus*

Las diferencias existentes entre las cepas de *B. pumilus* analizadas en esta tesis se pueden ver sobre todo a nivel funcional, no siendo tan evidentes a nivel genómico. Sobre todo, cuando se habla de las cepas V17C11 y P48C1, las cuales presentan alta similitud a nivel genómico, pero con ligeros cambios en cuanto a su actividad antimicrobiana y antifúngica.

Para completar la caracterización de estas cepas se llevó a cabo un análisis comparativo del proteoma citoplasmático entre las 5 cepas de *B. pumilus* que se han utilizado durante este trabajo. Además, para intentar explicar la capacidad antimicrobiana de V17C11, se realizó una comparación del proteoma de *B. pumilus* V17C11 a las 6 horas de cultivo (no presenta actividad antifúngica) y 96 horas de cultivo (máxima actividad antifúngica encontrada).

Todo ello se realizó por medio del sistema 2D-DIGE, que permite la separación de proteomas complejos en geles SDS-PAGE de dos dimensiones (2D SDS-PAGE) marcando las proteínas con fluorocromos lo que facilita su análisis y comparación. La identificación de las proteínas expresadas diferencialmente se realizó a través de espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF.

### 3.3.7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La comparación de las diferentes cepas se realizó a través de un cultivo en medio (TB a 30 °C, y a 250 rpm.) durante 6 horas. Estas condiciones se eligieron para obtener cultivos de las diferentes cepas en fase logarítmica con una OD<sub>600</sub> media de 4,5. Las gráficas del crecimiento de las cepas se exponen en la figura 3.3.27.

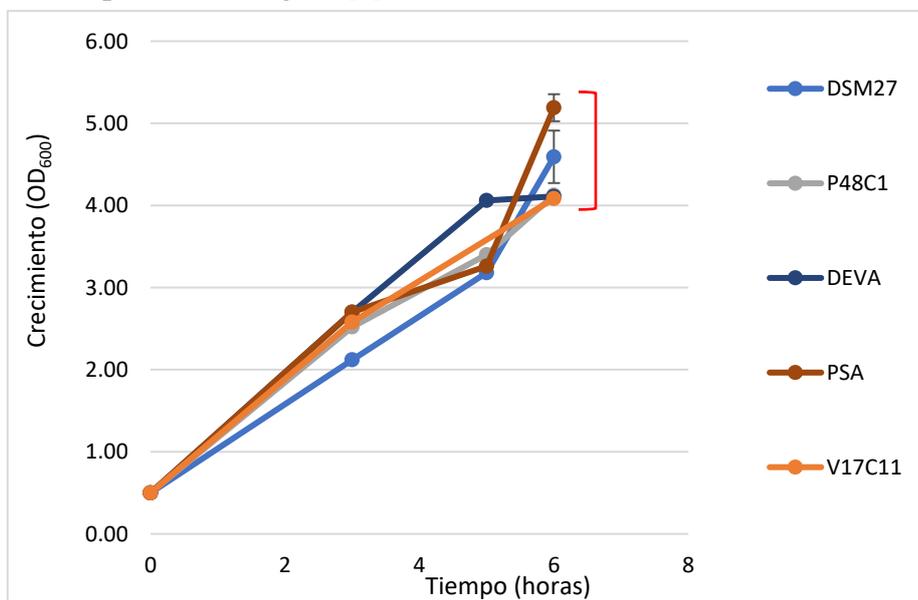
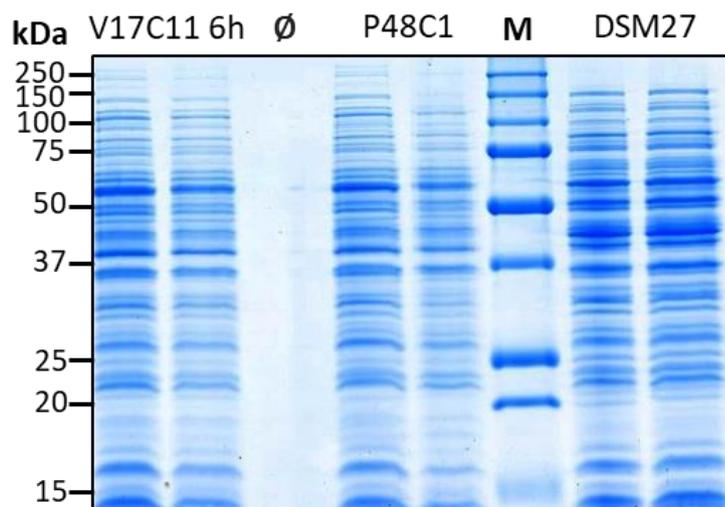


Figura 3.3.27. Crecimiento de las cepas de *B. pumilus* para realizar la comparación proteómica entre ellas. El corchete rojo indica la densidad óptica a la que se tomaron las muestras.

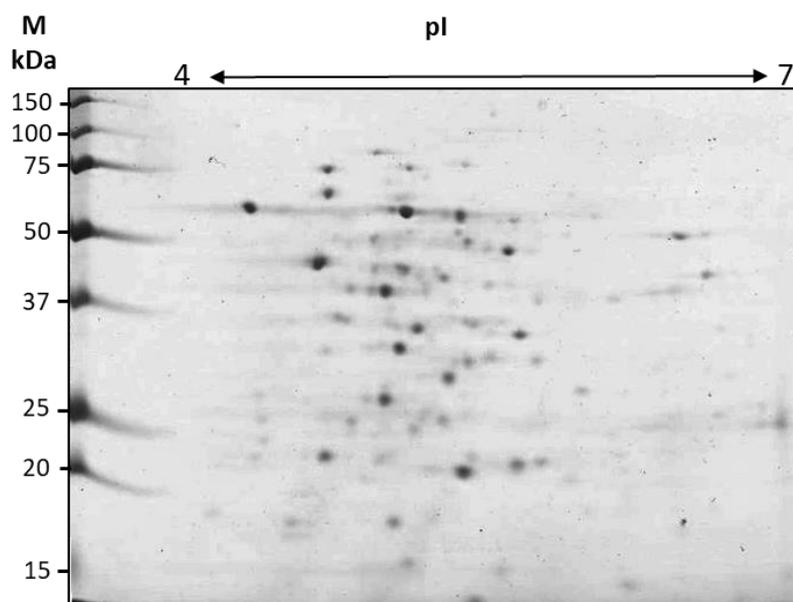
Para la extracción de las proteínas citoplasmáticas de los cultivos de *B. pumilus* se siguió el protocolo detallado en el apartado 2.16, basado en trabajos previos, como los realizados por Vasco-Cárdenas *et al.* (2013) y Handtke *et al.* (2018). El tampón en cuestión estaba compuesto por Tris 10 mM, EDTA 10 mM y pH 7,5, como se ha visto en anteriores estudios proteómicos en la misma especie como el de Handtke *et al.* (2018). Para evitar la degradación de las proteínas en los pasos de extracción todo el proceso se realizó en frío, y el tampón de rotura se suplementó con inhibidores de proteasas [*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)*].

La rotura se realizó utilizando un equipo FastPrep®-24, con bolas de vidrio de 0,1 mm (*FastPrep lysing matrix B*). Se recogió el sobrenadante para descartar el lisado celular y se procedió a la precipitación de las proteínas con acetona. Una vez estas fueron precipitadas se resuspendieron en tampón de rehidratación (RB) y se cuantificó la concentración de proteínas por método Bradford (Bradford, 1976). Para comprobar la integridad de las proteínas, así como la ausencia de impurezas y la definición de las bandas se visualizaron utilizando geles de una dimensión de poliacrilamida (SDS-PAGE) (figura 3.3.28).



**Figura 3.3.28.** Gel monodimensional de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar la integridad de las proteínas citoplasmáticas extraídas de cepas de *B. pumilus*. Carriles 1 y 2 cepa V17C11 6 horas, carriles 5 y 6 cepa P48C1 y carriles 8 y 9 cepa DSM. El marcador (carril 7) fue *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad).

Una vez se comprobó la integridad de las proteínas se observó el comportamiento de las proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones. Para la realización de la primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), se empleó el sistema *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare Life Sciences) y tiras *Immobiline™ DryStrip* de 7 cm centímetros, con pH no lineal inmovilizado de 4,0-7,0 (GE Healthcare Life Sciences). El gel fue teñido por medio de Coomassie coloidal (Candiano *et al.*, 2004), método simple y altamente reproducible que es adecuado como etapa previa al análisis por MALDI-TOF/TOF (Panfoli *et al.*, 2012), el resultado se puede ver en la figura 3.3.29.



**Figura 3.3.29.** Gel bidimensional de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar el comportamiento de las proteínas. En la imagen una muestra de la cepa *B. pumilus* (V17C11) recogida a 6 horas. Se usaron tiras de pH de 4 a 7. El marcador de peso molecular fue *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad).

Una vez se han realizado todos los pasos de comprobación de integridad, pH, ausencia de impurezas y definición de los puntos proteicos (*spots*) se prepararon las muestras para ser marcadas con los fluorocromos correspondientes.

### **3.3.7.2. MARCAJE, SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR MEDIO DEL SISTEMA ETTAN™ DIGE**

Para poder ver las diferencias entre las distintas cepas las muestras fueron analizadas mediante 2D-DIGE (Timms & Cramer, 2008; Unlü *et al.*, 1997), para ello las proteínas fueron marcadas con los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2.

El marcaje de las proteínas de las muestras se realizó de manera que se repartieran las réplicas de cada muestra en los geles utilizados, para que nunca hubiese dos réplicas de la misma muestra en el mismo gel. Al tener cinco cepas distintas y dos tiempos de la cepa V17C11 (6 y 96 horas), además, haber tomado 4 réplicas para cada una de las muestras, al final se obtuvieron un total de 24 muestras independientes. Para su comparación se realizaron 12 geles, cada uno con una combinación de muestras independientes marcadas, una de ellas con el fluorocromo Cy3 y la otra con el fluorocromo Cy5.

Además, el sistema DIGE utiliza un tercer fluorocromo (Cy2) como control interno de las proteínas de la muestra. Este control interno sería un marcaje de todas las proteínas en todas las condiciones, por lo que se realizaría un *pool* de las proteínas de las todas las muestras, el cual se marcaría a través del fluorocromo Cy2 y se añadiría en todos los geles.

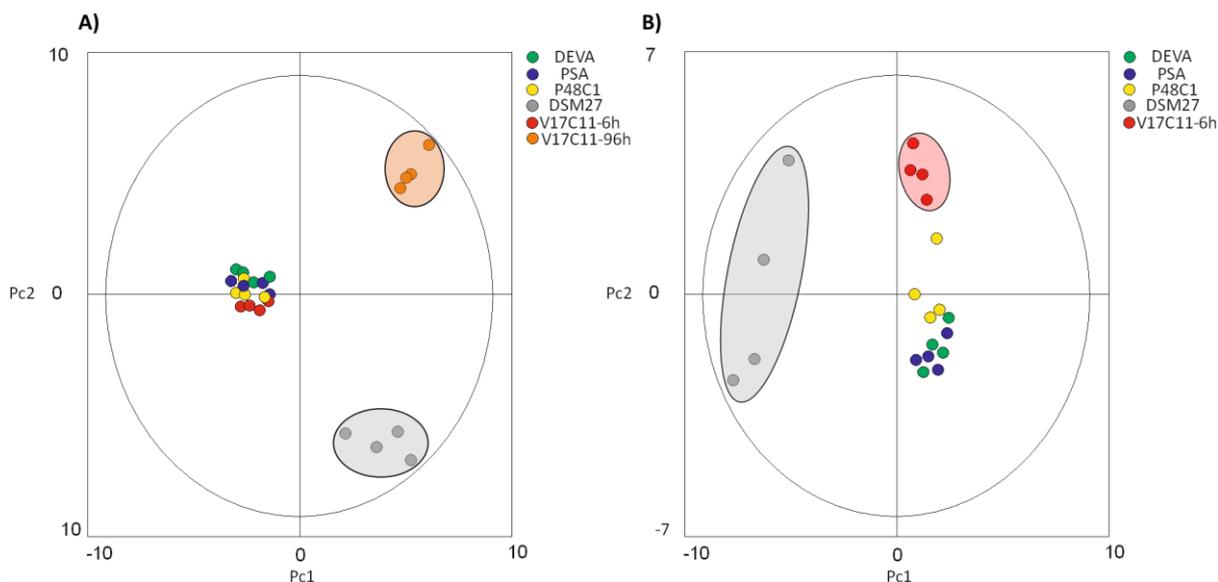
Se realizaron 12 geles bidimensionales para procesar las 24 muestras, la primera dimensión se realizó con tiras Immobiline™ DryStrip de 18 cm, con un pH no lineal inmovilizado de 4,0-7,0 (GE Healthcare Life Sciences), y la segunda dimensión se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 12,5% para SDS-PAGE empleando el sistema Ettan DALT six.

Las proteínas fueron visualizadas usando el escáner de fluorescencia ETTAN DIGE Imager (EDI) (GE Healthcare Life Sciences) con filtros CyDye, y las imágenes fueron analizadas a través del *software* de análisis diferencial DeCyder 2D (GE Healthcare Life Sciences) proporcionada por el escáner.

Para seleccionar aquellos *spots* diferencialmente significativos se realizó un análisis ANOVA, Student's t-test no apareada y la relación de abundancia media de cada *spot*, adicionalmente se realizó un análisis de tasa de descubrimiento falso (FDR: *False Discovery Rate*) para reducir los falsos positivos. Aquellos *spots* presentes como mínimo en el 70% de los geles, con una relación de al menos 1,5 y p-value menor de 0,05 fueron seleccionados para proseguir con el análisis.

Las diferencias globales entre las cepas se pueden ver en el análisis de componentes principales (PCA), figura 3.3.30. El cual muestra la diferencia existente entre la mayoría de las cepas cultivadas durante 6 horas y la cepa V17C11 cultivada durante 96 horas, apareciendo

todas las cepas silvestres juntas, mientras que la cepa de colección DSM27 y la cepa V17C11 a 96 horas aparecen separadas (figura 3.3.30A).



**Figura 3.3.30. Análisis de los componentes principales (PCA). A)** Todas las muestras. Se remarcaron las cepas V17C11 a 96 horas (naranja) y DSM27 (gris) a 6 horas **B)** Todas las muestras menos V17C11 a las 96 horas. Se remarcaron V17C11(rojo) y DSM27 (gris).

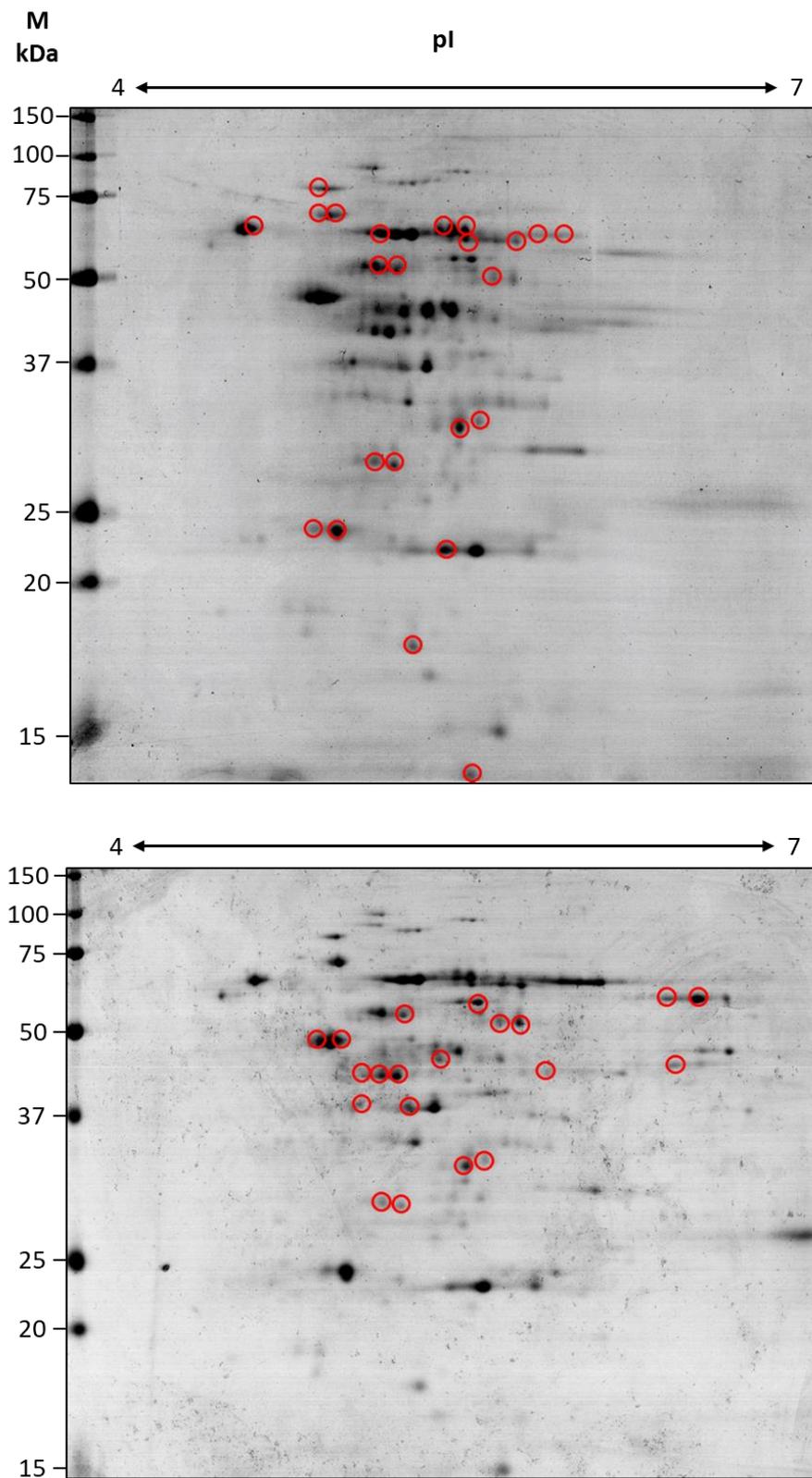
Eliminando la cepa V17C11 cultivada durante 96 horas (figura 3.3.30B), se vuelve a ver las diferencias existentes entre las cepas silvestres y la cepa de colección. Además, las cepas procedentes de metales aparecen juntas (PSA y DEVA), mientras que V17C11 aparece dentro de este análisis separada de ellas.

La gran diferencia existente entre las cepas silvestres y la cepa de colección podría haber eclipsado las diferencias entre las distintas cepas silvestres, por ello se optó por eliminar la cepa de colección de los análisis proteómicos. Realizando una comparación de las cepas PSA, DEVA y P48C1, frente a V17C11, por ser esta última la más distinta entre las cepas silvestres.

Para la obtención de las proteínas dentro del gel de acrilamida se realizaron dos electroforesis bidimensionales con mayor cantidad de muestra, con el objetivo de obtener una gran cantidad de proteínas que puedan ser identificadas por MALDI-TOF/TOF. Se tiñeron estos geles con Coomassie coloidal y se buscaron dentro de estos los spots señalados por el sistema DeCyder, figura 3.3.31.

Se lograron recuperar 66 puntos proteicos, que fueron sometidos a digestión trípica e identificación mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF, de los cuales 37 obtuvieron ratios suficientes para poder ser identificados con seguridad. Las proteínas identificadas se pueden ver en las tablas 3.3.16 y 3.3.17.

Las proteínas identificadas se agruparon según categorías funcionales (COG), se han identificado 19 proteínas y 4 isoformas pertenecientes a 8 grupos (COG).



**Figura 3.3.31. Geles preparativos de donde se extrajeron los spots de proteínas.** Los puntos proteicos seleccionados se marcan en rojo. A la izquierda se marca el peso molecular (kDa), y encima de cada gel el punto isoeléctrico (pI). El marcador de peso molecular fue *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-Rad).

Existe una sobreexpresión general de las proteínas en las cepas, P48C1, DEVA y PSA, de todas las proteínas analizadas comparándolas con V17C11. La proteína que más ha sido sobreexpresada ha sido el factor de elongación Ts (EF-Ts), siendo 8 veces superior en P48C1. Este factor está relacionado con el factor de elongación Tu (EF-Tu), induciendo el cambio de GDP a GTP (Prezioso *et al.*, 2017). Esta sobreexpresión, junto con la aparición de los otros dos factores de elongación necesarios para la síntesis proteica, factor de elongación G y EF-Tu, parece indicar el aumento de la síntesis de proteínas en estas cepas comparándolas con V17C11, o una diferente fase de crecimiento entre las cepas P48C1, DEVA y PSA y V17C11.

Por otro lado, el aumento de la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo del piruvato (dos isoformas de la dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa), otra involucrada en la transformación de acetil-CoA a acetato, puede indicar un aumento de la actividad metabólica, lo que coincidiría con el aumento en la producción de proteínas. Otra enzima, la alanina deshidrogenasa, también está sobreexpresada en las tres cepas, esta enzima está involucrada en la conversión de L-alanina en piruvato, subrayando la tendencia de aumento metabólico.

La presencia de varias proteínas relacionadas con el estrés térmico como la chaperona Dnak y GroEL, pero sobre todo la sobreexpresión de ambas proteínas, indica la activación de los genes de estrés por calor de clase I, aquellos regulados por el regulón HrcA y las secuencias CIRCE (*controlling inverted repeat of chaperone expression*) (Hecker *et al.*, 1996; Schumann, 2003). Esta presencia también explicaría la sobreexpresión del factor Tig, en las cepas analizadas. La sobreexpresión de los genes de estrés por calor de clase I se ha visto mediada, además de por calor, por presencia de otros compuestos tóxicos para *B. subtilis*, como el etanol o la tetraciclina (Seydlová *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2020). Además, la presencia de la catalasa KatE, indica activación de la respuesta al shock térmico tipo dos dependiente de activación del factor sigma alternativo  $\sigma^B$  (Hecker *et al.*, 1996).

La sobreexpresión de la butanodiol deshidrogenasa en las cepas P48C1, DEVA y PSA, parece indicar una preferencia en esta vía fermentativa en comparación con V17C11. Esta enzima está involucrada en la conversión del piruvato en acetoína y 2,3-butanodiol, compuestos importantes en la producción de energía que pueden ser utilizados como aditivos en combustibles líquidos (Yang & Zhang, 2019).

**Tabla 3.3.16. Datos de las proteínas identificadas por espectrometría de masas que presentan cambios en su expresión en las distintas cepas.** Se muestra el nombre de la proteína, el código dentro de la base de datos BRENDA (*The Comprehensive Enzyme Information System*), la ratio de expresión comparándolo con la cepa V17C11 (sobrexpresión en verde, subexpresión en rojo y no significativo en amarillo), punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (Mw) estimado de las proteínas, puntuación MOWSE en la búsqueda desde MASCOT, el porcentaje de homología a proteínas dentro de la base de datos y el número de acceso de la proteínas más parecida en Uniprot y la clasificación según su grupo de ortología (COG: *Clusters of Orthologous Groups*). Proteína sin caracterizar (PsC).

Nombre de proteína	BRENDA	P48C1	PSA	DEVA	pI /Mw (kDa)	ANOVA	Puntuación MOWSE	% homología	Número acceso (Uniprot)	COG
Dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa	EC 2.3.1.12	1,60	1,55	1,39	5,1 / 66,7	7,90E-05	130	98,9	ABV62040.1	C
Dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa		1,47	1,75	1,51	5,1 / 66,4	3,80E-09	354	98,9		
Fosfato acetiltransferasa	EC 2.3.1.8	1,49	2,03	1,74	4,9 / 35,0	2,60E-09	243	99,1	ABV64066.1	C
Fumarato hidratasa clase II	EC 4.2.1.2	1,65	2,17	1,95	5,3 / 52,6	7,30E-05	486	99,4	ABV63611.1	C
Proteína de unión al ADN (SpoVG)		1,54	1,11	1,13	5,1 / 11,0	3,30E-03	168	99,0	A8F916.1	D
Alanina deshidrogenasa	EC 1.4.1.1	3,06	3,40	3,13	5,0 / 44,5	8,40E-06	113	98,7	ABV63517.1	E
Butanodiol deshidrogenasa	EC 1.1.1.4	1,63	1,92	2,18	4,9 / 42,1	1,00E-05	515	98,8	ABV63013.1	E
PsC( <i>Butanodiol deshidrogenasa</i> )	EC 1.1.1.4	2,15	2,14	2,34	4,7 / 42,5	7,30E-05	164	-	ABV63013.1	E
PsC ( <i>Butanodiol deshidrogenasa</i> )		1,94	2,01	2,28	4,8 / 42,4	4,80E-08	289	-		
Dominio CBS de la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	EC 1.1.1.205	1,44	1,68	1,47	5,9 / 57,1	9,10E-06	683	99,4	ABV61199.1	F

Aislamiento y caracterización de microorganismos de madera en degradación

Nombre de proteína	BRENDA	P48C1	PSA	DEVA	pI /Mw (kDa)	ANOVA	Puntuación MOWSE	% homología	Número acceso (Uniprot)	COG
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD	EC1.2.1.12	1,42	1,80	1,61	5,1 / 46,2	3,40E-06	193	100,0	ABV63711.1	G
Triosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.1	1,90	2,60	2,08	4,9 / 29,1	8,30E-06	214	99,2	A8FHJ2.1	G
Acil-Coa deshidrogenasa		1,74	1,52	1,72	5,9 / 42,9	8,90E-03	173	97,1	ABV61327.1	I
Factor de elongación G		1,26	2,01	1,66	4,8 / 100,0	9,20E-03	109	98,3	A8F981.1	J
Factor de elongación Ts		8,99	2,64	2,56	5, / 37,2	1,30E-04	146	99,7	A8FDB4.1	J
PsC ( <i>Factor de elongación Tu</i> )		1,26	1,66	1,38	4,9 / 56,1	5,70E-01	90	-		J
Chaperona (GroEL)		2,48	1,68	1,56	4,6 / 74,0	6,80E-04	166	99,8	A8FAG3.1	O
Chaperona (GroEL)		3,13	1,90	1,92	4,6 / 73,6	2,80E-06	328	99,8		
Factor desencadenante de la división celular	EC 5.2.1.8	1,10	1,54	1,26	4,3 / 66,4	3,20E-04	288	99,1	A8FFW0.1	O
PsC ( <i>Chaperona DnaK</i> )		2,10	2,08	2,19	4,6 / 86,4	1,00E-03	100	-	AAA22528.1	O
Catalasa (KatE)	EC	1,39	1,29	1,70	5,6 / 63,0	1,20E-05	205	99,0	ABV61576.1	P
Catalasa (KatE)	1.11.1.6	1,58	2,45	2,32	5,5 / 63,2	6,70E-06	408	99,0		

Comparando los dos tiempos de recogida (6 y 96 horas) de muestra entre V17C11, se pueden ver una mayor diferencia en la expresión de proteínas. Dentro de las categorías funcionales encontradas, se han hallado 21 proteínas y 7 isoformas pertenecientes a 9 COG.

Las proteínas presentes sobrepresadas o subexpresadas en la comparación de tiempos, no presentes en la comparación de cepas fueron: componente de la subunidad beta de la piruvato deshidrogenasa E1 (EC 1.2.4.4), cisteína sintetasa (EC 2.5.1.47) y proteína como la subunidad C de la alquil hidroperóxido reductasa (tioredoxina) (EC 1.11.1.24). Además, de algunas isoformas de otras proteínas como dihidrolipoamida deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa (EC 2.3.1.12) o dominio CBS de la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.205).

Empezando por las proteínas que han sido subreguladas a las 96 horas de crecimiento, lo más llamativo es la menor expresión de las dos isoformas encontradas de la catalasa KatE, como se ha dicho anteriormente, esta catalasa está regulada por la expresión del factor alternativo  $\sigma^B$ . Este factor inhibe la esporulación de *Bacillus* a través de la represión de la expresión de SpoOA, a las 96 horas de cultivo, las respuestas al estrés mediadas por este sistema, el sistema de respuesta al estrés de tipo II, se encuentran reprimidas para dejar paso a la esporulación como forma de respuesta a la falta de nutrientes.

Las otras proteínas que se encuentran inhibidas a las 96 horas son dos isoformas de la alquil hidroperóxido reductasa, que actúa como una tioredoxina, estas proteínas están también vinculadas a la respuesta al estrés de tipo II y por ello reguladas a través del factor  $\sigma^B$ , lo que secunda la idea de la inactivación del mismo para dejar paso a la esporulación (Christian *et al.*, 1998).

En lo relativo a las proteínas inducidas, la proteína más sobrepresada a las 96 horas ha sido el factor de elongación Tig, 7 veces inducida a las 96 horas, este factor que actúa como una chaperona, puede a su vez explicar la sobrepresión de las chaperonas de la respuesta al estrés tipo I, DnaK y GroEL. La pérdida de la respuesta de tipo II ha podido inducir la regulación del plegamiento de las proteínas a través de la respuesta tipo I.

En cuanto a las enzimas involucradas en el metabolismo, muchas de ellas estaban también sobrepresadas en la comparación entre las cepas. La sobrepresión de enzimas involucradas en los procesos de glicolisis y gluconeogénesis, como la triosa fosfato isomerasa (5 veces sobrepresada) y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (4 veces sobrepresada) a las 96 horas de cultivo señala el aprovechamiento del glicerol del medio TB donde habían sido cultivadas las cepas. Esta alta sobrepresión, tanto en las cepas, como a las 96 horas al compararlo con V17C11, genera la pregunta de porque estas enzimas estarían subexpresadas en V17C11.

La conversión de piruvato a acetil-CoA que ya se veía en las cepas, vuelve a verse de forma más acentuada en la comparación de tiempos, donde se han obtenido hasta 5 isoformas de la dihidrolipoamida acetiltransferasa (una de ellas hasta 5 veces inducida a las 96 horas), y una

proteína no sobrepresada en la comparación entre cepas, el componente de la subunidad beta (inducida 2,68 veces), todo ello perteneciente al complejo piruvato deshidrogenasa.

Por último, las enzimas vinculadas a la fermentación butanodiólica están sobrepresadas a las 96 horas de cultivo, obteniendo hasta tres isoformas de la butanodiol deshidrogenasa, con una isoforma estando 4 veces sobrepresada a las 96 horas. Esta sobrepresión de la vía fermentativa a través de la producción de 2,3 butanodiol deberá estudiarse más adelante, ya que la producción de este compuesto por medio de el género *Bacillus* es una de las alternativas al uso de especies potencialmente patógenas para su producción (Song *et al.*, 2019).

**Tabla 3.3.17. Datos de las proteínas identificadas por espectrometría de masas que presentan cambios en su expresión a los distintos tiempos de cultivo.** Se muestra el nombre de la proteína, el código dentro de la base de datos BRENDA (*The Comprehensive Enzyme Information System*), la ratio de expresión comparándolo con la cepa V17C11 crecido 6 horas (sobrexpresión en verde, subexpresión en rojo y no significativo en amarillo), punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (Mw) estimado de las proteínas, puntuación MOWSE en la búsqueda desde MASCOT, el porcentaje de homología a proteínas dentro de la base de datos y el número de acceso de la proteínas más parecida en Uniprot y la clasificación según su grupo de ortología (COG: *Clusters of Orthologous Groups*). Proteína sin caracterizar (PsC).

Nombre de proteína	Código BRENDA	V17C11 96 horas	pI / Mw (kDa)	ANOVA	MOW SE	% homología	Número acceso (NCBI)	COG
Componente de la subunidad beta de la piruvato deshidrogenasa E1	EC 1.2.4.4	2,68	4,7 / 38,3	1,80E-03	398	100,0	ABV62039.1	C
Dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa		2,19	5,2 / 66,5	1,70E-07	129	98,9	ABV62040.1	
Dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa		2,58	5,1 / 66,7	7,90E-05	130	98,9	ABV62040.1	
Dihidrolipoamida acetiltransferasa del complejo piruvato deshidrogenasa	EC 2.3.1.12	5,44	5,1 / 66,4	3,80E-09	354	98,9	ABV62040.1	C
Dihidrolipoamida deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa		2,86	4,9 / 65,3	4,80E-09	619	100,0	ABV62041.1	
Dihidrolipoamida deshidrogenasa del complejo piruvato deshidrogenasa		3,37	5,0 / 66,4	8,50E-05	299	100,0	ABV62041.1	
Fosfato acetiltransferasa	EC 2.3.1.8	3,01	4,9 / 35,0	2,60E-09	243	99,1	ABV64066.1	C
Fumarato hidratasa clase II	EC 4.2.1.2	2,19	5,3 / 52,6	7,30E-05	486	99,4	ABV63611.1	C
Proteína de unión al ADN (SpoVG)		1,54	5,1 / 11,0	3,30E-03	168	99,0	A8F916.1	D
Butanediol deshidrogenasa	EC 1.1.1.4	3,87	4,9 / 42,1	1,00E-05	515	98,8	ABV63013.1	E
Cisteína sintetasa	EC 2.5.1.47	2,66	5,1 / 32,8	3,00E-07	267	100,0	ABV60757.1	E
PsC ( <i>Butanediol deshidrogenasa</i> )		3,56	4,7 / 42,5	7,30E-05	164	-	ABV63013.1	
PsC ( <i>Butanediol deshidrogenasa</i> )	EC 1.1.1.4	4,46	4,8 / 42,4	4,80E-08	289	-	ABV63013.1	E
Dominio CBS de la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	EC 1.1.1.205	-1,55	5,8 / 57,5	2,20E-07	245	99,4	ABV61199.1	F
Purina nucleósido fosforilasa	EC 2.4.2.1	2,87	5,14 / 27,9	4,00E-09	175	98,5	ABV62750.1	F
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD	EC1.2.1.12	4,40	5,1 / 46,2	3,40E-06	193	100,0	ABV63711.1	G
Triosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.1	5,00	4,9 / 29,1	8,30E-06	214	99,2	A8FHJ2.1	G
Acil-Coa deshidrogenasa		3,09	5,9 / 42,9	8,90E-03	173	97,1	ABV61327.1	I
Factor de elongación G		1,73	4,8 / 100,0	9,20E-03	109	98,3	A8F981.1	J
Factor de elongación Ts		2,69	5,4 / 37,2	1,30E-04	146	99,7	A8FDB4.1	J
PsC ( <i>Factor de elongación Tu</i> )		1,56	4,9 / 56,1	5,70E-01	90	-		J

Aislamiento y caracterización de microorganismos de madera en degradación

Nombre de proteína	Código BRENDA	V17C11 96 horas	pI / Mw (kDa)	ANOVA	MOW SE	% homología	Número acceso (NCBI)	COG
Chaperona (GroEL)		1,57	4,6 / 73,6	2,80E-06	328	99,8	A8FAG3.1	O
Factor desencadenante de la división celular	EC 5.2.1.8	7,36	4,3 / 66,4	3,20E-04	288	99,1	A8FFW0.1	O
Proteína como la subunidad C de la alquil hidropéroxido reductasa (Tiorredoxina)	EC 1.11.1.24	-1,87	4,6 / 24,7	2,60E-07	179	99,4	ABV62002.1	O
Proteína como la subunidad C de la alquil hidropéroxido reductasa (Tiorredoxina)	EC 1.11.1.24	-1,64	4,6 / 24,8	7,00E-04	120	99,4	ABV62002.1	O
PsC ( <i>Chaperona DnaK</i> )		5,92	4,6 / 86,4	1,00E-03	100	-	AAA22528.1	O
Catalasa (KatE)	EC 1.11.1.6	-11,74	5,6 / 63,0	1,20E-05	205	99,0	ABV61576.1	P
Catalasa (KatE)		-7,16	5,5 / 63,2	6,70E-06	408	99,0	ABV61576.1	

*Paraíso.*

## *4. Discusión general*



Cinamomo, agriaz, piocha, canelo, lila, paraíso sombrilla o árbol del paraíso - *Melia azedarach*. Por: Carlos Urtubey (19--). Archivo del Museo Nacional de Ciencias Naturales.



## 4.1. LA MADERA EN DEGRADACIÓN COMO ECOSISTEMA

La elección de la madera en degradación como base para la realización de este trabajo se basa en la idea que engloba el proyecto europeo ProWood, la protección de la madera utilizando microorganismos o productos obtenidos de ellos. Esta idea, se refuerza por trabajos que ponen de manifiesto las complejas relaciones existentes dentro de la madera en degradación (Hiscox & Boddy, 2017; Johnston *et al.*, 2016). Así, aparece la madera como un nicho ecológico donde hongos y bacterias deben luchar para la obtención de nutrientes, siendo estos nichos ecológicos lugares prometedores para la producción de metabolitos destinados a la supervivencia, tales como moléculas antimicrobianas y antifúngicas (Granato *et al.*, 2019).

### 4.1.1. Fracción cultivable

El aislamiento de 720 cepas diferentes, entre hongos y bacterias, a través de la microbiología clásica ha demostrado la diversidad de especies y cepas presentes en la madera en degradación. Hay que tener en cuenta, que lo que se ve mediante estas técnicas puede no ser completamente fiel a la microbiota existente, ya que se calcula que la parte cultivable dentro de un ambiente concreto puede llegar a ser únicamente el 1% de la diversidad existente (Stewart, 2012). Aun así, este tipo de estudios son necesarios por diversos motivos como: **i)** la exploración de las relaciones entre los microorganismos presentes en ella (de Boer *et al.*, 2005; Johnston *et al.*, 2016), **ii)** la descripción de nuevas cepas que puedan habitar en la madera **iii)** a modo de revalorización de aquellos microorganismos aislados (Xu *et al.*, 2015), y **iv)** como base para entender su ecofisiología y bioquímica, parámetros clave para comprender su función dentro de procesos medioambientales complejos (Ritz, 2007).

Dentro de las bacterias aisladas se ha encontrado cepas pertenecientes a los filos Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacterias, siendo especialmente abundante el género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Burkholderia*, estos datos concuerdan con lo visto por Embacher *et al.*, (2021) aislando estos mismos filos bacterianos de diferentes zonas del hongo degradador de madera *Sepula lacrymans*. Sin embargo, estos datos divergen con estudios donde se encontró una presencia mayoritaria de Proteobacterias, junto con otros microorganismos no vistos en el presente trabajo, como es el caso de las Acidobacterias (Valášková *et al.*, 2009). La presencia de estos grupos, sobre todo el aislamiento mayoritario de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* en la corteza puede tener otro origen. La migración de hongos entre la madera en descomposición y el suelo ha sido demostrada tanto en hongos degradadores de la madera como en hongos patógenos de plantas (Baldrian, 2017). Esta migración podría servir como vía para que las bacterias pudieran seguir un camino similar (Nicault *et al.*, 2020; Saxena *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2015).

La presencia de una mayor cantidad de bacterias pertenecientes al filo Proteobacterias en las muestras de Noruega, tal y como se ha señalado en estudios similares, tienen en común el tipo de bosque donde se realizó el muestreo, bosque boreal (Rinta-Kanto *et al.*, 2016; Valášková *et al.*, 2009). Las comunidades microbianas del bosque boreal han sido

anteriormente estudiadas observando una dominancia del filo Proteobacterias en su microbioma (Johnston *et al.*, 2016). Muchas de estas bacterias están vinculadas a climas fríos, siendo prevalentes en ambientes tan extremos como el océano Antártico (Murray & Grzymiski, 2007). Dentro de estos, la dominancia del género *Burkholderia*, en las muestras noruegas puede explicarse por su conocida relación con los hongos, estando este género asociado a ellos, tanto en relaciones antagónicas como simbióticas y/o mutualistas (Stopnisek *et al.*, 2016).

En cuanto a los aislamientos de hongos, la prevalencia del orden Eurotiales, más concretamente del género *Penicillium*, ha sido una constante en las muestras analizadas. La gran capacidad de este género por adaptarse a todo tipo de ambientes, como fondos marinos, regiones árticas o lagos ácidos (Ibrar *et al.*, 2020), hace que no sea raro su presencia en la madera en degradación. Gracias a su capacidad para la descomposición de sustratos complejos, como celulosa, este género se encuentra entre los hongos saprófitos presentes en el suelo (Baldrian *et al.*, 2011). Además, su función como hongo patógeno y/o endófito en especies vegetales también lo sitúan en los árboles durante la vida de estos (Nicoletti *et al.*, 2014). Por todo ello, aunque su aislamiento no está especialmente representado en la literatura desde muestras de madera en degradación y comprendiendo que es un género sin requerimientos nutricionales complejos, su presencia en las muestras de madera resulta lógica.

Por todo ello, la madera ha resultado ser un nicho ecológico prolífico para el aislamiento de géneros microbianos industrialmente relevantes. La obtención preferencial de géneros bacterianos con reconocida actividad antimicrobiana, como *Bacillus*, *Streptomyces* y *Burkholderia* dio pie al análisis de la capacidad de los mismos para inhibir el crecimiento fungico. Además, la gran variedad de cepas aisladas del género *Penicillium* permitió su análisis en la producción de compuestos relevantes, como sustancias antifúngicas o enzimas.

---

#### 4.1.2. Fracción no cultivable

Como complemento a los análisis de la fracción cultivable de microorganismos se analizó la fracción no cultivable a través de la metataxonomía de las muestras. Los resultados obtenidos de la fracción bacteriana no muestran diferencias importantes entre las muestras recogidas en ambas regiones, España y Noruega. En términos generales, los resultados concuerdan con estudios vistos anteriormente en madera en degradación, donde suelen destacar la abundancia de Acidobacterias, Proteobacterias y Actinobacterias (Hoppe *et al.*, 2015; Rinta-Kanto *et al.*, 2016; Valášková *et al.*, 2009; Vojtěch *et al.*, 2021). Aunque se ha descrito que la estructura bacteriana puede ser influenciada por el propio árbol, los hongos degradadores y hasta el mismo suelo donde se sitúa la muestra (Folman *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2014). En el presente estudio los resultados obtenidos en distintas regiones de Europa muestran una composición relativamente homogénea.

Dentro de las muestras individuales, y como se puede ver en los análisis de diversidad microbiana, el factor que más afecta a la diferencia de diversidad, según el índice de Shannon

y Simpson, es el nivel de degradación de la muestra. Otros estudios como el de Hoppe *et al.* (2015) coinciden con el trabajo presentado, donde la relación entre la diversidad de especies bacterianas aumentaba a lo largo que crecía el nivel de degradación.

En la fracción fungica identificada a través de la metataxonomía, lo más característico fue la falta de diversidad en las muestras analizadas. En la mayoría de ellas existe entre 1 y 3 OTUs mayoritarios, como las familias Schizoporaceae y Hydnodontaceae. La gran mayoría de los OTUs encontrados en las muestras de madera se corresponden con la clase Agaromycetes, dentro de los Basidiomycota, donde se encuentran los principales hongos degradadores de la madera (Schmidt, 2006). Esta relación entre la degradación de la madera y la baja diversidad fúngica se ha descrito en trabajos anteriores (Fukami *et al.*, 2010; Fukasawa & Matsukura, 2021), donde los agresivos mecanismos de defensa por parte de los hongos para competir por espacio y nutrientes parecen limitar la diversidad de especies fúngicas que se encuentran presentes en cada fase de la degradación (Hiscox *et al.*, 2018; van der Wal *et al.*, 2013). Esta competición fue demostrada por Toljander *et al.* (2006) al demostrar que la diversidad fúngica incrementaba al haber fluctuaciones en el medio ambiente.

El análisis metataxonómico ha permitido obtener una visión clara de las familias microbianas presentes en las muestras y con ello una imagen global en la que se pueden encontrar relaciones entre factores que afectan a la diversidad microbiana, en este caso, el nivel de degradación de las muestras como el factor más influyente.

## 4.2. POTENCIAL ANTIFÚNGICO Y ENZIMÁTICO DE LOS AISLADOS

El enfrentamiento de numerosos microorganismos frente a hongos involucrados en la degradación de la madera [*A. brasiliensis* y *P. chrysogenum* (Eurotiomycetes), *T. versicolor* y *C. puteana* (Agaricomycetes) y *A. pullulans* (Dothideomycetes)], da una idea de la capacidad antifúngica de las cepas aisladas frente a diversos tipos de hongos. Además de su utilidad en la protección de la madera, esta capacidad puede ser útil en otros ambientes, como en el descubrimiento de nuevas moléculas antifúngicas. La bioprospección desde fuentes naturales debe concentrarse en lugares donde exista una interacción cercana entre bacterias y hongos. Así, Vij *et al.* (2021) indican que, “los nichos ecológicos donde las bacterias y los hongos interactúan, como el suelo, los líquenes o los microbiomas de insectos, son fuentes prometedoras de moléculas antifúngicas”. Así, se ha presentado la madera en degradación como otro nicho ecológico interesante debido a las complejas relaciones existentes entre los microorganismos que conviven dentro de ella.

### 4.2.1. Potencial antifúngico de las cepas fúngicas aisladas

Durante esta tesis, los géneros fúngicos con mayor capacidad para la inhibición del crecimiento de los hongos degradadores de la madera fueron *Trichoderma*, con 6 cepas con resultados mayores de 1,5, y *Penicillium*, con 4 cepas con alta actividad antifúngica. Ambos

géneros han sido usados durante años por la capacidad que tienen en la producción de compuestos antifúngicos, siendo *Trichoderma* un género de preferencia usado para el biocontrol en la lucha contra las enfermedades fúngicas que afectan a los cultivos (Mukherjee *et al.*, 2022; Woo *et al.*, 2022). Esta tradición del uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol ha sido trasladada a la protección de la madera frente a la degradación (Teacă *et al.*, 2019). Así, las investigaciones llevadas a cabo por Ribera *et al.* (2020) integran este género en soluciones protectoras de la madera mejorando de esta manera su efectividad.

En cuanto a la producción de moléculas antifúngicas con posible utilidad clínica, la gran capacidad de producción de compuestos bioactivos por el género *Penicillium* lo sitúan como uno de los mejores candidatos en los que enfocar esta búsqueda (Toghueo & Boyom, 2020). La actividad antifúngica presentada por cepas aisladas de madera en degradación es un punto de partida para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos de utilidad clínica, como demuestran investigaciones sobre compuestos de uso hospitalario derivados de este género, un ejemplo es el policétido griseoflavin producido por *Penicillium griseofulvum* y utilizado para el tratamiento de micosis dérmicas (Valente *et al.*, 2020).

---

### 4.2.3. Potencial antifúngico de las cepas bacterianas aisladas

---

En el caso de las bacterias **Gram negativas** la mayor actividad antifúngica la ha presentado el género *Pseudomonas*, concretamente las cepas *Pseudomonas* sp. (V49S4) y *P. trivialis* (P41S1). La capacidad antifúngica de este género se conoce desde hace tiempo habiéndose investigado su función como bacteria promotora del crecimiento de los cultivos (PGPB: *plant growth promoting bacteria*), al ser capaz de realizar al mismo tiempo un biocontrol sobre los fitopatógenos, a través de la secreción de sustancias antifúngicas, bactericidas y sideróforos, y una promoción del crecimiento de las plantas por producción de compuestos que inducen la resistencia sistémica en ellas (Singh *et al.*, 2022). Además, se han descrito lipopéptidos producidos por diversas especies dentro de este género que han demostrado una gran capacidad antifúngica frente a importantes patógenos fúngicos, como *Cryptococcus*, *Aspergillus* y *Candida* (Geudens & Martins, 2018).

La utilización del género *Pseudomonas* como cepa de biocontrol en agricultura ha llegado a su formulación industrial en productos de uso común para combatir los hongos fitopatógenos o como agente para mejorar el crecimiento de los cultivos. Así, la marca comercial Proradix® (SP Sourcon Padena GmbH, Tübingen, Alemania) o FUNGIKILLER® (Control Bío, Almería, España) lo integran en sus formulaciones. La capacidad antifúngica presentada por las cepas aisladas frente a hongos degradadores de madera las convierte en las mejores candidatas dentro de las Gram negativas para continuar con su estudio y caracterización.

En el análisis de las **Gram positivas** aquellas que han presentado una mayor capacidad antifúngica han sido los aislados pertenecientes a los géneros *Bacillus*, con 5 cepas con la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de los hongos degradadores de madera y

*Streptomyces*, donde tres cepas tuvieron una gran actividad frente a la mayoría de los hongos degradadores de la madera.

El género *Bacillus* ha sido el que más cepas con alta capacidad antifúngica ha presentado dentro de las bacterias aisladas. La utilidad del género *Bacillus* como productor de moléculas antimicrobianas está siendo investigada en diversos ámbitos. Así, se han llevado a cabo estudios en Italia sobre la utilización de esporas de *Bacillus* como complemento probiótico para la limpieza de superficies en hospitales, con resultados sorprendentes en cuanto a la reducción de microorganismos patógenos en unas semanas (Vandini *et al.*, 2014); o su uso para la protección de obras de arte contra la degradación (Caselli *et al.*, 2018).

La utilidad de este género en la protección de la madera frente a la degradación ha sido demostrada con anterioridad, habiéndose validado la capacidad de cepas del género *Bacillus* para inhibir el crecimiento de hongos degradadores de la madera (Dass & Teyegaga, 1996; Devkota *et al.*, 2020; Sajitha *et al.*, 2018; Velmurugan *et al.*, 2009). Así, estudios recientes reconocen el papel de este género para disminuir la pérdida de peso ocasionada por la degradación blanca y parda en bloques de madera tratados con el caldo de fermentación de *B. velezensis* (Huang *et al.*, 2021).

Dentro de las cepas analizadas pertenecientes al género *Streptomyces* destacaron por su alta capacidad antifúngica tres: *Streptomyces* sp. (C7i7), *S. fimicarius* (V56S1) y *S. niveus* (V56S7). La gran actividad de este género no es de extrañar ya que es el género bacteriano productor de la mayoría de moléculas de uso clínico (Weber *et al.*, 2015). En cuanto a su actividad antifúngica, el compuesto más conocido extraído de este género es la anfotericina B, un macrólido polieno producido por *S. nodosus*, que fue el primer antifúngico aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas (Giuseppe *et al.*, 2020). En los últimos años, se han aislado y caracterizado numerosos compuestos con actividad antifúngica de distintas cepas dentro del género *Streptomyces*. Así, ejemplos importantes son la polioxina y la nikkomicina, antibióticos de uso agrícola para el tratamiento de enfermedades fitopatógenas (Osada, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

La gran actividad presentada por las cepas Gram positivas en los ensayos de inhibición fúngica, las sitúa como las bacterias más interesantes aisladas de madera en degradación para continuar con los objetivos del proyecto. La inhibición de todos los hongos indicadores utilizados presupone la producción de uno o de varios mecanismos de acción antifúngica que pueden ser explorados con detenimiento para la utilización de este tipo de bacterias en la protección de la madera frente a la degradación, en la protección de los cultivos frente a fitopatógenos o incluso, en la práctica hospitalaria.

---

#### **4.2.4. Búsqueda de genes biosintéticos en Actinobacterias y *Penicillium***

Una vez caracterizada la acción antifúngica de una gran parte de los microorganismos aislados, se realizó una búsqueda de genes biosintéticos en aquellos microorganismos que

tradicionalmente han tenido mayor relevancia en la producción de metabolitos secundarios bioactivos, Actinobacterias y *Penicillium*.

La identificación de genes biosintéticos, PKSs y NRPSs, es una herramienta para la búsqueda de posibles moléculas bioactivas. Los estudios de los cuales se seleccionaron los cebadores para la amplificación de estos genes, subrayan que los grupos génicos utilizados para la elección los mismos fueron aquellos que codificaban para metabolitos secundarios con actividades interesantes como antibióticos, antifúngicos, inmunosupresores y anticancerígenos (Amnuaykanjanasin *et al.*, 2005; Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005; Bingle *et al.*, 1999; Metsä-Ketelä *et al.*, 1999; Slightom *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se amplificó la secuencia de una región conservada dentro de las PKS y NRPS de **Actinobacterias** en 79 cepas aisladas de madera en degradación. Los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones previas en otros ambientes, como el estudio de Undabarrena *et al.* (2016) sobre Actinobacterias aisladas de sedimentos marinos de un fiordo en la Patagonia (Chile) en el cual, al igual que en este estudio, los genes biosintéticos mayormente encontrados fueron NRPSs, seguido de PSKs II y por último PKSs I. Contrariamente, el trabajo realizado por Wei *et al.* (2018), demostró que los genes principalmente amplificados de Actinobacterias aisladas de hojas de té (*Camellia sinensis var. assamica*) en China eran PKSs I.

Durante este trabajo se evidenció una falta de relación directa entre la presencia de las PKSs y NRPSs y su actividad antimicrobiana, esta falta de relación se había demostrado con antelación en el estudio de Das *et al.* (2018), donde al amplificar estos genes biosintéticos en *Streptomyces* con actividad antibacteriana, encontraron que de 24 cepas con actividad estos genes únicamente fueron amplificados en 5. Durante el estudio de Das *et al.* (2018) se destacó la similitud entre los genes amplificados con otros que codifican para PKSs y NRPSs con actividad antibacteriana y anticancerígena. En investigaciones futuras sería recomendable secuenciar los genes biosintéticos de las cepas positivas, con el objetivo de conocer qué posibles metabolitos secundarios son capaces de producir.

En cuanto al **género *Penicillium***, se amplificaron los genes biosintéticos en 36 cepas. Estudios parecidos donde se amplificaron las PKSs de hongos en diferentes ambientes muestran resultados similares. Así, en el estudio de Yang *et al.* (2018), sobre diversidad de especies fúngicas en peonías (*Paeonia ostii* y *Paeonia suffruticosa*), se encontraron PKSs en aproximadamente el 50% de las cepas analizadas, tal y como ocurre en el presente estudio.

La menor amplificación de MSRA-PKSs en comparación con los otros grupos de PKSs (NR-PKSs y HR-PKSs) concuerda con estudios anteriores donde se demuestra que este tipo de PKSs es menos común tanto en ecosistemas marinos como en terrestres (Kroken *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2007). A su vez, la pobre amplificación de NRPSs en cepas ambientales coincide con los estudios desarrollados por Yang *et al.* (2018) y Zhou *et al.* (2011), donde la amplificación de este tipo de agrupaciones biosintéticas ha demostrado ser la menos común en muestras ambientales.

Por otro lado, estudios sobre la caracterización de los PKSs y NRPSs en cepas de hongos aisladas de esponjas marinas en el mar de China destacan que la mayoría de las cepas que presentaban estas agrupaciones génicas tenían a su vez acción antimicrobiana (Zhou *et al.*, 2011), este resultado no concuerda con lo visto en el presente estudio, donde esta relación no ocurre.

Esta falta de relación entre la presencia de los genes biosintéticos y la actividad antifúngica demostrada por las cepas testadas puede tener varias causas:

1. La producción de antifúngicos por parte de Actinobacterias y *Penicillium* puede darse, además, de por medio de PKSs y NRPSs, por la producción de otro tipo de moléculas como enzimas o compuestos orgánicos volátiles (VOC) (Bladt *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2018).
2. La amplificación de las agrupaciones génicas buscadas con los cebadores utilizados no implica una acción antifúngica del producto codificado por la agrupación génica, estas pueden producir un gran número de moléculas con cantidad de funcionalidades distintas (Mayer *et al.*, 2007; Salwan & Sharma, 2020).
3. La presencia de las agrupaciones génicas en el genoma no da por hecho su expresión, estas agrupaciones génicas pueden ser cripticas o estar silentes al estar mediadas por algún tipo de estímulo (Nguyen *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020).

#### 4.2.5. Capacidad enzimática de las cepas de *Penicillium*

La búsqueda de funcionalidades industriales de las cepas aisladas de madera en degradación, también incluyó el análisis de la capacidad enzimática vinculadas a la degradación de la celulosa como prueba de concepto para evidenciar la capacidad de las enzimas secretadas en el género *Penicillium*. Esta elección, tanto de la búsqueda de las enzimas, como de la elección del género no fue casual. Estas enzimas están siendo cada vez más demandadas, ya que su uso abarca la industria textil, alimenticia, farmacológica y el procesado del papel, siendo actualmente las segundas enzimas más utilizadas atendiendo al volumen de trabajo (Ejaz *et al.*, 2021).

La investigación sobre celulasas de *Penicillium* ha tomado relevancia esta última década con trabajos que muestran una producción de los tres tipos necesarios de enzimas para la degradación de la celulosa (endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas). (Vaishnav *et al.*, 2018). La producción de los tres tipos de enzimas en altas concentraciones daría a este género ventaja con respecto a la especie utilizada industrialmente hasta ahora, *T. reesei*, deficiente en la producción de  $\beta$ -glucosidasas. Esto lleva a la acumulación de celobiosa que causa la inhibición del resto de enzimas (Singhania *et al.*, 2013). Aun así, esta deficiencia suele ser corregida con la adición de  $\beta$ -glucosidasas externas procedentes de otras especies fúngicas, como *Aspergillus*, con el co-cultivo de ambas especies o con la sobreexpresión de esta enzima en *T. reesei* (Sukumaran *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2005). La búsqueda de cepas dentro del género *Penicillium* con la capacidad de producir en altas concentraciones todas las enzimas

necesarias para la conversión de la celulosa a azúcares asimilables sería una alternativa viable al uso de estas estrategias.

La mayoría de las cepas testadas tenían actividad celulasa, siendo esta actividad, en muchos casos, mayor que la de la cepa control. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores donde se demostraba la producción de enzimas celulolíticas en cepas del género *Penicillium* (Dutta *et al.*, 2008; Jørgensen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2013). Además, se estudió la capacidad de estas mismas cepas de la producción de feruloil esterasas, enzimas involucradas en la liberación de ácidos hidroxicinámicos de la biomasa lignocelulósica, en este caso ácido ferúlico, posibilitando su extracción y uso (Palani Swamy & Govindaswamy, 2015).

La producción de todas las enzimas testadas por parte de 7 cepas de *Penicillium* aisladas de madera en degradación da una idea de la funcionalidad que pueden tener estas cepas en la degradación del material lignocelulósico. Aunque su capacidad de producir otras enzimas necesarias para la completa degradación de la pared vegetal, como hemicelulasas, no se realizó durante este trabajo, su presencia en cepas de *Penicillium* ha sido probada con anterioridad (Méndez-Líter *et al.*, 2021). La completa caracterización de las cepas con mejores resultados puede llevar al descubrimiento de cepas industrialmente relevantes en la degradación de la biomasa vegetal y en la extracción de ácido ferúlico de ella.

### 4.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CEPAS DE *B. PUMILUS*

La presente tesis se enmarca dentro del proyecto europeo ProWood, el cual tenía como objetivo la protección de la madera utilizando microorganismos o parte de estos a través de la formulación de nuevas soluciones protectoras. Por ello, se seleccionaron los microorganismos más propicios para continuar la investigación, como se puede ver en la tabla 3.3.2 entre los microorganismos que reunían todas las características que se buscaban se eligió a tres cepas de *B. pumilus* (V17C11, P48C1 y E211) para continuar la investigación, debido a:

1. **Resistencia a acetona:** aunque se ha demostrado la resistencia de las esporas de hongos a la acetona (Agrawal & Sharma, 1993), cuando se realizó una suspensión de las esporas de las cepas con gran actividad antifúngica (*Trichoderma*, *Streptomyces* y *B. pumilus*) en una solución de acetona pura, las únicas esporas que fueron capaces de germinar fueron las de *B. pumilus*.
2. **Escalado industrial de las formas de resistencia:** se consiguió un método sencillo y eficiente de producir grandes cantidades de endosporas de *B. pumilus* en medio líquido, mientras que en el caso de *Streptomyces* y *Trichoderma* aunque la producción de grandes cantidades de esporas es viable (Ma *et al.*, 2018; Sanjeev *et al.*, 2014), no se consiguió de manera sencilla la esporulación en medio líquido de ninguna de las cepas analizadas.
3. **Resistencia de sus endosporas:** es conocida la gran resistencia de las endosporas de *B. pumilus* a todo tipo de agentes externos (Vaishampayan *et al.*, 2012), lo que podría facilitar su supervivencia en las formulaciones protectoras finales.

4. **Estatus como microorganismo GRAS y QPS:** la especie *B. pumilus* está considerada como GRAS y QPS facilitando de esta manera su uso y distribución (Panel *et al.*, 2020; Pudova *et al.*, 2022).
5. **Utilización en ambientes próximos al ser humano:** esta especie se ha utilizado en estudios previos en ambientes cercanos al hombre, por ejemplo, como elemento probiótico en la limpieza de hospitales (Vandini *et al.*, 2014).

### 4.3.1. Actividad antibacteriana y antifúngica

La **actividad antifúngica** del género *Bacillus* está mediada por numerosos mecanismos de antibiosis y de competencia frente a los hongos haciendo de este género un interesante aliado en la búsqueda de nuevas moléculas biocidas, en la protección de los cultivos frente a plagas e incluso en la producción de enzimas con actividades interesantes. Concretamente, la especie *B. pumilus* ha sido utilizada en numerosas investigaciones para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, observándose el variado arsenal antifúngico que puede presentar esta especie (De la Cruz-López *et al.*, 2022; Dehestani *et al.*, 2010; Haidar *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2019).

*B. pumilus* presenta la capacidad de producir distintos **VOCs** con efecto antifúngico contra patógenos de plantas. Así, en el estudio de Morita *et al.* (2019) se aislaron hasta 32 VOCs diferentes de una cepa de *B. pumilus* creciendo en diferentes medios, entre ellos los que más inhibían el crecimiento de *P. citrinum* fueron metil-isobutil-quetona, etanol, 5-metil-2-heptanona y S(-)-2-metilbutilamina (Morita *et al.*, 2019). La cantidad y variedad de VOCs aislados de diferentes cepas de *B. pumilus*, está influenciada por el medio de cultivo donde crecen las cepas de *B. pumilus*, ya que en muchos casos son productos derivados del metabolismo primario (Veselova *et al.*, 2019), tal y como se vio también en este trabajo. Además, se observó la influencia de la cepa en la producción de estos compuestos, de ahí las diferencias existentes entre los estudios consultados, donde no se da una identificación de los mismos VOCs producidos por diferentes cepas de *B. pumilus*. Pero, sobre todo, la diferencia entre las cepas aisladas del medio natural durante este trabajo y la cepa tipo de colección *B. pumilus* DSM27 sin actividad antifúngica por volátiles.

La actividad antifúngica presentada por la cepa V17C11 era máxima después de las 6 horas de cultivo, este patrón de producción de los compuestos antifúngicos coincide con investigaciones previas donde se identificaron las moléculas responsables, como:

- i) surfactina, en el estudio desarrollado por Agarwal *et al.* (2017),
- ii) iturina A, producida a las 72 horas de cultivo en la investigación desarrollada por Kaushal *et al.* (2017),
- iii) dos péptidos (P-1 y P-2), producidos por la cepa *B. pumilus* HN-10 con gran actividad antifúngica frente a *Trichothecium roseum*, hongo productor de micotoxinas que está relacionado con las enfermedades postcosecha, a las 72 horas de cultivo (Yan *et al.*, 2018).

Por otro lado, la **actividad bacteriana** esta también mediada a través de numerosas moléculas, enzimas y compuestos orgánicos e inorgánicos con acción antimicrobiana. Los más conocidos son los lipopéptidos, entre ellos se ha probado la capacidad de diferentes cepas de *B. pumilus* para producir algunos de ellos como kurstatina, surfactina, fengicina A e iturina A (Caulier *et al.*, 2019). En el presente trabajo se vio un patrón de actividad antibacteriana que fue máximo entre las 24-48 horas de crecimiento, este patrón se ha visto en estudios anteriores como los realizados por:

- i) Dimkić *et al.* (2017) analiza la composición de los extractos lipopeptídicos de cinco cepas de *Bacillus*, siendo esta composición una mezcla entre los distintos lipopéptidos antes mencionados,
- ii) Nikolić *et al.* (2019) que destaca la actividad de la iturina A en la inhibición de *P. syringae* a las 24 horas de cultivo,
- iii) Zidour *et al.* (2019) demuestra la actividad de la combinación de diferentes isoformas de la surfactina, producidas entre las 48 y 72 horas de cultivo, frente a 7 especies de *Staphylococcus*,
- iv) Saggese *et al.* (2018, 2022) que estudio de producción de dos moléculas, la primera, identificada como pumilarina, con actividad frente a *S. aureus* y la segunda con actividad frente a *L. monocytogenes*, encontradas durante la fase exponencial de crecimiento de una cepa de *B. pumilus*,
- v) el estudio de Aunpad y Na-Bangchang (2007) donde se describe la producción de pumilicina 4 aislada de *B. pumilus* WAPB4, efectiva frente a bacterias Gram + de importancia medica como MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina) y VRE (*E. faecalis* resistente a vacomicina).

La capacidad de síntesis de compuestos antimicrobianos a las primeras horas del crecimiento en las cepas con las que se ha trabajado en este estudio parece concordar con la síntesis de lipopéptidos, aun así, la síntesis de otro tipo de compuestos no puede ser pasada por alto.

#### 4.3.2. Análisis del genoma de las cepas aisladas

El análisis de las cepas aisladas, así como la cepa tipo DSM27 se llevo acabo. Se observó que tanto el porcentaje de GC como la cantidad de genes de codifican proteínas es diferente entre las cepas de madera en degradación y la cepa de colección, diferencias habituales entre distintas cepas aisladas de localizaciones y ambientes distintos, tal y como se puede apreciar en la tabla 3.3.12. A su vez, se comprobó la presencia de un plásmido de 7,2 kb en la cepa *B. pumilus* V17C11.

La elaboración de los arboles filogenéticos no se realizó a través de la secuencia 16S, o de la secuencia de *gyrB* o *pyrE*, como recomendaba Liu *et al.* (2013), se efectuó utilizando el método *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) que analiza las diferencias existentes en todo el genoma (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Este método ha sido usado con anterioridad para el

estudio taxonómico y filogenético de las cepas dentro del grupo de *B. cereus* (Liu *et al.*, 2015), además de otros géneros interesantes como *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Garrido-Sanz *et al.*, 2016; Meier-Kolthoff *et al.*, 2014; Peeters *et al.*, 2016). Los árboles filogenéticos generados durante este trabajo dan una idea general de donde se sitúan las cepas encontradas dentro del género *Bacillus*. Asimismo, la comparación entre cepas de colección, figura 3.3.24, da una idea clara de la pertenencia de las cepas aisladas a la especie *B. pumilus*. Esta doble comprobación, la primera a través del 16S, y la segunda a través del método GBDP, se llevó a cabo por la dificultad de diferenciación de cepas dentro del grupo de *B. subtilis*, clado al que pertenece *B. pumilus*.

Los resultados obtenidos del análisis filogenético que compara las cepas secuenciadas durante este trabajo con genomas completos de cepas de *B. pumilus* anteriormente secuenciadas, son parecidos a los publicados por Iqbal *et al.* (2021), que utilizó polimorfismos de un solo nucleótido (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) para el estudio filogenético de *B. pumilus*. Estos resultados, al igual que los publicados por Wang *et al.* (2022), muestran una clasificación de las cepas de *B. pumilus* en tres clados principales. Estando las cepas tipo de colección, en el clado 1, las cepas aisladas de madera en degradación, junto con otras de procedencias diversas como, el Mar Negro, tabaco o tierra contaminada con petróleo en el clado 2, y re-asignando las cepas pertenecientes al clado 3 como *B. altitudinis*.

La anotación funcional de las cepas analizadas se realizó a través de RAST, mostrando algunas diferencias entre las cepas aisladas de madera en degradación y la cepa de colección. Las mayores diferencias en el número de genes anotados en cada una de las categorías se dieron en la categoría funcional “fagos, profagos, transposones y plásmidos”, en la que el número de genes anotados en la cepa de colección era mucho mayor que en las cepas silvestres, otras cepas secuenciadas tienen números parecidos de genes asignados a esa categoría [*B. pumilus* SH-4 tendría 6 (Wang *et al.*, 2022)]. Una de las diferencias más notables encontrada fue la cantidad de genes asociados al metabolismo del nitrógeno en *B. pumilus* V17C11 (43 genes). Esta es una diferencia a tener en cuenta, ya que en otras cepas analizadas este número oscilaba entre 6 y 14.

La presencia de agrupaciones biosintéticas asociadas a la producción de compuestos bioactivos, unido a la gran actividad antifúngica y antibacteriana presentada por las cepas aisladas de madera en degradación, las señala como cepas interesantes para su utilización por sus capacidades antimicrobianas en campos como la agricultura, o en la protección de la madera frente a la degradación.

Aunque no se identificaron las moléculas responsables de la actividad antimicrobiana en estas cepas, la gran homología con genes que codifican para lichenisina, bacilisina y fengicina, moléculas con actividades antibacterianas y antifúngicas (Grangemard *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2018), junto con la homología con el gen que produce la pumilarina, bacteriocina antibacteriana de amplio espectro (Dupuy *et al.*, 2005; van Heel *et al.*, 2017), se plantea que:

1. La actividad antifúngica es compatible con la producción de lipopéptidos coincidiendo, tanto el tiempo en el que se produce como en lo que indican estudios anteriores, a un lipopéptido similar a la fengicina.
2. La actividad antibacteriana, podría ser compatible, tanto por tiempo de producción como por su amplio espectro de actuación, con la secreción de alguna molécula similar a la pumilarina.

La posible actividad enzimática de las cepas de *B. pumilus* fue analizada realizando una búsqueda y clasificación de genes que codifican para CAZymes (enzimas activas frente a carbohidratos). En el estudio de Freitas-Silva *et al.* (2021) se encontró un número parejo de genes que codifican para CAZymes, pero las agrupaciones variaban ligeramente a lo encontrado durante esta tesis. Según la clasificación CAZymes, entre los sustratos que estas cepas son capaces de degradar o sintetizar se pueden ver algunos grupos de enzimas interesantes como aquellos capaces de degradar la celulosa, la peptina, el xilano y la quitina.

La capacidad de síntesis de varios grupos enzimáticos como xilanasas y celulasas puede estar involucrado con la capacidad de las tres cepas analizadas de degradar material lignocelulósico, siendo útil en la producción de enzimas que median procesos industriales relevantes como la producción de papel, la industria textil o la producción de biocombustibles. Esta capacidad de producción de enzimas lignocelulósicas había sido observada en cepas de *B. pumilus* anteriormente (Balasubramanian & Simões, 2014; Nagar & Gupta, 2021). Además, la producción de quitinasas está involucrada en la inhibición del crecimiento de hongos filamentosos, por lo que parte de la inhibición presentada puede deberse a la producción de estas enzimas (Singh & Arya, 2019).

### 4.3.3. Análisis proteómico comparativo

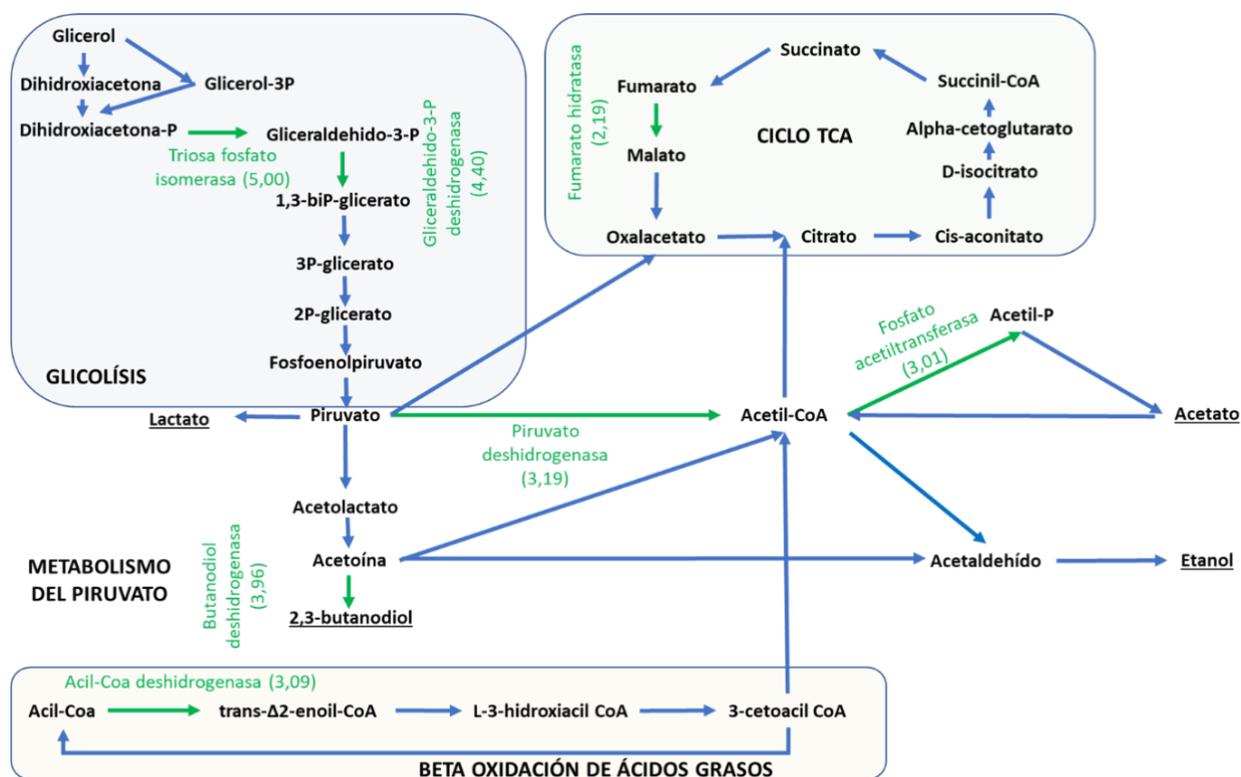
El análisis del proteoma de las diferentes cepas de *B. pumilus* confirmó las diferencias existentes entre las cepas silvestres y la cepa de colección DSM27, como se puede ver en la figura 3.3.30B. Las cepas silvestres se agrupan a un lado del análisis de componentes principales, mientras que la cepa DSM27 aparece al otro. Estas diferencias podrían eclipsar a la variación existente entre las cepas salvajes, por lo que se eliminó la cepa DSM27 en el análisis proteómico.

Lo primero que llama la atención fue que todas las proteínas diferencialmente expresadas estén sobrerreguladas en comparación con *B. pumilus* V17C11. Esto puede indicar un distinto crecimiento de las cepas *B. pumilus* P48C1, DEVA y PSA, con respecto a V17C11. Este distinto crecimiento explicaría la sobreexpresión de proteínas implicadas en la síntesis proteica como los factores de elongación Tu y Ts, la sobreexpresión de enzimas involucradas con la síntesis del piruvato, y la sobreexpresión de factores de transcripción específicos como SpoVG. Además, se observaron proteínas de estrés térmico, ya sean de tipo I (DnaK y GroEL) o de tipo II (KatE) sobrerexpresadas en las cepas *B. pumilus* P48C1, DEVA y PSA indicando algún tipo de estrés en las bacterias en crecimiento.

Las diferencias entre el crecimiento de las cepas *B. pumilus* P48C1, DEVA y PSA y la cepa V17C11 puede ser explicado de tres maneras:

1. Las diferencias encontradas entre las cepas pueden deberse al momento de recolección de muestras. Atendiendo a la figura 3.3.27, donde se recoge el crecimiento de las cepas hasta la recogida de las muestras, se puede ver que todas ellas crecieron de forma similar, fijando el punto de recogida cuando alcanzaban una densidad óptica entre 4 y 5. Además, el momento de recogida de la cepa V17C11 es muy similar al de DEVA y P48C1, con una densidad óptica casi igual. Todo ello lleva a descartar este motivo como posible causa de las diferencias encontradas.
2. Las diferencias que se ven entre las cepas, sobre todo a lo que respecta a la diferencia entre V17C11 y P48C1, ya que a nivel genómico son dos cepas muy parecidas, pueden deberse a la presencia del plásmido en la cepa V17C11. La incidencia de plásmidos dentro de *B. pumilus* no es muy alta, habiéndose descrito únicamente en el 15% de las cepas analizadas (García-Ramón *et al.*, 2015). La mayoría de ellos siguen siendo crípticos y su función todavía no ha sido descrita, pero se han estudiado plásmidos que modifican el fenotipo de la cepa de *B. pumilus* en la que se han encontrado, bien sea cambiando su morfología, su índice de esporulación, entre otras cosas (Singh *et al.*, 2010). La implicación de este plásmido en el desarrollo de las cepas y si su presencia condiciona el crecimiento de *B. pumilus* será un tema a investigar en el futuro.
3. Las diferencias entre la producción de compuestos bioactivos, así como en el crecimiento o a la resistencia a agentes externos entre cepas filogenéticamente cercanas ha sido demostrado en muchas especies bacterianas (Pérez-García *et al.*, 2016; Sottorff *et al.*, 2019). Las diferencias que se observaron entre las cepas de *B. pumilus* pueden responder a un origen casual en la diferenciación entre cepas de una misma especie, como explica Bolotin y Hershberg (2016) esta variación puede estar determinada, o no, a un cambio en el medio ambiente. Para estudiar en detalle las causas de esta variación entre las cepas sería necesario el análisis de la divergencia funcional de esta cepa con respecto al resto de cepas de *B. pumilus* publicadas (Caffrey *et al.*, 2012).

Las diferencias en expresión proteica entre el crecimiento de la cepa V17C11 a 6 horas y a 96 horas han sido muy marcadas. En cuanto a las enzimas involucradas con el metabolismo de *B. pumilus* se han encontrado 6 enzimas diferencialmente expresadas, la mayoría involucradas en el metabolismo primario, estas enzimas se han resumido en la figura 4.1.



**Figura 4.1.** Esquema representativo de las principales diferencias metabólicas a las 6 y 96 horas de crecimiento en *B. pumilus* V17C11. En verde enzimas sobrepresadas a las 96 horas. Los productos finales han sido subrayados.

Las enzimas identificadas sugieren que a las 96 horas de cultivo el proceso mayoritario que está sucediendo sería la fermentación de los azúcares, en este caso concreto del glicerol, fuente de carbono del medio TB, por medio de la fermentación ácido mixta y butanodiólica. Durante este proceso, los productos finales que suelen detectarse, al menos en *B. subtilis*, son lactato, acetato, 2,3-butanodiol y etanol en pequeñas cantidades (Cruz Ramos *et al.*, 2000). La presencia de enzimas que llevan la producción de acetato, 2,3-butanodiol y etanol, pero no de lactato hace preguntarse si esta vía estará afectada por alguna razón.

La sobreexpresión de la butanodiol deshidrogenasa abre la puerta a la investigación de la producción de 2,3-butanodiol con esta cepa, siendo este compuesto apreciado para la producción de tintas, perfumes, agentes anticongelantes, aditivos de combustibles, aditivo alimentario e industria farmacéutica, con un mercado potencial de 220 millones de dólares para 2027 (Maina *et al.*, 2022; Tinôco *et al.*, 2021). Además, la producción industrial de 2,3-butanodiol está lacrada por las bacterias que deben utilizarse, ya que dentro de la familia que más producción han presentado, Enterobacteriaceae, se encuentran géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter*, y *Serratia*, con especies patógenas y que están consideradas en el grupo de riesgo 2 y por ello son un obstáculo para su producción industrial (Song *et al.*, 2019). Por ello, la producción de 2,3-butanodiol a través del género *Bacillus* está cobrando importancia, centrándose principalmente en las especies *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, especies cercanas filogenéticamente a *B. pumilus* (Fu *et al.*, 2016; Maina *et al.*, 2022).

#### 4.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante toda la tesis se ha probado la capacidad de la madera en degradación como fuente de microorganismos con posibles actividades industriales, aunque la gran cantidad, así como la variedad y las características de los microorganismos encontrados apoyan esta teoría, son necesarios estudios adicionales para caracterizar completamente todo lo hallado.

Los resultados de los análisis de biodiversidad en hongos y bacterias de las muestras recogidas dan una imagen global del microbioma presente en la madera en degradación, pero para comprender este nicho ecológico se debería estudiar todos los factores que puedan tener relevancia en la diversidad microbiana, como la especie de árbol, el nivel de degradación, la influencia del clima o el área geográfica del muestreo.

La gran cantidad de cepas microbianas encontradas a través de cultivos con capacidad antifúngica, potencial biosintético y/o actividad enzimática ponen de manifiesto la utilidad de este nicho ecológico para la búsqueda de microorganismos para su aplicación a escala industrial. Sabiendo que la demostración de la actividad antifúngica de las cepas aisladas es solo el primer paso en el proceso de caracterización, éste debería continuar con la identificación de los compuestos responsables de dicha actividad, así como un estudio más exhaustivo sobre la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos relacionados con el ámbito agrícola o sanitario. Además, aunque se ha demostrado la capacidad celulolítica de los aislados fúngicos del género *Penicillium*, sigue siendo necesario una caracterización completa de estas enzimas dentro de las cepas aisladas, así como la demostración de producción de otro tipo de enzimas necesarias para la degradación del material lignocelulósico, como hemicelulasas.

La caracterización completa de las cepas de *B. pumilus* encontradas dan una idea del potencial que tiene esta cepa para inhibir tanto hongos como bacterias. Por ello, esta investigación podría continuar con la identificación de los compuestos que producen las cepas aisladas, así como, una evaluación de su actividad, niveles de producción y rango de acción.

La secuenciación de los genomas de las cepas aisladas, así como su comparación con la cepa patrón de colección refleja las diferencias existentes entre ésta y las cepas silvestres. Este estudio debería completarse a través del análisis del pangenoma de las cepas involucradas, así como del estudio de la divergencia funcional de estas cepas con respecto al resto de cepas de *B. pumilus* (Caffrey *et al.*, 2012). Todo ello podría ayudar a explicar: **i)** la falta de relación geográfica o de ambientes entre las cepas de *B. pumilus* presentes en un mismo clado, o **ii)** las diferencias en la capacidad antimicrobiana encontrada entre las cepas silvestres y la cepa tipo.

Además, las diferencias encontradas a través de la proteómica entre las cepas analizadas deberán ser examinadas más ampliamente. Para ello, sería de interés la caracterización del plásmido presente en la cepa *B. pumilus* V17C11, así como un estudio más concreto entre las diferencias que se han observado entre las cepas. Asimismo, se debería estudiar a través de la proteómica las diferencias entre la cepa de colección y las cepas silvestres analizadas. Por último, la caracterización del incremento en la producción de 2,3-butanodiol es un aspecto interesante en la cepa V17C11 para comprobar si puede ser viable su escalado industrial.



N. 343.

## 5. Conclusiones



a. *Castanea Sativa*, Maronnier, Castanier.

b. *Castanea vulgaris*, Chateignier, gemeine Castanier.

*Castanea sativa*-*Castanea vulgaris*. Por: Hieronymum Lentzium (1737-1745). En: Phytanthoza iconographia, sive, Conspectus aliquot millium: tam indigenarum quam exoticarum, ex quatuor mundi partibus longa annorum serie indefesoque studio. Jardín Botánico de Missouri.



## CONCLUSIONES

1. La madera en degradación es un nicho ecológico adecuado para la búsqueda de microorganismos con aplicación industrial como lo demuestra su: **i)** capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes hongos, **ii)** su producción de enzimas de interés, y **iii)** la presencia de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios.
2. Los análisis metataxonómicos muestran una relación directa entre la diversidad microbiana y el nivel de degradación de la madera, no influyendo, sin embargo, otros aspectos como la localización geográfica o la especie vegetal.
3. Diferentes especies microbianas aisladas de madera en degradación han demostrado una gran capacidad inhibitoria del crecimiento de los hongos degradadores de madera perteneciendo los mejores candidatos a los géneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*.
4. Varias de las especies aisladas de la clase Actinobacteria y del género *Penicillium* poseen agrupaciones de genes biosintéticos para metabolitos secundarios, aunque su presencia no parece estar vinculada a una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento de los hongos degradadores de madera.
5. Las cepas de *B. pumilus* aisladas en este trabajo son fenotípicamente diferentes y filogenéticamente distantes a las cepas tipo existentes en las colecciones de cultivos. Así, las cepas *B. pumilus* V17C11 y P48C1 poseen mayor capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias que la especie tipo *B. pumilus* DSM27.
6. La producción de compuestos antimicrobianos por parte de *B. pumilus* V17C11 se produce en dos tiempos: el primero, en la fase exponencial de crecimiento presentando una mayor actividad antibacteriana, y el segundo, en la fase estacionaria con una mayor actividad antifúngica.



6. <sup>XIII.</sup> Bibliografia



Plate XIII. Por: Sarah Price (1864-1865). En: Illustrations of the fungi of our fields & woods: drawn from natural specimens. Missouri Botanical Garden.





- Abreham, B., Tariku, A., Adane, H., Addisalem, Fitala, Tigist, G., Musin, K., y Admas, B. (2016). Isolation & characterization of efficient cellulolytic fungi from degraded wood & industrial samples. *African Journal of Biotechnology*, 14(48), 3228-3234. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14679>
- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R. C., Kumar, P., Maheshwari, D. K., y Bajpai, V. K. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* & *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological Research*, 205, 40-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>
- Agrawal, V., y Sharma, S. (1993). The efficacy of acetone in the sterilisation of ophthalmic instruments. *Indian Journal of Ophthalmology*, 41(1), 20-22.
- Al-Enazi, N. M., Awaad, A. S., Al-Othman, M. R., Al-Anazi, N. K., y Alqasoumi, S. I. (2018). Isolation, identification & anti-candidal activity of filamentous fungi from Saudi Arabia soil. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(2), 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.12.003>
- Albayrak, Ç. B. (2019). *Bacillus* species as biocontrol agents for fungal plant pathogens. En M. T. Islam, M. M. Rahman, P. Pandey, M. H. Boehme, & G. Haesaert (Eds.), *Bacilli & agrobiotechnology: phytostimulation & biocontrol: Volume 2* (pp. 239-265). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_13)
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V, Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517-D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Aleksandra, C., Malcolm, B., y J., P. A. (2012). Protection of *Bacillus pumilus* spores by catalases. *Applied & Environmental Microbiology*, 78(18), 6413-6422. <https://doi.org/10.1128/AEM.01211-12>
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., y Bahramnejad, B. (2020). Volatile compounds mediated effects of *Stenotrophomonas maltophilia* strain UN1512 in plant growth promotion & its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, 112, 101555. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101555>
- Alongkorn, A., Suranat, P., Nattapong, S., Supapon, C., y Morakot, T. (2009). Insect-specific Polyketide Synthases (PKSs), potential PKS-Nonribosomal Peptide Synthetase hybrids, & novel PKS clades in tropical fungi. *Applied & Environmental Microbiology*, 75(11), 3721-3732. <https://doi.org/10.1128/AEM.02744-08>
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., y Wellington, E. M. H. (2020). Microbiological & molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive

- prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned & challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Amnuaykanjanasin, A., Punya, J., Paungmoung, P., Rungrod, A., Tachaleat, A., Pongpattanakitshote, S., Cheevadhanarak, S., y Tanticharoen, M. (2005). Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.038>
- Anesio, A. M., Lutz, S., Christmas, N. A. M., y Benning, L. G. (2017). The microbiome of glaciers & ice sheets. *npj Biofilms & Microbiomes*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0019-0>
- Antonopoulou, I., Iancu, L., Jütten, P., Piechot, A., Rova, U., y Christakopoulos, P. (2019). Screening of novel feruloyl esterases from *Talaromyces wortmannii* for the development of efficient & sustainable syntheses of feruloyl derivatives. *Enzyme & Microbial Technology*, 120, 124-135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.08.007>
- Arantes, V., Milagres, A. M. F., Filley, T. R., y Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides & lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(4), 541-555. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0798-2>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., y Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 53(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>
- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., y Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>
- Assaf, C. E. H., Zetina-Serrano, C., Tahtah, N., Khoury, A. El, Atoui, A., Oswald, I. P., Puel, O., y Lorber, S. (2020). Regulation of secondary metabolism in the *Penicillium* genus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1-26. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249462>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., y Blamey, J. M. (2019). Thermophiles & the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, 280, 478-488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Aunpad, R., y Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA & anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology*, 55(4), 308-313. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0632-2>
- Austin, B. (2017). The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1247-1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0840-8>
- Ayuso-Sacido, A., y Genilloud, O. (2005). New PCR primers for the screening of NRPS & PKS-I

systems in actinomycetes: detection & distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49(1), 10-24. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0249-6>

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>



Bach, E., Rangel, C. P., Ribeiro, I. D. A., y Passaglia, L. M. P. (2022). Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, & *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. *Molecular Genetics & Genomics*, 297(4), 1063-1079. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01907-0>

Balasubramanian, N., y Simões, N. (2014). *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 132-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.014>

Baldrian, P. (2017). Forest microbiome: diversity, complexity & dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 109-130. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw040>

Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., y Valášková, V. (2011). Production of extracellular enzymes & degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant & Soil*, 338(1), 111-125. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0324-3>

Barnes, E. M., y Shrimpton, D. H. (1958). The effect of tetracycline compounds on the storage life & microbiology of chilled eviscerated poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 21(2), 313-329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1958.tb00149.x>

Barnett, J. R., y Bonham, V. A. (2004). Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(2), 461-472. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006377>

Barreiro, C., y Barredo, J. (2021). Worldwide clinical demand for antibiotics: is it a real countdown? En Barreiro C & J. L. Barredo (Eds.), *Antimicrobial Therapies - Methods & Protocols* (Vol. 2296, pp. 3-15). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1358-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1358-0_1)

Barreiro, C., y García-Estrada, C. (2019). Proteomics & *Penicillium chrysogenum*: unveiling the secrets behind penicillin production. *Journal of proteomics*, 198, 119-131. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.006>

Battan, B., Sharma, J., y Kuhad, R. C. (2006). High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22(12), 1281-1287. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9173-x>

- Bauer, H., Fuerhacker, M., Zibuschka, F., Schmid, H., y Puxbaum, H. (2002). Bacteria & fungi in aerosols generated by two different types of wastewater treatment plants. *Water Research*, 36(16), 3965-3970. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00121-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00121-5)
- Beals, E. W. (1984). *Bray-Curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data* (A. MacFadyen & E. D. B. T.-A. in E. R. Ford (eds.); Vol. 14, pp. 1-55). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60168-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60168-3)
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., y Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, & properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 95(3), 593-600. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4181-2>
- Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., y Schweizer, E. (1990). The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. *European Journal of Biochemistry*, 192(2), 487-498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19252.x>
- Bejo, L., Tolvaj, L., Kannar, A., y Preklet, E. (2019). Effect of water leaching on photodegraded spruce wood monitored by IR spectroscopy. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry*, 382, 111948. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111948>
- Bell, S., Simpson, M., Tyrväinen, L., Sievänen, T., y Pröbstl, U. (2009). *European forest recreation & tourism* (U. Bell, S. , Simpson, M. , Tyrväinen, L. , Sievänen, T. , Pröbstl (ed.)). Taylor & Francis.
- Bender, Madigan, Buckley, Sattley, y Stahl. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15.<sup>a</sup> ed.). Pearson Education Limited 2019.
- Betts, M. G., Wolf, C., Ripple, W. J., Phalan, B., Millers, K. A., Duarte, A., Butchart, S. H. M., y Levi, T. (2017). Global forest loss disproportionately erodes biodiversity in intact landscapes. *Nature*, 547(7664), 441-444. <https://doi.org/10.1038/nature23285>
- Beuchat, L. R. (1993). Selective media for detecting & enumerating foodborne yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 19(1), 1-14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90119-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90119-2)
- Bi, R., Lawoko, M., y Henriksson, G. (2016). *Phoma herbarum*, a soil fungus able to grow on natural lignin & synthetic lignin (DHP) as sole carbon source & cause lignin degradation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(8), 1175-1182. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1783-1>
- Bingle, L. E. H., Simpson, T. J., y Lazarus, C. M. (1999). Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics & Biology*, 26(3), 209-223. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1115>
- Bladt, T. T., Frisvad, J. C., Knudsen, P. B., y Larsen, T. O. (2013). Anticancer & antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* & other filamentous fungi. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(9), 11338-11376. <https://doi.org/10.3390/molecules180911338>

- Błaszczuk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., y Jędryczka, M. (2014). *Trichoderma* spp. - application & prospects for use in organic farming & industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 309-317. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., y Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection & comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Boddy, L., y Hiscox, J. (2016). Fungal ecology: principles & mechanisms of colonization & competition by saprotrophic fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0019-2016>
- Bolotin, E., y Hershberg, R. (2016). Bacterial intra-species gene loss occurs in a largely clocklike manner mostly within a pool of less conserved & constrained genes. *Scientific Reports*, 6(1), 35168. <https://doi.org/10.1038/srep35168>
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., y Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185-194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>
- Box, G. E. P., y Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455. <https://doi.org/10.2307/1266454>
- BPSTATS. (2019). BP Statistical Review of World Energy Statistical Review of World, 68th edition. *The Editor BP Statistical Review of World Energy*, 1-69. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2019-full-report.pdf>
- BPSTATS. (2020). BP Statistical Review of World Energy Statistical Review of World, 69th edition. *The Editor BP Statistical Review of World Energy*, 66. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid & sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bressuire-Isoard, C., Broussolle, V., y Carlin, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence & insights on underlying molecular & physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 614-626. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy021>
- Bright, R. M., Antón-Fernández, C., Astrup, R., Cherubini, F., Kvalevåg, M., y Strømman, A. H. (2014). Climate change implications of shifting forest management strategy in a boreal forest ecosystem of Norway. *Global Change Biology*, 20(2), 607-621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.12451>
- Brischke, C., y Alfredsen, G. (2020). Wood-water relationships & their role for wood susceptibility to fungal decay. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 104(9), 3781-3795.

<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10479-1>

- Brocco, V. F., Paes, J. B., Costa, L. G. da, Brazolin, S., y Arantes, M. D. C. (2017). Potential of teak heartwood extracts as a natural wood preservative. *Journal of Cleaner Production*, *142*, 2093-2099. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.11.074>
- Broda, M. (2020). Natural compounds for wood protection against fungi—A review. *Molecules*, *25*(15), 1-24. <https://doi.org/10.3390/molecules25153538>
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., y White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, *4*(165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
- Bruce, A., King, B., y Highley, T. L. (1991). Decay resistance of wood removed from poles biologically treated with *Trichoderma*. *Holzforschung*, *45*(4), 307-312. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1991.45.4.307>
- Bruce, A., Stewart, D., Verrall, S., y Wheatley, R. E. (2003). Effect of volatiles from bacteria & yeast on the growth & pigmentation of sapstain fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *51*(2), 101-108. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00088-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00088-4)
- Bulian, F., y Graystone, J. (2009). *Wood Coatings: Theory & Practice*. Elsevier Science. <https://books.google.es/books?id=83z2s09ffEkC>



- Caffrey, B. E., Williams, T. A., Jiang, X., Toft, C., Hokamp, K., y Fares, M. A. (2012). Proteome-wide analysis of functional divergence in bacteria: exploring a host of ecological adaptations. *PLoS ONE*, *7*(4), e35659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035659>
- Caldeira, A. T., Feio, S. S., Arteiro, J. M. S., Coelho, A. V., y Roseiro, J. C. (2008). Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(3), 808-816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03601.x>
- Caldeira, A. T., Feio, S. S., Arteiro, J. M. S., y Roseiro, J. C. (2006). Antimicrobial activity of steady-state cultures of *Bacillus* sp. CCMI 1051 against wood contaminant fungi. *Biochemical Engineering Journal*, *30*(3), 231-236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.04.005>
- Calder, I. R., y Aylward, B. (2006). Forest & floods: moving to an evidence-based approach to watershed & integrated flood management. *Water International*, *31*(1), 87-99. <https://doi.org/10.1080/02508060608691918>
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., y Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS*, *25*(9), 1327-1333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elps.200305844>
- Carlson, C. J., Kracalik, I. T., Ross, N., Alexander, K. A., Hugh-Jones, M. E., Fegan, M., Elkin, B. T., Epp, T., Shury, T. K., Zhang, W., Bagirova, M., Getz, W. M., y Blackburn, J. K. (2019).

- The global distribution of *Bacillus anthracis* & associated anthrax risk to humans, livestock & wildlife. *Nature Microbiology*, 4(8), 1337-1343. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0435-4>
- Caselli, E., Pancaldi, S., Baldisserotto, C., Petrucci, F., Impallaria, A., Volpe, L., D'Accolti, M., Soffritti, I., Coccagna, M., Sassu, G., Bevilacqua, F., Volta, A., Bisi, M., Lanzoni, L., y Mazzacane, S. (2018). Characterization of biodegradation in a 17th century easel painting & potential for a biological approach. *PLOS ONE*, 13(12), e0207630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207630>
- Castro, J. F., Razmilic, V., Gomez-Escribano, J. P., Andrews, B., Asenjo, J., y Bibb, M. (2018). The 'gifted' actinomycete *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1433-1448. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1034-8>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., y Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Cha, M. Y., Lee, K. H., y Kim, Y. S. (2014). Micromorphological & chemical aspects of archaeological bamboos under long-term waterlogged condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.08.008>
- Chauhan, A., Ranjan, A., y Jindal, T. (2018). Biological control agents for sustainable agriculture, safe water & soil Health. En *Paradigms in Pollution Prevention* (pp. 71-83). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58415-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58415-7_6)
- Cháves-Sifontes, M., y Domine, M. E. (2013). Lignin, structure & applications depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chen, H., y Du, L. (2016). Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 100(2), 541-557. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7093-0>
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., Book, A. J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W., Grubbs, K. J., Horn, H. A., Hoffmann, F. M., Klassen, J. L., Knack, J. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Muller, L., Melo, W. G. P., ... Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, 10(1), 516. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
- Christian, S., Sabine, R., Henrik, E., Susanne, E., Uwe, V., y Michael, H. (1998). Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1869-1877. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1869-1877.1998>
- Churkina, G., Organschi, A., Reyer, C. P. O., Ruff, A., Vinke, K., Liu, Z., Reck, B. K., Graedel, T. E., y Schellnhuber, H. J. (2020). Buildings as a global carbon sink. *Nature Sustainability*, 3(4), 269-276. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0462-4>
- Clarridge 3rd, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology & infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*,

17(4), 840-862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

Cogulet, A., Blanchet, P., y Landry, V. (2018). The multifactorial aspect of wood weathering: a review based on a holistic approach of wood degradation protected by clear coating. *BioResources*, 13(1), 2116-2138. <https://doi.org/10.15376/biores.13.1.Cogulet>

Coil, D., Jospin, G., y Darling, A. E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4), 587-589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>

Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D. H., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E. M., y Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 108-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>

Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., y Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology & regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3072-3080. <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3072-3080.2000>



da Silva, R. R., Pedezzi, R., y Souto, T. B. (2017). Exploring the bioprospecting & biotechnological potential of white-rot & anaerobic *Neocallimastigomycota* fungi: peptidases, esterases, & lignocellulolytic enzymes. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 101(8), 3089-3101. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8225-5>

Damm, U., Fourie, P. H., y Crous, P. W. (2010). *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov. & *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia*, 24, 60-80. <https://doi.org/10.3767/003158510X500705>

Daniel, G. (2003). Microview of wood under degradation by bacteria & fungi. En *Wood Deterioration & Preservation* (Vol. 845, pp. 4-34). American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2003-0845.ch004>

Daniel, G. (2014). Fungal & bacterial biodegradation: white rots, brown rots, soft rots & bacteria. En *ACS Symposium Series* (Vol. 1158, pp. 23-58). <https://doi.org/10.1021/bk-2014-1158.ch002>

Daniel, G. (2016a). Fungal degradation of wood cell walls. En Y. S. Kim, R. Funada, & A. P. Singh (Eds.), *Secondary xylem biology: Origins, functions, & applications* (pp. 131-167). Academic Press.

Daniel, G. (2016b). Microscope techniques for understanding wood cell structure & biodegradation. En Y. S. Kim, R. Funada, & A. P. Singh (Eds.), *Secondary xylem biology: origins, functions & applications* (pp. 309-343). Academic Press.

Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Cleary, W. G., y Sawcyc, M. K. (1984). Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* showing altered pathogenicity. *Microbiology*, 130(9), 2447-2455. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-9-2447>

- Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H. K., y Thakur, D. (2018). Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC Microbiology*, 18(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1215-7>
- Dass, C., y Teyegaga, A. (1996). Growth suppression of some wood-decay & other fungi by *Bacillus subtilis*. *Australian Journal of Botany*, 44(6), 705-712. <https://doi.org/10.1071/BT9960705>
- de Boer, W., Folman, L. B., Klein Gunnewiek, P. J. A., Svensson, T., Bastviken, D., Öberg, G., del Rio, J. C., y Boddy, L. (2010). Mechanism of antibacterial activity of the white-rot fungus *Hypholoma fasciculare* colonizing wood. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(5), 380-388. <https://doi.org/10.1139/W10-023>
- de Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., y Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 795-811. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.005>
- De la Cruz-López, N., Cruz-López, L., Holguín-Meléndez, F., Guillén-Navarro, G. K., y Huerta-Palacios, G. (2022). Volatile organic compounds produced by cacao endophytic bacteria & their inhibitory activity on *Moniliophthora roreri*. *Current Microbiology*, 79(2), 35. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02696-2>
- De Maio, N., Shaw, L. P., Hubbard, A., George, S., Sanderson, N. D., Swann, J., Wick, R., AbuOun, M., Stubberfield, E., Hoosdally, S. J., Crook, D. W., Peto, T. E. A., Sheppard, A. E., Bailey, M. J., Read, D. S., Anjum, M. F., Walker, A. S., Stoesser, N., y Consortium, O. B. O. T. R. (2019). Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes. *Microbial Genomics*, 5(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000294>
- de Vries, R. P., Patyshakuliyeva, A., Garrigues, S., y Agarwal-Jans, S. (2020). The current biotechnological status & potential of plant & algal biomass degrading/modifying enzymes from Ascomycete Fungi. En H. Nevalainen (Ed.), *Grand challenges in fungal biotechnology* (pp. 81-120). Springer Nature Switzerland. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_4)
- Dehestani, A., Kazemitabar, K., Ahmadian, G., Jelodar, N. B., Salmanian, A. H., Seyedi, M., Rahimian, H., y Ghasemi, S. (2010). Chitinolytic & antifungal activity of a *Bacillus pumilus* chitinase expressed in *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters*, 32(4), 539-546. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0192-1>
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products & the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(2), 185-201. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>
- Demain, A. L., y Martens, E. (2017). Production of valuable compounds by molds & yeasts. *Journal of Antibiotics*, 70(4), 347-360. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.121>
- Demain, A. L., Newcomb, M., y Wu, J. H. (2005). Cellulase, clostridia, & ethanol. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 69(1), 124-154. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.124-154.2005>

- Devkota, P., Kloepper, J. W., Enebak, S. A., y Eckhardt, L. G. (2020). Towards biocontrol of ophiostomatoid fungi by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science & Technology*, 30(1), 19-32. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1682517>
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M. J., y Sayadi, S. (2005). Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(8-9), 1415-1423. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-5774-z>
- Díaz González, T. E., y Penas, Á. (2017). The high mountain area of northwestern Spain: the Cantabrian range, the Galician-Leonese mountains & the Bierzo trench. En J. Loidi (Ed.), *The Vegetation of the Iberian Peninsula: Volume 1* (pp. 251-321). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54784-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54784-8_7)
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., y Berić, T. (2017). The profile & antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00925>
- Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., y Caballero, P. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. En *Toxins* (Vol. 12, Número 7). <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
- Donnellan, J. E., Nags, E. H., y Levinson, H. S. (1964). Chemically defined, synthetic media for sporulation & for germination & growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 87(2), 332-336. <https://doi.org/10.1128/jb.87.2.332-336.1964>
- Donzella, S., Fumagalli, A., Arioli, S., Pellegrino, L., D'Incecco, P., Molinari, F., Speranza, G., Ubiali, D., Robescu, M. S., y Compagno, C. (2022). Recycling food waste & aaving water: optimization of the fermentation processes from cheese whey permeate to yeast oil. *Fermentation*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation8070341>
- Dox, A. W. (1910). The intracellular enzymes of *Penicillium* & *Aspergillus*: with special reference to those of *Penicillium camemberti*. *U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry*, 70 p. : ill.; 23 cm.-USDA. <https://handle.nal.usda.gov/10113/5421164>
- Duarte, M. C. T., Pellegrino, A. C. A., Portugal, E. P., Ponezi, A. N., y Franco, T. T. (2000). Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000200005>
- Dupuy, B., Mani, N., Katayama, S., y Sonenshein, A. L. (2005). Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel  $\sigma$  factor. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1196-1206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04456.x>
- Dušek, R., y Popelková, R. (2012). Theoretical view of the Shannon index in the evaluation of landscape diversity. *Acta Universitatis Carolinae, Geographica*, 47(2), 5-13. <https://doi.org/10.14712/23361980.2015.12>
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S. S., Bhattacharjee, A., y Ghosh, S. (2008). Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production & characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(4), 275-282.

<https://doi.org/10.1007/s10295-008-0304-2>



- Eastwood, D. C. (2014). Evolution of Fungal Wood Decay. En *Deterioration & Protection of Sustainable Biomaterials* (Vol. 1158, pp. 5-93). American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-2014-1158.ch005>
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., y Franson, M. A. H. (1988). *Standard methods for the examination of water & wastewater* (20th ed.).
- Eaton, R. A., y Hale, M. D. (1993). *Wood : decay, pests, & protection*. Chapman & Hall Ltd.
- Edlich, R. F., Winters, K. L., y Long, W. B. (2005). Treated wood preservatives linked to aquatic damage, human illness, & death - A societal problem. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v15.i2.80>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., y Theresa M., K. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7.3.6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- Ejaz, U., Sohail, M., y Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. En *Biomimetics* (Vol. 6, Número 3). <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., y El-Fakharany, E. M. (2021). A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, & their role in mankind's challenges. *Journal of Fungi*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- Elisashvili, V., y Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase & manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.020>
- Embacher, J., Neuhauser, S., Zeilinger, S., y Kirchmair, M. (2021). Microbiota associated with different developmental stages of the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050354>
- Emmert, E. A. B., Klimowicz, A. K., Thomas, M. G., y Handelsman, J. (2004). Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Applied & Environmental Microbiology*, 70(1), 104-113. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.104-113.2004>
- Esteves, B. M., y Pereira, H. M. (2009). Wood modification by heat treatment: a review. *BioResources*, 4(1), 370-404. <https://doi.org/10.15376/biores.4.1.370-404>
- European Union, T. C. of the. (2003). COUNCIL DIRECTIVE 2003/2/EC of 6 January 2003 on the marketing & use of arsenic (tenth adaptation to technical progress to COUNCIL DIRECTIVE 76/769/EEC). L 4, COUNCIL DI, 9-11.
- Eurostat. (2018). Agriculture, forestry & fishery statistics 2018 Edition. En *Eurostat*. <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/9455154/KS-FK-18-001-EN-N.pdf/a9ddd7db-c40c-48c9-8ed5-a8a90f4faa3f>

- Eurostat. (2020). *Agriculture, forestry & fishery statistics 2020 edition* (E. Cook (ed.)). <https://doi.org/10.2785/143455>
- Evans, J. A., Eyre, C. A., Rogers, H. J., Boddy, L., y Müller, C. T. (2008). Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecology*, 1(2-3), 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.06.001>
- Evdokimova, O. V, Miamin, V. E., y Valentovich, L. N. (2018). Biochemical & molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria isolated in Belarus. *Experimental Biology & Biotechnology*, 1 SE-Genetics, Microbiology & Molecular Biology. <https://journals.bsu.by/index.php/biology/article/view/2485>
- Evert, R. F., y Eichhorn, S. E. (2013). Raven Biology of Plants. En *Raven Biology of Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-1-319-15626-8>



- Fangio, M. F., Roura, S. I., y Fritz, R. (2010). Isolation & identification of *Bacillus* spp. & related genera from different starchy foods. *Journal of Food Science*, 75(4), M218-M221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01566.x>
- Farrow, M. R., y Washburn, K. (2019). A review of field experiments on the effect of forest bathing on anxiety & heart rate variability. *Global Advances in Health & Medicine*, 8, 216495611984865. <https://doi.org/10.1177/2164956119848654>
- Faulds, C. B., y Williamson, G. (1995). Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 43(6), 1082-1087. <https://doi.org/10.1007/BF00166929>
- Fellahi, S., Chibani, A., Feuk-Lagerstedt, E., y Taherzadeh, M. J. (2016). Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis & gene sequencing. *AMB Express*, 6(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0213-0>
- Fierro, F., Montenegro, E., Gutiérrez, S., y Martín, J. F. (1996). Mutants blocked in penicillin biosynthesis show a deletion of the entire penicillin gene cluster at a specific site within a conserved hexanucleotide sequence. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 44(5), 597-604. <https://doi.org/10.1007/BF00172491>
- Fierro, F., Vaca, I., Castillo, N. I., García-Rico, R. O., y Chávez, R. (2022). *Penicillium chrysogenum*, a vintage model with a cutting-edge profile in biotechnology. En *Microorganisms* (Vol. 10, Número 3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030573>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., y Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., y Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant & ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T.,

- Ottillar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., ... Hibbett, D. S. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6089), 1715-1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Folman, L. B., Klein Gunnewiek, P. J. A., Boddy, L., y de Boer, W. (2008). Impact of white-rot fungi on numbers & community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 181-191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00425.x>
- Forsberg, K., Woodworth, K., Walters, M., Berkow, E. L., Jackson, B., Chiller, T., y Vallabhaneni, S. (2019). *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Medical Mycology*, 57(1), 1-12. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy054>
- Freeman, M. H., Shupe, T. F., Vlosky, R. P., y Barnes, H. M. (2003). Past, present, & future of the wood preservation industry. *Forest Products Journal*, 53(10), 8-15.
- Freitas-Silva, J., de Oliveira, B. F. R., Vigoder, F. de M., Muricy, G., Dobson, A. D. W., y Laport, M. S. (2021). Peeling the layers away: the genomic characterization of *Bacillus pumilus* 64-1, an isolate with antimicrobial activity from the marine sponge *Plakina cyanorosea* (Porifera, Homoscleromorpha). En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.592735>
- Freitas-Silva, J., Silva-Oliveira, T., Muricy, G., y Laport, M. S. (2020). *Bacillus* strains associated to *Homoscleromorpha* sponges are highly active against multidrug resistant bacteria. *Current Microbiology*, 77(5), 807-815. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01870-x>
- Fu, J., Huo, G., Feng, L., Mao, Y., Wang, Z., Ma, H., Chen, T., y Zhao, X. (2016). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for chiral pure meso-2,3-butanediol production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0502-5>
- Fukami, T., Dickie, I. A., Paula Wilkie, J., Paulus, B. C., Park, D., Roberts, A., Buchanan, P. K., y Allen, R. B. (2010). Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecology Letters*, 13(6), 675-684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01465.x>
- Fukasawa, Y., y Matsukura, K. (2021). Decay stages of wood & associated fungal communities characterise diversity–decomposition relationships. *Scientific Reports*, 11(1), 8972. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88580-2>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., y Saito, M. (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223-232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Fulbright, S. P., Chisholm, S., y Reardon, K. F. (2016). Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*. *Algal Research*, 20, 70-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.016>



- Gabriel, J., y Švec, K. (2017). Occurrence of indoor wood decay basidiomycetes in Europe. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.002>
- García-Calvo, L. (2018). *Búsqueda de nuevas feruloil esterasas fúngicas con aplicaciones biotecnológicas (Phd Thesis)*. Universidad de León.
- García-Calvo, L., Rodríguez-Castro, R., Ullán, R. V., Albillos, S. M., Fernández-Aguado, M., Vicente, C. M., Degnes, K. F., Sletta, H., y Barreiro, C. (2023). *Penicillium chrysogenum* as a fungal factory for feruloyl esterases. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 107(2), 691-717. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12335-w>
- García-Calvo, L., Ullán, R. V., Fernández-Aguado, M., García-Lino, A. M., Balaña-Fouce, R., y Barreiro, C. (2018). Secreted protein extract analyses present the plant pathogen *Alternaria alternata* as a suitable industrial enzyme toolbox. *Journal of Proteomics*, 177, 48-64. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.012>
- García-Estrada, C., Martín, J. F., Cueto, L., y Barreiro, C. (2020). Omics approaches applied to *Penicillium chrysogenum* & penicillin production: revealing the secrets of improved productivity. *Genes*, 11(6), 1-26. <https://doi.org/10.3390/genes11060712>
- García-Ortiz, V. R., Benítez-Rocha, G., Martínez-Pacheco, M., y Velázquez-Becerra, C. (2017). Principales preservadores maderables y exudados microbianos con actividad antagonista al desarrollo en agentes biológicos deletéreos. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-2>
- García-Ramón, D. C., Luque-Navas, M. J., Molina, C. A., del Val, C., Osuna, A., y Vilchez, S. (2015). Identification, sequencing & comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. *Plasmid*, 82, 17-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.09.001>
- García, R., Stadler, M., Gemperlein, K., y Müller, R. (2016). *Aetherobacter fasciculatus* gen. nov., sp. nov. & *Aetherobacter rufus* sp. nov., novel myxobacteria with promising biotechnological applications. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 66(2), 928-938. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000813>
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., y Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic & genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLOS ONE*, 11(2), e0150183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>
- Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, J. F., y Manzanares, P. (2018). Three antifungal proteins from *Penicillium expansum*: different patterns of production & antifungal activity. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02370>
- Gebily, D. A. S., Ghanem, G. A. M., Ragab, M. M., Ali, A. M., Soliman, N. E. K., y Abd El-Moity, T. H. (2021). Characterization & potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary infecting green bean. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00373-x>

- Gérardin, P. (2016). New alternatives for wood preservation based on thermal & chemical modification of wood— a review. *Annals of Forest Science*, 73(3), 559-570. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0531-4>
- Geudens, N., y Martins, J. C. (2018). Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp. – biological swiss-army knives. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01867>
- Gimenez, D., Phelan, A., Murphy, C. D., y Cobb, S. L. (2021). Fengycin A analogues with enhanced chemical stability & antifungal properties. *Organic Letters*, 23(12), 4672-4676. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c01387>
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G. C., Miserere, L., y Nicolotti, G. (2009). Mycobiota inhabiting sapwood of healthy & declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 38, 69-83. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD38-4.pdf>
- Giuseppe, B. D. C., A., C. S., A., G. D., y C., L. M. (2020). Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy. *mBio*, 11(6), e02123-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02123-20>
- Godfray, H. C. J., Mason-D’Croz, D., y Robinson, S. (2016). Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150467. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0467>
- Gomes, H. I., Mayes, W. M., Rogerson, M., Stewart, D. I., y Burke, I. T. (2016). Alkaline residues & the environment: a review of impacts, management practices & opportunities. *Journal of Cleaner Production*, 112, 3571-3582. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.111>
- Goodell, B., Winandy, J. E., y Morrell, J. J. (2020). Fungal degradation of wood: emerging data, new insights & changing perceptions. En *Coatings* (Vol. 10, Número 12). <https://doi.org/10.3390/coatings10121210>
- Gordon, R. E. (1974). The genus *Bacillus*. En A. I. Laskin (Ed.), *Handbook of Microbiology Edition* (p. 18). CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781351072939>
- Gorjón, S. (2020). Genera of corticioid fungi: keys, nomenclature & taxonomy. *Studies in Fungi*, 5. <https://doi.org/10.5943/sif/5/1/12>
- Gottheil, O., y Meyer, A. (1901). Botanische Beschreibung einiger bodenbakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene.*, 2(7), 680-691.
- Gower, S. T., Krankina, O., Olson, R. J., Apps, M., Linder, S., y Wang, C. (2001). Net primary production & carbon allocation patterns of boreal forest ecosystems. *Ecological Applications*, 11(5), 1395-1411. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2001\)011\[1395:NPPACA\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1890/1051-0761(2001)011[1395:NPPACA]2.0.CO;2)
- Granato, E. T., Meiller-Legrand, T. A., y Foster, K. R. (2019). The evolution & ecology of bacterial warfare. *Current Biology*, 29(11), R521-R537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.024>
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., y Peypoux, F. (2001). Lichenysin. *Applied biochemistry & biotechnology*, 90(3), 199-210.

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., y Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics & comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. & proposal for an emended genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753-5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

*H*

---

Hage, H., y Rosso, M.-N. (2021). Evolution of fungal carbohydrate-active enzyme portfolios & adaptation to plant cell-wall polymers. En *Journal of Fungi* (Vol. 7, Número 3). <https://doi.org/10.3390/jof7030185>

Haidar, R., Roudet, J., Bonnard, O., Dufour, M. C., Corio-Costet, M. F., Fert, M., Gautier, T., Deschamps, A., y Fermaud, M. (2016). Screening & modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydsopora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research*, 192, 172-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.003>

Haley, L. D., y Callaway, C. S. (1978). Laboratory methods in medical mycology. En *United States - Department of Health, Education & Welfare TA - TT - (4th ed.)*. U.S. Dept. of Health, Education & Welfare, Center for Disease Control.

Hamed, S. A. M. (2013). In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* & *Penicillium chrysogenum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 98-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.013>

Han, J. S., y Rowell, J. S. (2008). Chemical Composition of Fibers. *Cellulose*.

Handtke, S., Albrecht, D., Otto, A., Becher, D., Hecker, M., y Voigt, B. (2018). The proteomic response of *Bacillus pumilus* cells to glucose starvation. *PROTEOMICS*, 18(1), 1700109. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700109>

Hanefeld, U., Hollmann, F., y Paul, C. E. (2022). Biocatalysis making waves in organic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 51(2), 594-627. <https://doi.org/10.1039/D1CS00100K>

Hans, M., Kumar, S., Chandel, A. K., y Polikarpov, I. (2019). A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification & fermentation. *Process Biochemistry*, 85(February), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.019>

Hanstein, J. v. (1880). *Das Protoplasma als Träger der pflanzlichen und tierischen Lebensverrichtungen*.

Hao, K., Li, H., Li, F., y Guo, P. (2016). Complete genome sequence of *Bacillus pumilus* PDS1zg-1, a hydrocarbon-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil in China. *Genome Announcements*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01079-16>

Hasan, F., Khan, S., Shah, A., y Hameed, A. (2009). Production of antibacterial compounds by free & immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pakistan journal of Botany*, 41.

Hayes, M. A. (2012). The *Geomyces* fungi: ecology & distribution. *BioScience*, 62(9), 819-823. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.9.7>

- Hecker, M., Schumann, W., y Völker, U. (1996). Heat-shock & general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 19(3), 417-428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x>
- Helistö, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A., y Korpela, T. (2001). Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: isolation & purification of components. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications*, 758(2), 197-205. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00181-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00181-5)
- Hess, J., Balasundaram, S. V., Bakkemo, R. I., Drula, E., Henrissat, B., Högberg, N., Eastwood, D., y Skrede, I. (2021). Niche differentiation & evolution of the wood decay machinery in the invasive fungus *Serpula lacrymans*. *The ISME Journal*, 15(2), 592-604. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00799-5>
- Highley, T. L., y Dashek, W. V. (1998). Biotechnology in the study of brown-and white-rot decay. En A. Bruce & J. W. Palfreyman (Eds.), *Forest Products Biotechnology* (pp. 15-36). London: Taylor & Francis.
- Hiscox, J., y Boddy, L. (2017). Armed & dangerous – Chemical warfare in wood decay communities. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 169-184. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.07.001>
- Hiscox, J., O’Leary, J., y Boddy, L. (2018). Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology*, 89, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003>
- Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A. T., Jones, A. L., Brown, R., Stach, J. E. M., Goodfellow, M., Beil, W., Krämer, M., Imhoff, J. F., Süssmuth, R. D., y Fiedler, H.-P. (2009). Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *The Journal of Antibiotics*, 62(2), 99-104. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.24>
- Hon, D. (1994). Degradative effects of ultraviolet light & acid rain on wood surface quality. *Wood & fiber science*, 26(2), 185-191.
- Hoppe, B., Kahl, T., Karasch, P., Wubet, T., Bauhus, J., Buscot, F., y Krüger, D. (2014). Network analysis reveals ecological links between N-fixing bacteria & wood-decaying fungi. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088141>
- Hoppe, B., Krüger, D., Kahl, T., Arnstadt, T., Buscot, F., Bauhus, J., y Wubet, T. (2015). A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity & community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* & *Picea abies*. *Scientific Reports*, 5(April). <https://doi.org/10.1038/srep09456>
- Hosseini, H., Al-Jabri, H. M., Moheimani, N. R., Siddiqui, S. A., y Saadaoui, I. (2022). Marine microbial bioprospecting: exploitation of marine biodiversity towards biotechnological applications — a review. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1030-1043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202100504>
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2011). Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, 2(1), 87-95. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.12>

- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., y Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* & related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series & species. *Studies in Mycology*, 95, 5-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Howard, E. T., y Manwiller, F. G. (1969). Anatomical characteristics of southern pine stemwood. *Wood Science*, 2(2), 77-86.
- Huang, C., Xu, G., Wang, L., Zhang, P., Zhao, P., y Zhong, Y. (2021). Antagonistic properties & screening of *Bacillus Velezensis* Nhw-B72 against wood fungal decay. *Forests*, 12(6), 785. <https://doi.org/10.3390/f12060785>
- Huffman, J. A., Prenni, A. J., DeMott, P. J., Pöhlker, C., Mason, R. H., Robinson, N. H., Fröhlich-Nowoisky, J., Tobo, Y., Després, V. R., Garcia, E., Gochis, D. J., Harris, E., Müller-Germann, I., Ruzene, C., Schmer, B., Sinha, B., Day, D. A., Andreae, M. O., Jimenez, J. L., ... Pöschl, U. (2013). High concentrations of biological aerosol particles & ice nuclei during & after rain. *Atmospheric Chemistry & Physics*, 13(13), 6151-6164. <https://doi.org/10.5194/acp-13-6151-2013>
- Humar, M., Viljem, V., y Bojan, B. (2008). Properties of blue-stained wood. *Drvna industrija*, 59.



- Ibrar, M., Ullah, M. W., Manan, S., Farooq, U., Rafiq, M., y Hasan, F. (2020). Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 104(7), 2777-2801. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10399-0>
- Idris, A. S. O., Pandey, A., Rao, S. S., y Sukumaran, R. K. (2017). Cellulase production through solid-state tray fermentation, & its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresource Technology*, 242, 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.092>
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., y Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial & natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), 666-677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>
- Iqbal, S., Vollmers, J., y Janjua, H. A. (2021). Genome mining & comparative genome analysis revealed niche-specific genome expansion in antibacterial *Bacillus pumilus* strain SF-4. *Genes*, 12(7), 1060. <https://doi.org/10.3390/genes12071060>



- Jaber, S., Mercier, A., Knio, K., Brun, S., y Kambris, Z. (2016). Isolation of fungi from dead arthropods & identification of a new mosquito natural pathogen. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1763-3>
- Jacobsen, R. M., Kauserud, H., Sverdrup-Thygeson, A., Bjorbækmo, M. M., y Birkemoe, T.

- (2017). Wood-inhabiting insects can function as targeted vectors for decomposer fungi. *Fungal Ecology*, 29, 76-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.06.006>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., y Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Jayaram, M., y Nagao, H. (2018). Potato dextrose agar with rose-bengal & chloramphenicol: a new culture medium to isolate pathogenic *Exophiala dermatitidis* from the environment. *Klimik Dergisi/Klimik Journal*, 31, 11-15. <https://doi.org/10.5152/kd.2018.05>
- Jin, N., Liu, S. M., Peng, H., Huang, W. K., Kong, L. A., Wu, Y. H., Chen, Y. P., Ge, F. Y., Jian, H., y Peng, D. L. (2019). Isolation & characterization of *Aspergillus niger* NBC001 underlying suppression against *Heterodera glycines*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37827-6>
- Johnston, S. R., Boddy, L., y Weightman, A. J. (2016). Bacteria in decomposing wood & their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/iw179>
- Jönsson, L. J., Aliksson, B., y Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors & detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., y Olsson, L. (2003). Purification & characterization of five cellulases & one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme & Microbial Technology*, 32(7), 851-861. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00056-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00056-5)
- Jost, L. (2006). Entropy & diversity. *Oikos*, 113(2), 363-375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., y Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication & toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 20(4), 3719-3761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Juhnevica-Radenkova, K., Kviesis, J., Moreno, D. A., Seglina, D., Vallejo, F., Valdovska, A., y Radenkova, V. (2021). Highly-efficient release of ferulic acid from agro-industrial by-products via enzymatic hydrolysis with cellulose-degrading enzymes: part I—the superiority of hydrolytic enzymes versus conventional hydrolysis. En *Foods* (Vol. 10, Número 4). <https://doi.org/10.3390/foods10040782>
- Jurat-Fuentes, J. L., Heckel, D. G., y Ferré, J. (2021). Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 66(1), 121-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-052620-073348>

---



- Kancelista, A., Chmielewska, J., Korzeniowski, P., y Łaba, W. (2020). Bioconversion of sweet sorghum residues by *Trichoderma citrinoviride* C1 enzymes cocktail for effective bioethanol production. *Catalysts*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/catal10111292>

- Kango, N., Jana, U. K., y Choukade, R. (2019). Fungal enzymes: sources & biotechnological applications. En T. Satyanarayana, S. K. Deshmukh, & M. Deshpande (Eds.), *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology* (pp. 515-538). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9349-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9349-5_21)
- Karunasekera, H., y Daniel, G. (2015). Phylogenetic, molecular & decay analysis of *Phialophora* species causing soft rot of wood. *International Wood Products Journal*, 6(4), 189-197. <https://doi.org/10.1080/20426445.2015.1104077>
- Katzer, W., Blackburn, M., Charman, K., Martin, S., Penn, J., y Wrigley, S. (2001). Scale-up of filamentous organisms from tubes & shake-flasks into stirred vessels. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), 127-134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00112-1)
- Kaushal, M., Kumar, A., y Kaushal, R. (2017). *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter & bicontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech*, 7(2), 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0732-7>
- Khan, A., Doshi, H. V, y Thakur, M. C. (2016). *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. En M. T. Islam, M. Rahman, P. Pandey, C. K. Jha, & A. Aeron (Eds.), *Bacilli & Agrobiotechnology* (pp. 309-323). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13)
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., y Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, M.-J., Choi, Y.-S., Oh, J.-J., y Kim, G.-H. (2020). Experimental investigation of the humidity effect on wood discoloration by selected mold & stain fungi for a proper conservation of wooden cultural heritages. *Journal of Wood Science*, 66(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s10086-020-01878-z>
- Kirk, T. K., y Cullen, D. (1998). Enzymology & molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En R. A. Young & M. Akhtar (Eds.), *Environmentally friendly technologies for the pulp & paper industry* (pp. 273-307). Wiley.
- Klaassen, R. K. W. M. (2008). Bacterial decay in wooden foundation piles-Patterns & causes: A study of historical pile foundations in the Netherlands. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(1), 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.006>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical & next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kobabe, S., Wagner, D., y Pfeiffer, E.-M. (2004). Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(1), 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.05.003>
- Krah, F.-S., Bässler, C., Heibl, C., Soghigian, J., Schaefer, H., y Hibbett, D. S. (2018). Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1),

119. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1229-7>
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., y Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic & saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15670-15675. <https://doi.org/10.1073/pnas.2532165100>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., y Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Kumar, D., y Gupta, R. K. (2006). *Biocontrol of wood-rotting fungi*. 5(January), 20-25.
- Kumar, M., Pandey, A., Ezhumalai, R., y Shukla, S. (2022). Wood decay by fungi: challenges & prevention-. En R. Sundararaj (Ed.), *Science of Wood Degradation & its Protection* (pp. 33-85). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-8797-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-8797-6_2)
- Kumar, N., y Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 4, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Kumar, S., Aharwal, R. P., Jain, R., y Sandhu, S. S. (2021). Bioactive molecules of endophytic fungi & their potential in anticancer drug development. *Current Pharmacology Reports*, 7(2), 27-41. <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00251-y>
- Kunakom, S., y Eustáquio, A. S. (2019). *Burkholderia* as a source of natural products. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2018-2037. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01068>
- Kunttu, P., Pasanen, H., Rämä, T., Kulju, M., Kunttu, S.-M., y Kotiranta, H. (2020). Diversity & ecology of aphylloroid fungi on driftwood logs on the shores of the Baltic Sea. *Nordic Journal of Botany*, 38(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/njb.02735>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., y Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science. <https://books.google.es/books?id=yfg79rIIFIKC>

## L

- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. En E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic* (pp. 115-175). John Wiley & Sons.
- Laskaris, P., y Karagouni, A. D. (2021). Streptomyces, greek habitats & novel pharmaceuticals: a promising challenge. *Microbiology Research*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/microbiolres12040061>
- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., y Studholme, D. J. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection & Quantification*, 3, 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>
- Lee, T., Yun, S.-H., Hodge, K., Humber, R., Krasnoff, S., Turgeon, G., Yoder, O., y Gibson, D. (2001). Polyketide synthase genes in insect- & nematode-associated fungi. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 56(1), 181-187. <https://doi.org/10.1007/s002530100637>

- Lefort, V., Desper, R., y Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: a comprehensive, accurate, & fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology & Evolution*, 32(10), 2798-2800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv150>
- Lehninger, N. (2009). Principios de Bioquímica. En *Lehninger - Principios de Bioquímica 5ed.*
- Li, J., Sang, M., Jiang, Y., Wei, J., Shen, Y., Huang, Q., Li, Y., y Ni, J. (2021). Polyene-producing *Streptomyces* spp. from the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* exhibit high inhibitory activity against the antagonistic fungus *Xylaria*. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.649962>
- Li, L., Cai, Y., Jiang, Y., Liu, J., Ma, J., Yuan, C., Mu, Y., Han, L., y Huang, X. (2016). A unique macrolactam derivative via a [4+6]-cycloaddition from *Streptomyces niveus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(6), 1599-1604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.002>
- Li, Q., Cao, L., Wang, W., Tan, H., Jin, T., Wang, G., Lin, G., y Xu, R. (2018). Analysis of the bacterial communities in the waterlogged wooden cultural relics of the Xiaobaijiao No. 1 shipwreck via high-throughput sequencing technology. *Holzforschung*, 72(7), 609-619. <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0132>
- Liu, G., Qin, Y., Li, Z., y Qu, Y. (2013). Improving lignocellulolytic enzyme production with *Penicillium*: from strain screening to systems biology. *Biofuels*, 4(5), 523-534. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.38>
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., y Shao, Z. (2013). Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group & the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLOS ONE*, 8(11), e80097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., y Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5(1), 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Lopes, D. D., Rosa, C. A., Hector, R. E., Dien, B. S., Mertens, J. A., y Ayub, M. A. Z. (2017). Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(11), 1575-1588. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1979-z>
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., y Baldrian, P. (2016). Cellulose & hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, 6(1), 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- Lübeck, M. (Ed.). (2018). *Cellulases* (Vol. 1796). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9>



- Ma, D., Li, K., Zhao, L., y Liu, X. (2018). Optimization of solid-state fermentation process & development of biocontrol agent Based on cassava residue from *Streptomyces*

- microflavus*. *DEStech Transactions on Computer Science & Engineering*, mso. <https://doi.org/10.12783/dtcse/mso2018/20547>
- MacFaddin, J. F. (1985). *Media for isolation cultivation identification maintenance of medical bacteria*. Baltimore (Md.): Williams & Wilkins. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000079718>
- Mady, M., y Haggag, E. (2020). Review on fungi of genus *Penicillium* as a producers of biologically active polyketides. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 0-0. <https://doi.org/10.21608/aprh.2020.25896.1100>
- Maina, S., Prabhu, A. A., Vivek, N., Vlysidis, A., Koutinas, A., y Kumar, V. (2022). Prospects on bio-based 2,3-butanediol & acetoin production: recent progress & advances. *Biotechnology Advances*, 54, 107783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107783>
- Manavalan, T., Manavalan, A., y Heese, K. (2015). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485-498. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0743-0>
- Mantanis, G. I. (2017). Chemical modification of wood by acetylation or furfurylation: A review of the present scaled-up technologies. *BioResources*, 12(2), 4478-4489. <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.4478-4489>
- Manzo, N., D'Apuzzo, E., Coutinho, P. M., Cutting, S. M., Henrissat, B., y Ricca, E. (2011). Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization & degradation. *BMC Microbiology*, 11(1), 198. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-198>
- Mayer, K. M., Ford, J., Macpherson, G. R., Padgett, D., Volkmann-Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Murphy, C., Douglas, S. E., Wright, J. M., y Wright, J. L. C. (2007). Exploring the diversity of marine-derived fungal polyketide synthases. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(2), 291-302. <https://doi.org/10.1139/W06-131>
- Mayorga, M. E., y Timberlake, W. E. (1992). The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide & fatty acid synthases. *Molecular & General Genetics MGG*, 235(2), 205-212. <https://doi.org/10.1007/BF00279362>
- McDaniel, L. E., Bailey, E. G., y Zimmerli, A. (1965). Effect of oxygen-supply rates on growth of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*, 13(1), 109-114. <https://doi.org/10.1128/am.13.1.109-114.1965>
- Meier-Kolthoff, J. P., y Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1), 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L. A., Chertkov, O., Reddy, T. B. K., Pati, A., Ivanova, N. N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M., y Klenk, H.-P. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, & a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic*

*Sciences*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2>

- Méndez-Líter, J. A., de Eugenio, L. I., Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., y Martínez, M. J. (2021). Hemicellulases from *Penicillium* & *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: a review. *Bioresource Technology*, 324, 124623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124623>
- Mercado, V., y Olmos, J. (2022). Bacteriocin production by *Bacillus* species: isolation, characterization, & application. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1151-1169. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09966-w>
- Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mäntsälä, P., y Ylihonko, K. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 180(1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08770.x>
- Miljaković, D., Marinković, J., y Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression & growth promotion of field & vegetable crops. En *Microorganisms* (Vol. 8, Número 7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Min, B., Park, H., Jang, Y., Kim, J.-J., Kim, K. H., Pangilinan, J., Lipzen, A., Riley, R., Grigoriev, I. V., Spatafora, J. W., y Choi, I.-G. (2015). Genome sequence of a white rot fungus *Schizophora paradoxa* KUC8140 for wood decay & mycoremediation. *Journal of Biotechnology*, 211, 42-43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.426>
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., y Arora, N. K. (2015). Biopesticides: where we stand? En N. K. Arora (Ed.), *Plant microbes symbiosis: applied facets* (pp. 37-75). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_2)
- Mohajerani, A., Vajna, J., y Ellcock, R. (2018). Chromated copper arsenate timber: a review of products, leachate studies & recycling. *Journal of Cleaner Production*, 179, 292-307. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.111>
- Mohammadipanah, F., y Wink, J. (2016). Actinobacteria from arid & desert habitats: diversity & biological activity. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01541>
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., y Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochemistry & Biophysics Reports*, 10(February), 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Moita, C., Feio, S.-S., Nunes, L., Marcelo-Curto, M.-J., y Roseiro, J. C. (2005). Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(4), 261-269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.02.003>
- Montes-Osuna, N., Cernava, T., Gómez-Lama Cabanás, C., Berg, G., y Mercado-Blanco, J. (2022). Identification of volatile organic compounds emitted by two beneficial endophytic *Pseudomonas* strains from olive roots. En *Plants* (Vol. 11, Número 3). <https://doi.org/10.3390/plants11030318>

- Moralejo, F.-J., Cardoza, R.-E., Gutierrez, S., y Martin, J.-F. (1999). Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of Eexpression cassettes with strong fungal promoters & high gene dosage. *Applied & Environmental Microbiology*, 65(3), 1168-1174. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1168-1174.1999>
- Moran-Aguilar, M. G., Costa-Trigo, I., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J. M., y Aguilar-Uscanga, M. G. (2021). Production of cellulases & xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse & brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108060>
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., y Someya, T. (2019). Antifungal spectrum characterization & identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5(6), e01817. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- Morrell, J., y Sexton, C. (1990). Evaluation of a biological agent for controlling basidiomycete attack of douglas-fir & southern pine. *Wood & fiber science*, 22(1), 10-21.
- Morris, H., y Jansen, S. (2017). Bark: its anatomy, function & diversity. *International Dendrology Society*.
- Mould, D. L., y Hogan, D. A. (2021). Intraspecies heterogeneity in microbial interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 62, 14-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.04.003>
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., y Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263-273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Murphy, S. I., Chen, R., Belias, A. M., Chen, W., Zhang, L.-Q., Sunil, S., Bulut, E., Li, Y., Wiedmann, M., y Ivanek, R. (2022). Growth & survival of aerobic & Gram-negative bacteria on fresh spinach in a Chinese supply chain from harvest through distribution & refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 370, 109639. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109639>
- Murray, A. E., y Grzymalski, J. J. (2007). Diversity & genomics of Antarctic marine microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2259-2271. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1944>

---



Naciones Unidas. (2020). *Informe de los objetivos de desarrollo sostenible 2020*. [https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2020\\_Spanish.pdf](https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2020_Spanish.pdf)

- Nagar, S., y Gupta, V. K. (2021). Hyper production & cco-friendly bleaching of kraft pulp by xylanase from *Bacillus pumilus* SV-205 using agro waste material. *Waste & Biomass Valorization*, 12(7), 4019-4031. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01258-0>
- Nasran, H. S., Mohd Yusof, H., Halim, M., y Abdul Rahman, N. (2020). Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112618>
- Nazir, R., Tazetdinova, D. I., y van Elsas, J. D. (2014). *Burkholderia terrae* BS001 migrates proficiently with diverse fungal hosts through soil & provides protection from antifungal agents. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00598>
- Nazir, R., Warmink, J. A., Voordes, D. C., van de Bovenkamp, H. H., van Elsas, J. D., Tazetdinova, D. I., y van Elsas, J. D. (2013). Inhibition of mushroom formation & induction of glycerol release-ecological strategies of *Burkholderia terrae* BS001 to create a hospitable niche at the fungus *Lyophyllum* sp. Strain Karsten. *Microbial Ecology*, 65(1), 245-254. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0100-4>
- Neal-McKinney, J. M., Liu, K. C., Lock, C. M., Wu, W.-H., y Hu, J. (2021). Comparison of MiSeq, MinION, & hybrid genome sequencing for analysis of *Campylobacter jejuni*. *Scientific Reports*, 11(1), 5676. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84956-6>
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2017). Lehninger Principles of Biochemistry 7th. *W.H. Freeman & Company*.
- Nguyen, C. T., Dhakal, D., Pham, V. T. T., Nguyen, H. T., y Sohng, J.-K. (2020). Recent advances in strategies for activation & discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 8(4), 616. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040616>
- Nicault, M., Tidjani, A.-R., Gauthier, A., Dumarçay, S., Gelhaye, E., Bontemps, C., y Leblond, P. (2020). Mining the biosynthetic potential for specialized metabolism of a *Streptomyces* soil community. En *Antibiotics* (Vol. 9, Número 5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050271>
- Nicoletti, R., Fiorentino, A., y Scognamiglio, M. (2014). Endophytism of *Penicillium* species in woody plants. *The Open Mycology Journal*, 8(1), 1-26. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010001>
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., y Stanković, S. (2019). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 & *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 & SS-38.4) strains. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 165-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.14070>
- Nilsson, T., y Björdal, C. (2008). Culturing wood-degrading erosion bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(1), 3-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.006>
- Nilsson, T., y Daniel, G. (1992). Attempts to isolate tunnelling bacteria through physical separation from other bacteria by the use of cellophane. *Document-the International*

*Research Group on Wood Preservation (Sweden).*

Nithyapriya, S., Lalitha, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Dailin, D. J., El Enshasy, H. A., Luh Suriani, N., y Herlambang, S. (2021). Production, purification, & characterization of bacillibactin siderophore of *Bacillus subtilis* & Its application for improvement in plant growth & oil content in sesame. En *Sustainability* (Vol. 13, Número 10). <https://doi.org/10.3390/su13105394>



Okazaki, S., Sano, N., Yamada, T., Ishii, K., Kojima, K., Djedidi, S., Artigas Ramírez, M. D., Yuan, K., Kanekatsu, M., Ohkama-Ohtsu, N., Hirose, Y., Oshima, K., Hattori, M., y Yokoyama, T. (2019). Complete genome sequence of plant growth-promoting *Bacillus pumilus* TUAT1. *Microbiology Resource Announcements*, 8(21). <https://doi.org/10.1128/MRA.00076-19>

Oliver, J. D., Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., y Baird, R. M. (2012). *Handbook of culture media for food & water microbiology*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551450>

On advances & challenges in biocatalysis. (2018). *Nature Catalysis*, 1(9), 635-636. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0157-7>

Onaka, H. (2017). Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in Actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 70(8), 865-870. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.51>

Ortega, N., D. Busto, M., y Perez-Mateos, M. (2001). Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47(1), 7-14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00101-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00101-3)

Osada, H. (2019). Discovery & applications of nucleoside antibiotics beyond polyoxin. *The Journal of Antibiotics*, 72(12), 855-864. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0237-1>

Ou, S., y Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation & applications in foods. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 84(11), 1261-1269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>



Palani Swamy, S. kumaran, y Govindaswamy, V. (2015). Therapeutical properties of ferulic acid & bioavailability enhancement through feruloyl esterase. *Journal of Functional Foods*, 17, 657-666. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.013>

Pallardy, S. G. (2008). The woody plant body. En *Physiology of woody plants* (pp. 9-38). <https://doi.org/10.1016/b978-012088765-1.50003-8>

Pan, Y., Birdsey, R. A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P. E., Kurz, W. A., Phillips, O. L., Shvidenko, A., Lewis, S. L., Canadell, J. G., Ciais, P., Jackson, R. B., Pacala, S. W., McGuire, A. D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., y Hayes, D. (2011). A large & persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333(6045), 988-993. <https://doi.org/10.1126/science.1201609>

- Pánek, M., Reinprecht, L., y Hulla, M. (2014). Ten essential oils for beech wood protection. Efficacy against wood-destroying fungi & moulds, & effect on wood discoloration. *BioResources*; Vol 9, No 3 (2014). <https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/5577>
- Panel, E. B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., y Hilbert, F. (2020). *Microbial species as notified to EFSA*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4498899>
- Panel, E. B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernandez Escamez, P. S., ... Herman, L. (2019, julio 15). *The list of QPS status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3336268>
- Panfoli, I., Calzia, D., Santucci, L., Ravera, S., Bruschi, M., y Candiano, G. (2012). A blue dive: from 'blue fingers' to 'blue silver'. A comparative overview of staining methods for in-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 9(6), 627-634. <https://doi.org/10.1586/epr.12.63>
- Park, B. H., Karpinets, T. V., Syed, M. H., Leuze, M. R., y Uberbacher, E. C. (2010). CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching & analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZy database. *Glycobiology*, 20(12), 1574-1584. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq106>
- Peeters, C., Meier-Kolthoff, J. P., Verheyde, B., De Brandt, E., Cooper, V. S., y Vandamme, P. (2016). Phylogenomic study of *Burkholderia glathei*-like organisms, proposal of 13 novel *Burkholderia* species & emended descriptions of *Burkholderia sordidicola*, *Burkholderia zhejiangensis* & *Burkholderia grimmiae*. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00877>
- Pellicciaro, M., Lione, G., Giordano, L., y Gonthier, P. (2021). Biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* against *Heterobasidion* species attacking conifers in Europe. *Biological Control*, 157, 104583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104583>
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., y Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable & healthy agriculture: recent studies & innovations. *Planta*, 251(3), 70. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
- Pereira, L. B., Palermo, B. R. Z., Carlos, C., y Ottoboni, L. M. M. (2017). Diversity & antimicrobial activity of bacteria isolated from different Brazilian coral species. *FEMS Microbiology Letters*.
- Pérez-García, F., Vasco-Cárdenas, M. F., y Barreiro, C. (2016). Biotypes analysis of *Corynebacterium glutamicum* growing in dicarboxylic acids demonstrates the existence of industrially-relevant intra-species variations. *Journal of Proteomics*, 146, 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.030>

- Petrillo, C., Castaldi, S., Lanzilli, M., Selci, M., Cordone, A., Giovannelli, D., y Isticato, R. (2021). Genomic & physiological characterization of Bacilli isolated from salt-pans with plant growth promoting features. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 715678. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715678>
- Plaza, A., Garcia, R., Bifulco, G., Martinez, J. P., Hüttel, S., Sasse, F., Meyerhans, A., Stadler, M., y Müller, R. (2012). Aetheramides A & B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a Myxobacterium of the new genus "Aetherobacter". *Organic Letters*, *14*(11), 2854-2857. <https://doi.org/10.1021/ol3011002>
- Pointing, S. B., y Hyde, K. D. (2000). Lignocellulose-degrading marine fungi. *Biofouling*, *15*(1-3), 221-229. <https://doi.org/10.1080/08927010009386312>
- Pollack, J. D., y Benham, R. W. (1957). The chlamydospores of *Candida albicans*: comparison of three media for their induction. *The Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, *50*(2), 313-317. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214357900379>
- Pollegioni, L., Tonin, F., y Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*, *282*(7), 1190-1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>
- Popescu, C. M. (2017). Wood as bio-based building material. En *Performance of Bio-based Building Materials*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100982-6.00002-1>
- Poppe, L., y Vértessy, B. G. (2018). The fourth wave of biocatalysis emerges— The 13 th International Symposium on Biocatalysis & Biotransformations. *ChemBioChem*, *19*(4), 284-287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201700687>
- Posada, L., Romero-Tabarez, M., y Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components & culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess & biosystems engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1428-1>
- Pournou, A. (2020). Biodeterioration of Wooden Cultural Heritage. En *Biodeterioration of Wooden Cultural Heritage*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-46504-9>
- Prezioso, S. M., Brown, N. E., y Goldberg, J. B. (2017). Efmamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Molecular Microbiology*, *106*(1), 22-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mmi.13750>
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., y Berkeley, R. C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *37*(1), 69-71. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-69>
- Procópio, R. E. de L., Silva, I. R. da, Martins, M. K., Azevedo, J. L. de, y Araújo, J. M. de. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *16*(5), 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Pudova, D. S., Toymentseva, A. A., Gogoleva, N. E., Shagimardanova, E. I., Mardanova, A. M., y Sharipova, M. R. (2022). Comparative genome analysis of two *Bacillus pumilus* strains producing high level of extracellular hydrolases. *Genes*, *13*(3). <https://doi.org/10.3390/genes13030409>



- Qiao, C., Zhang, S., Li, Z., Chen, X., Li, X., y Lan, L. (2013). Improving poly-( $\gamma$ -glutamic acid) production & reducing impurities in fermentation broth by medium optimization using *Bacillus licheniformis* CGMCC3336. *Journal of Biobased Materials & Bioenergy*, 7(3), 390-394. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2013.1362>
- Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., Xu, L. H., y Li, W. J. (2009). Isolation, diversity, & antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna China. *Applied & Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01034-09>
- Qureshi, K. A., Bholay, A. D., Rai, P. K., Mohammed, H. A., Khan, R. A., Azam, F., Jaremko, M., Emwas, A. H., Stefanowicz, P., Waliczek, M., Kijewska, M., Ragab, E. A., Rehan, M., Elhassan, G. O., Anwar, M. J., y Prajapati, D. K. (2021). Isolation, characterization, anti-MRSA evaluation, & in-silico multi-target anti-microbial validations of actinomycin X2 & actinomycin D produced by novel *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ\_23. *Scientific Reports*, 11(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93285-7>



- Ramage, M. H., Burrige, H., Busse-Wicher, M., Fereday, G., Reynolds, T., Shah, D. U., Wu, G., Yu, L., Fleming, P., Densley-Tingley, D., Allwood, J., Dupree, P., Linden, P. F., y Scherman, O. (2017). The wood from the trees: the use of timber in construction. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 68(September 2016), 333-359. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.107>
- Ramoni, J., y Seiboth, B. (2016). Degradation of plant cell wall polymers by fungi. En I. S. Druzhinina & C. P. Kubicek (Eds.), *Environmental & microbial relationships* (pp. 127-148). Springer.
- Rapp, M. (1974). Indikator Zusätze zur Keimdifferenzierung auf Würze und Malzextrakt-Agar. *Milchwiss*, 29, 341-344.
- Raudonienė, V., Bridžiuvienė, D., Malachovskienė, E., y Levinskaitė, L. (2019). Biodegradation of wood treated with copper based preservative by two dematiaceous fungi: *Alternaria tenuissima* & *Ulocladium consortiale*. *Materials Science*, 25(3), 309-315. <https://doi.org/10.5755/J01.MS.25.3.20563>
- Reasoner, D. J., y Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration & subculture of bacteria from potable water. *Applied & environmental microbiology*, 49(1), 1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3883894>
- Reyes-Cortes, J. L., Azaola-Espinosa, A., Lozano-Aguirre, L., y Ponce-Alquicira, E. (2021). Physiological & genomic analysis of *Bacillus pumilus* UAMX isolated from the gastrointestinal tract of overweight individuals. *Microorganisms*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051076>
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P., y Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 8(2), 45.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>

- Ribera, J., Fink, S., Bas, M. D. C., y Schwarze, F. W. M. R. (2017). Integrated control of wood destroying basidiomycetes combining Cu-based wood preservatives & *Trichoderma* spp. *PLoS ONE*, 12(4), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174335>
- Ribera, J., Gandía, M., Marcos, J. F., Bas, M. D. C., Fink, S., y Schwarze, F. W. M. R. (2017). Effect of *Trichoderma*-enriched organic charcoal in the integrated wood protection strategy. *PLoS ONE*, 12(8), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183004>
- Ribera, J., y Schwarze, F. W. M. R. (2020). Biological control of wood decay basidiomycetes using *Trichoderma* spp. En V. K. Gupta, S. Zeilinger, H. B. Singh, & I. B. T.-N. & F. D. in M. B. & B. Druzhinina (Eds.), *New & Future Developments in Microbial Biotechnology & Bioengineering: Recent Developments in Trichoderma Research* (pp. 171-184). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819453-9.00008-8>
- Rice, A. V, y Currah, R. S. (2005). *Oidiodendron*: a survey of the named species & related anamorphs of *Myxotrichum*. *Studies in Mycology*, 53, 83-120. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim.53.1.83>
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E. A., Sun, H., LaButti, K. M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S. E., Pisabarro, A. G., Walton, J. D., ... Grigoriev, I. V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), 9923-9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>
- Ringman, R. (2017). *Biochemical mechanisms of brown rot decay: a study on the mode of action of modified wood (Phd Thesis)*. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung.
- Rinta-Kanto, J. M., Sinkko, H., Rajala, T., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Tamminen, M. V, y Timonen, S. (2016). Natural decay process affects the abundance & community structure of Bacteria & Archaea in *Picea abies* logs. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw087>
- Risdian, C., Mozef, T., y Wink, J. (2019). Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050124>
- Ritz, K. (2007). The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 358-362. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00331.x>
- Rivas-Martínez, S., Sáenz, S., y Penas, A. (2011). Worldwide bioclimatic classification system. *Global Geobotany*, 1, 1-634+4 Maps. <https://doi.org/10.5616/gg110001>
- Robinson, S. C., Weber, G., Hinsch, E., Vega Gutierrez, S. M., Pittis, L., y Freitas, S. (2014). Utilizing extracted fungal pigments for wood spalting: a comparison of induced fungal pigmentation to fungal dyeing. *Journal of Coatings*, 2014, 759073. <https://doi.org/10.1155/2014/759073>

- Rodrigues, C. J. C., y de Carvalho, C. C. C. R. (2022). Marine bioprospecting, biocatalysis & process development. *Microorganisms*, 10(10), 1965. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101965>
- Rodríguez-Castro, R. (2017). *Identificación y caracterización de las enzimas feruloil esterasas PcFaeA y PcFaeB de Penicillium chrysogenum para la valoración de residuos agroindustriales: escalado y análisis proteómico de la producción de extractos enzimáticos enriquecidos en* [Universidad de León]. <https://investigacion.ubu.es/documentos/5db1803b299952477238899a>
- Rodríguez Anda, R., Koch, G., Richter, H. G., Fuentes Talavera, F. J., Silva Guzmán, J. A., y Satyanarayana, K. G. (2019). Formation of heartwood, chemical composition of extractives & natural durability of plantation-grown teak wood from Mexico. *Holzforschung*, 73(6), 547-557. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0109>
- Rodríguez, V., Martín, J., Sarmiento-Vizcaíno, A., de la Cruz, M., García, L. A., Blanco, G., y Reyes, F. (2018). Anthracimycin B, a potent antibiotic against Gram-positive bacteria isolated from cultures of the deep-sea actinomycete *Streptomyces cyaneofuscatus* M-169. *Marine Drugs*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/md16110406>
- Rojas-Jiménez, K., y Hernández, M. (2015). Isolation of fungi & bacteria associated with the guts of tropical wood-feeding coleoptera & determination of their lignocellulolytic activities. *International Journal of Microbiology*, 2015, 285018. <https://doi.org/10.1155/2015/285018>
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M. del C., Macías-Rodríguez, L., y Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 & *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds & exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 13, 46-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>
- Romanelli, A. M., Fu, J., Herrera, M. L., y Wickes, B. L. (2014). A universal DNA extraction & PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycoses*, 57(10), 612-622. <https://doi.org/10.1111/myc.12208>
- Romano, S., Jackson, S. A., Patry, S., y Dobson, A. D. W. (2018). Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/md16070244>
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., y Pérez-García, A. (2007). The iturin & fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., y Giraud, T. (2020). Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* & its diversification into two varieties. *Current Biology*, 30(22), 4441-4453.e4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>

- Rowell, R. (2005). Handbook Of wood chemistry & wood composites. En *Handbook of Wood Chemistry & Wood Composites, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/b12487>
- Rusman, Y., Held, B. W., Blanchette, R. A., He, Y., y Salomon, C. E. (2018). Cadopherone & colomitide polyketides from *Cadophora* wood-rot fungi associated with historic expedition huts in Antarctica. *Phytochemistry*, *148*, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.019>



- Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Carina Audisio, M., y Brandan, C. P. (2020). Beneficial effect of *Bacillus* sp. P12 on soil biological activities & pathogen control in common bean. *Biological Control*, *141*, 104131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104131>
- Saggese, A., Culurciello, R., Casillo, A., Corsaro, M. M., Ricca, E., y Baccigalupi, L. (2018). A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*, *16*(6). <https://doi.org/10.3390/md16060180>
- Saggese, A., De Luca, Y., Baccigalupi, L., y Ricca, E. (2022). An antimicrobial peptide specifically active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. *BMC Microbiology*, *22*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02422-9>
- Said, S. D. (2007). Spore production of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*: effect of C/N ratio & glucose concentration. *Jurnal Rekayasa Kimia & Lingkungan*, *6*(1), 35-40.
- Sajitha, K. L., Dev, S. A., y Maria Florence, E. J. (2018). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* B1 against sapstain fungus in rubber wood. *European Journal of Plant Pathology*, *150*(1), 237-244. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1272-z>
- Salwan, R., y Sharma, V. (2020). Molecular & biotechnological aspects of secondary metabolites in Actinobacteria. *Microbiological Research*, *231*, 126374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
- Sambrook, J. F., y Russell, D. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. En *Cold Springs Harbour Press* (3.<sup>a</sup> ed., Vol. 1).
- Sandström, F., Petersson, H., Kruys, N., y Ståhl, G. (2007). Biomass conversion factors (density & carbon concentration) by decay classes for dead wood of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* & *Betula* spp. in boreal forests of Sweden. *Forest Ecology & Management - FOREST ECOLOGY & MANAGEMENT*, *243*, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.01.081>
- Sang, V. T., Dat, T. T., Vinh, L. B., Cuong, L. C., Oanh, P. T., Ha, H., Kim, Y. H., Anh, H. L., y Yang, S. Y. (2019). Coral & coral-associated microorganisms: a prolific source of potential bioactive natural products. En *Marine Drugs* (Vol. 17, Número 8). <https://doi.org/10.3390/md17080468>
- Sanjeev, K., Manibhushan, T., y Archana, R. (2014). *Trichoderma*: mass production, formulation, quality control, delivery & its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research*, *9*(53), 3838-3852. <https://doi.org/https://doi.org/10.5897/AJAR2014.9061>

- Sansinenea, E., y Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523-1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Sarsaiya, S., Jain, A., Kumar Awasthi, S., Duan, Y., Kumar Awasthi, M., y Shi, J. (2019). Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion & its importance with modern circular economy, challenges & future perspectives. *Bioresource Technology*, 291(July), 121905. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121905>
- Sauka, D. H., Basurto-Ríos, R. E., Ibarra, J. E., y Benintende, G. B. (2010). Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotropical Entomology*, 39(5), 767-773. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500016>
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., y Bagyaraj, D. J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health & nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1583-1594. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.14506>
- Schaeffer, A. B., y Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science (New York, N.Y.)*, 77(1990), 194. <https://doi.org/10.1126/science.77.1990.194>
- Schmidt, O. (2006). Wood & tree fungi. Biology, damage, protection & use. En *Springer*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/3-540-32139-X>
- Schmidt, O. (2007). Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification & characterization, prevention & control. *Mycological Progress*, 6(4), 261. <https://doi.org/10.1007/s11557-007-0534-0>
- Schmitt, I., Kautz, S., y Lumbsch, H. T. (2008). 6-MSAS-like polyketide synthase genes occur in lichenized ascomycetes. *Mycological Research*, 112(2), 289-296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.023>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B., y List, F. B. C. A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schultz, T. P., Nicholas, D. D., y Preston, A. F. (2007). A brief review of the past, present & future of wood preservation. *Pest management science*, 63(11), 784-788. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Schumann, W. (2003). The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress & Chaperones*, 8(3), 207-217. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)008<0207:tbshss>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008<0207:tbshss>2.0.co;2)
- Scognamiglio, T., Zinchuk, R., Gumpeni, P., y Larone, D. H. (2010). Comparison of inhibitory mold agar to Sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1924-1925. <https://doi.org/10.1128/JCM.01814-09>
- Scott, K., Louise, G. N., W., T. J., C., Y. O., y Gillian, T. B. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic & saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15670-15675. <https://doi.org/10.1073/pnas.2532165100>
- Sedlák, M., Vinter, V., Adamec, J., Vohradský, J., Voburka, Z., y Chaloupka, J. (1993). Heat shock

- applied early in sporulation affects heat resistance of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, 175(24), 8049-8052. <https://doi.org/10.1128/jb.175.24.8049-8052.1993>
- Seydlová, G., Halada, P., Fišer, R., Toman, O., Ulrych, A., y Svobodová, J. (2012). DnaK & GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 765-774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05238.x>
- Shagimardanova, E. I., Toymentseva, A. A., Balaban, N. P., Mardanov, A. M., Danilova, Y. V., Gusev, O. A., Kostyukova, E., Karpova, I., Manolov, A., Alexeev, D., y Sharipova, M. R. (2014). Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* 7P, isolated from the soil of the Tatarstan Republic, Russia. *Genome Announcements*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00599-14>
- Sharma, D., Ansari, M. J., Gupta, S., Ghamdi, A. Al, Pruthi, P., y Pruthi, V. (2015). Structural characterization & antimicrobial activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus pumilus* DSVP18 grown on potato peels. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(9). <https://doi.org/10.5812/jjm.21257>
- Sharma, P., Choudhary, B., Nagpure, A., y Gupta, R. K. (2016). Antifungal potential of actinomycete isolate *Streptomyces exfoliatus* MT9 against wood-rotting fungi. *Journal of Environmental Biology*, 37(6), 1231-1237. <https://doi.org/10.22438/jeb/37/6/MRN.1000>
- Shaw, J. J., Spakowicz, D. J., Dalal, R. S., Davis, J. H., Lehr, N. A., Dunican, B. F., Orellana, E. A., Narváez-Trujillo, A., y Strobel, S. A. (2015). Biosynthesis & genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 99(8), 3715-3728. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6206-5>
- Shen, J., Liu, Z., Yu, H., Ye, J., Long, Y., Zhou, P., y He, B. (2020). Systematic stress adaptation of *Bacillus subtilis* to tetracycline exposure. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 188, 109910. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109910>
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., y Rohr, J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 10, Unit-10E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>
- Shimizu, Y., Ogata, H., y Goto, S. (2017). Type III polyketide synthases: functional classification & phylogenomics. *ChemBioChem*, 18(1), 50-65. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600522>
- Shirling, E. B., y Gottlieb, D. (1966a). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Shirling, E. B., y Gottlieb, D. (1966b). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
- Simon, A., Bindschedler, S., Job, D., Wick, L. Y., Filippidou, S., Kooli, W. M., Verrecchia, E. P., y Junier, P. (2015). Exploiting the fungal highway: development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11), fiv116. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv116>

- Singh, A. P. (2012). A review of microbial decay types found in wooden objects of cultural heritage recovered from buried & waterlogged environments. *Journal of Cultural Heritage*, 13(3 SUPPL.), S16-S20. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.04.002>
- Singh, A. P., Kim, Y. S., y Chavan, R. R. (2019). Relationship of wood cell wall ultrastructure to bacterial degradation of wood. *IAWA Journal*, 40(4), 845-870. <https://doi.org/10.1163/22941932-40190250>
- Singh, A. P., Kim, Y. S., y Singh, T. (2016). Bacterial degradation of wood. En *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, & Applications* (Número December, pp. 169-190). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00009-7>
- Singh, A. P., y Wakeling, R. N. (1997). Presence of widespread bacterial attacks in preservative-treated cooling tower timbers. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 27(1), 79-85.
- Singh, G., y Arya, S. K. (2019). Antifungal & insecticidal potential of chitinases: a credible choice for the eco-friendly farming. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 20, 101289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101289>
- Singh, P. K., Ballesterro-Beltrán, S., Ramachandran, G., y Meijer, W. J. J. (2010). Complete nucleotide sequence & determination of the replication region of the sporulation inhibiting plasmid p576 from *Bacillus pumilus* NRS576. *Research in Microbiology*, 161(9), 772-782. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.07.007>
- Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., Wang, Y., Yang, L., y Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal & challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 220-238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., y Pandey, A. (2013). Role & significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Sisler, J. D., Mandler, W. K., Shaffer, J., Lee, T., McKinney, W. G., Battelli, L. A., Orandle, M. S., Thomas, T. A., Castranova, V. C., Qi, C., Porter, D. W., Andrew, M. E., Fedan, J. S., Mercer, R. R., y Qian, Y. (2019). Toxicological assessment of dust from sanding micronized copper-treated lumber in vivo. *Journal of Hazardous Materials*, 373(February), 630-639. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.068>
- Siupka, P., Hansen, F. T., Schier, A., Rocco, S., Sørensen, T., y Piotrowska-Seget, Z. (2021). Antifungal activity & biosynthetic potential of new *Streptomyces* sp. MW-W600-10 strain isolated from coal mine water. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147441>
- Slightom, J. L., Metzger, B. P., Luu, H. T., y Elhammer, A. P. (2009). Cloning & molecular characterization of the gene encoding the Aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938. *Gene*, 431(1-2), 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.011>
- Smith, N. R., Gibson, T., Gordon, R. E., y Sneath, P. H. (1964). Type cultures & proposed neotype cultures of some species in the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*,

- 34, 269-272. <https://doi.org/10.1099/00221287-34-2-269>
- Song, C. W., Park, J. M., Chung, S. C., Lee, S. Y., y Song, H. (2019). Microbial production of 2,3-butanediol for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(11), 1583-1601. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02231-0>
- Song, Y.-S., Seo, D.-J., y Jung, W.-J. (2019). Characterization & antifungal activity of chitosanase produced by *Pedobacter* sp. PR-M6. *Microbial Pathogenesis*, 129, 277-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.026>
- Sottorff, I., Wiese, J., Lipfert, M., Preußke, N., Sönnichsen, F. D., y Imhoff, J. F. (2019). Different secondary metabolite profiles of phylogenetically almost identical *Streptomyces griseus* strains originating from geographically remote locations. *Microorganisms*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060166>
- Sova, M., y Saso, L. (2020). Natural sources, pharmacokinetics, biological activities & health benefits of hydroxycinnamic acids & their metabolites. *Nutrients*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082190>
- Spadaro, D., y Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Spížek, J., y Řezanka, T. (2004). Lincomycin, clindamycin & their applications. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 64(4), 455-464. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1545-7>
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., y Menon, V. P. (2007). Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition*, 40(2), 92-100. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.40.92>
- Srivastava, D. S., Kumar, R., y Singh, V. (2013). *Wood Decaying Fungi*. LAP LAMBERT AcademyPublishing.
- Stein, W. E., Mannolini, F., Hernick, L. V., Landing, E., y Berry, C. M. (2007). Giant cladoxylopsid trees resolve the enigma of the Earth's earliest forest stumps at Gilboa. *Nature*, 446(7138), 904-907. <https://doi.org/10.1038/nature05705>
- Steinke, K., Mohite, O. S., Weber, T., y Kovács, Á. T. (2021). Phylogenetic distribution of secondary metabolites in the *Bacillus subtilis* species complex. *mSystems*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00057-21>
- Steinmetz, H., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., Höfle, G., y Jansen, R. (2007). Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: isolation from Myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis & biosynthesis. *Chemistry – A European Journal*, 13(20), 5822-5832. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.200700269>
- Stepanov, V. G., Tirumalai, M. R., Montazari, S., Checinska, A., Venkateswaran, K., y Fox, G. E. (2016). *Bacillus pumilus* SAFR-032 genome revisited: sequence update & re-Annotation. *PLOS ONE*, 11(6), e0157331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157331>

- Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4151-4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>
- Stop neglecting fungi. (2017). *Nature Microbiology*, 2(8), 17120. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120>
- Stopnisek, N., Zühlke, D., Carlier, A., Barberán, A., Fierer, N., Becher, D., Riedel, K., Eberl, L., y Weisskopf, L. (2016). Molecular mechanisms underlying the close association between soil *Burkholderia* & fungi. *The ISME Journal*, 10(1), 253-264. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.73>
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Mathew, G. M., y Pandey, A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock & its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34(2), 421-424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.05.008>
- Sun, H., Terhonen, E., Kasanen, R., y Asiegbu, F. O. (2014). Diversity & community structure of primary wood-inhabiting bacteria in boreal forest. *Geomicrobiology Journal*, 31(4), 315-324. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.827763>
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J., y Korpela, T. (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of environmental management*, 92(7), 1681-1689. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.03.004>



- Taherzadeh, M. J., y Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. En *BioResources* (Vol. 2, Número 4). <https://doi.org/10.15376/biores.2.4.707-738>
- Tak, E. J., Kim, H. S., Lee, J.-Y., Kang, W., Hyun, D.-W., Kim, P. S., Shin, N.-R., y Bae, J.-W. (2017). *Vagococcus martis* sp. nov., isolated from the small intestine of a marten, *Martes flavigula*. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3398-3402. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002131>
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F., y Horikoshi, K. (1997). Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 279-285. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10440.x>
- Tang, J. S., y Gillevet, P. M. (2003). Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 53(4), 995-997. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02372-0>
- Tartoff, K., y Hobbs, K. T. C. (1987). Improved media for growing plasmid & cosmid clones. *Focus*, 9, 9-12.
- Tascioglu, C., Yalcin, M., Sen, S., y Akcay, C. (2013). Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *International Biodeterioration & Biodegradation*,

- 85, 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.004>
- Teacă, C. A., Roșu, D., Mustață, F., Rusu, T., Roșu, L., Roșca, I., y Varganici, C. D. (2019). Natural bio-based products for wood coating & protection against degradation: A review. *BioResources*, 14(2), 4873-4901. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.Teaca>
- The CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3-8. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx089>
- Thomas, S. C., y MacLellan, J. (2009). Boreal & temperate forests. En *Forests & Forest Plants- Volume I* (p. 152). EOLSS Publications.
- Thunman, H., y Leckner, B. (2002). Thermal conductivity of wood - models for different stages of combustion. *Biomass & Bioenergy*, 23(1), 47-54. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00031-4)
- Tian, Q., Song, P., Jiang, L., Li, S., y Huang, H. (2014). A novel cephalosporin deacetylating acetyl xylan esterase from *Bacillus subtilis* with high activity toward cephalosporin C & 7-aminocephalosporanic acid. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 98(5), 2081-2089. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5056-x>
- Timms, J. F., y Cramer, R. (2008). Difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 8(23-24), 4886-4897. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800298>
- Tinôco, D., Pateraki, C., Koutinas, A. A., y Freire, D. M. G. (2021). Bioprocess development for 2,3-butanediol production by *Paenibacillus* strains. *ChemBioEng Reviews*, 8(1), 44-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cben.202000022>
- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., y Planinić, M. (2021). *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: state of the art, challenges & opportunities. *Bioresource Technology*, 330, 124997. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>
- Toghueo, R. M. K., y Boyom, F. F. (2020). Endophytic *Penicillium* species & their agricultural, biotechnological, & pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10(3), 107. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>
- Toljander, Y. K., Lindahl, B. D., Holmer, L., y Högborg, N. O. S. (2006). Environmental fluctuations facilitate species co-existence & increase decomposition in communities of wood decay fungi. *Oecologia*, 148(4), 625-631. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0406-3>
- Tornberg, K., y Olsson, S. (2002). Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1), 13-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00931.x>
- Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., y Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for plant growth promotion & stress resilience: what have we learned? *Plants*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/plants11192482>

U

---

- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., y Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among *Cyanobacteria* & plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/c>
- Ulyanova, V., Shah Mahmud, R., Dudkina, E., Vershinina, V., y Ilinskaya, O. (2014). Draft whole genome sequence of *Bacillus pumilus* strain 3-19, a chemical mutant overproducing extracellular ribonuclease. *Genome Announcements*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00724-14>
- Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F. P., González, M., Moore, E. R. B., Seeger, M., y Cámara, B. (2016). Exploring the diversity & antimicrobial potential of marine Actinobacteria from the Comau fjord in Northern Patagonia, Chile. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01135>
- Unlü, M., Morgan, M. E., y Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), 2071-2077. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181133>

V

---

- Vaishampayan, P. A., Rabbow, E., Horneck, G., y Venkateswaran, K. J. (2012). Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology*, 12(5), 487-497. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0738>
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S. K., Mathur, A., Puri, S. K., y Singhanía, R. R. (2018). *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2(2017), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>
- Valášková, V., de Boer, W., Klein Gunnewiek, P. J. A., Pospíšek, M., y Baldrian, P. (2009). Phylogenetic composition & properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood. *The ISME Journal*, 3(10), 1218-1221. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.64>
- Valente, S., Cometto, A., Piombo, E., Meloni, G. R., Ballester, A.-R., González-Candelas, L., y Spadaro, D. (2020). Elaborated regulation of griseofulvin biosynthesis in *Penicillium griseofulvum* & its role on conidiation & virulence. *International Journal of Food Microbiology*, 328, 108687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108687>
- van der Wal, A., Geydan, T. D., Kuyper, T. W., y de Boer, W. (2013). A thready affair: linking fungal diversity & community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(4), 477-494. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12001>
- van Heel, A. J., Montalban-Lopez, M., Oliveau, Q., y Kuipers, O. P. (2017). Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microbial Genomics*, 3(10), e000134. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000134>
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., y Urbaneja, A. (2018). Biological

- control using invertebrates & microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1), 39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vandini, A., Temmerman, R., Frabetti, A., Caselli, E., Antonioli, P., Balboni, P. G., Platano, D., Branchini, A., y Mazzacane, S. (2014). Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLOS ONE*, 9(9), e108598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108598>
- Vasco-Cárdenas, M. F., Baños, S., Ramos, A., Martín, J. F., y Barreiro, C. (2013). Proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to high concentration of industrially relevant C4 & C5 dicarboxylic acids. *Journal of Proteomics*, 85, 65-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.019>
- Velmurugan, N., Choi, M. S., Han, S.-S., y Lee, Y.-S. (2009). Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* & *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: *in vitro* & *in vivo* experiments. *The Journal of Microbiology*, 47(4), 385-392. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0018-9>
- Verma, N., Kumar, V., y Bansal, M. C. (2021). Valorization of waste biomass in fermentative production of cellulases: a review. *Waste & Biomass Valorization*, 12(2), 613-640. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01048-8>
- Verweij, P. E., Lucas, J. A., Arendrup, M. C., Bowyer, P., Brinkmann, A. J. F., Denning, D. W., Dyer, P. S., Fisher, M. C., Geenen, P. L., Gisi, U., Hermann, D., Hoogendijk, A., Kiers, E., Lagrou, K., Melchers, W. J. G., Rhodes, J., Rietveld, A. G., Schoustra, S. E., Stenzel, K., ... Fraaije, B. A. (2020). The one health problem of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: current insights & future research agenda. *Fungal Biology Reviews*, 34(4), 202-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.10.003>
- Veselova, M. A., Plyuta, V. A., y Khmel, I. A. (2019). Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, & biological activity. *Microbiology*, 88(3), 261-274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>
- Vieira, F. C. S., y Nahas, E. (2005). Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media & temperatures. *Microbiological Research*, 160(2), 197-202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.01.004>
- Vij, R., Hube, B., y Brunke, S. (2021). Uncharted territories in the discovery of antifungal & antivirulence natural products from bacteria. *Computational & Structural Biotechnology Journal*, 19, 1244-1252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.003>
- Villanueva, J., Switala, J., Ivancich, A., y Loewen, P. C. (2014). Genome sequence of *Bacillus pumilus* MTCC B6033. *Genome Announcements*, 2(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00327-14>
- Voda, K., Boh, B., Vrtačnik, M., y Pohleven, F. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* & the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(1), 51-59. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00075-6)
- Vojtěch, T., Vendula, B., Tomáš, V., Mayuko, J., Rubén, L.-M., Maria, O. M. L., Pedro, S. J., Rainier, H. Z., Tomáš, C., Ulisses, N. da R., y Petr, B. (2021). Complementary roles of wood-

inhabiting fungi & bacteria facilitate deadwood decomposition. *mSystems*, 6(1), e01078-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01078-20>



- Wada, H., Williams, H. E. L., y Moody, C. J. (2015). Total synthesis of the posttranslationally modified polyazole peptide antibiotic plantazolicin A. *Angewandte Chemie*, 127(50), 15362-15366. <https://doi.org/10.1002/ange.201507062>
- Wall, G., y Lopez-Ribot, J. L. (2020). Current antimycotics, new prospects, & future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics*, 9(8), 445. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080445>
- Wang, H., Rehman, K. ur, Liu, X., Yang, Q., Zheng, L., Li, W., Cai, M., Li, Q., Zhang, J., y Yu, Z. (2017). Insect biorefinery: a green approach for conversion of crop residues into biodiesel & protein. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0986-7>
- Wang, J., Tian, H., Kong, F., Wang, Y., Zhang, C., y Feng, C. (2015). Inhibition of *Bacillus pumilus* AR03 on *Alternaria alternata* & *Erysiphe cichoracearum* on tobacco. *The journal of applied ecology*, 26(10), 3167-3173.
- Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., y Yuan, Q. (2020). Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>
- Wang, Q., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, H., Song, J., Lyu, M., Chen, R., y Zhang, L. (2022). Comparative genomic analyses reveal genetic characteristics & pathogenic factors of *Bacillus pumilus* HM-7. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1008648>
- Wang, T., Liu, X., Wu, M.-B., y Ge, S. (2018). Molecular insights into the antifungal mechanism of bacilysin. *Journal of Molecular Modeling*, 24(5), 118. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3645-4>
- Wang, Z., Zhong, T., Chen, K., Du, M., Chen, G., Chen, X., Wang, K., Zalán, Z., Takács, K., y Kan, J. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX & potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. *Food Control*, 120, 107499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107499>
- Ward, R. M., Anderson, R. F., y Dean, F. K. (1963). Polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 grown on wheat glutenfile. *Biotechnology & Bioengineering*, 5(1), 41-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260050107>
- Waters, A. L., Peraud, O., Kasanah, N., Sims, J. W., Kothalawala, N., Anderson, M. A., Abbas, S. H., Rao, K. V., Jupally, V. R., Kelly, M., Dass, A., Hill, R. T., y Hamann, M. T. (2014). An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens* microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Frontiers in Marine Science*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00054>
- Watson, J. E. M., Evans, T., Venter, O., Williams, B., Tulloch, A., Stewart, C., Thompson, I., Ray, J. C., Murray, K., Salazar, A., McAlpine, C., Potapov, P., Walston, J., Robinson, J. G., Painter,

- M., Wilkie, D., Filardi, C., Laurance, W. F., Houghton, R. A., ... Lindenmayer, D. (2018). The exceptional value of intact forest ecosystems. En *Nature Ecology & Evolution* (Vol. 2, Número 4, pp. 599-610). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0490-x>
- Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., y Lee, S. Y. (2015). Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in Biotechnology*, 33(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.009>
- Wei, W., Zhou, Y., Chen, F., Yan, X., Lai, Y., Wei, C., Chen, X., Xu, J., y Wang, X. (2018). Isolation, diversity & antimicrobial & immunomodulatory activities of endophytic Actinobacteria from tea cultivars Zijuan & Yunkang-10 (*Camellia sinensis* var. *assamica*). En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01304>
- Weisskopf, L., Schulz, S., y Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom & inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 391-404. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00508-1>
- Wen, Z., Liao, W., y Chen, S. (2005). Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* & *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, 40(9), 3087-3094. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.044>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification & direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky, & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods & applications* (pp. 315-322). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., y Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short & long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Williams, K. J. (2009). The introduction of «chemotherapy» using arsphenamine - the first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 102(8), 343-348. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.09k036>
- Win, K. T., Okazaki, K., Ookawa, T., Yokoyama, T., y Ohwaki, Y. (2019). Influence of rice-husk biochar & *Bacillus pumilus* strain TUAT-1 on yield, biomass production, & nutrient uptake in two forage rice genotypes. *PLOS ONE*, 14(7), e0220236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220236>
- Wingfield, M. J., Barnes, I., de Beer, Z. W., Roux, J., Wingfield, B. D., y Taerum, S. J. (2017). Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects & tree hosts: current status—future prospects. *Biological Invasions*, 19(11), 3215-3228. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1468-3>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., y Yuen, K.-Y. (2008). Then & now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification & discovery of novel bacteria in clinical

microbiology laboratories. *Clinical Microbiology & Infection*, 14(10), 908-934. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>

Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., y Monte, E. (2022). *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>

Wright, G. D. (2017). Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, 34(7), 694-701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>

Wu, F., Ma, J., Cha, Y., Lu, D., Li, Z., Zhuo, M., Luo, X., Li, S., y Zhu, M. (2020). Using inexpensive substrate to achieve high-level lipase A secretion by *Bacillus subtilis* through signal peptide & promoter screening. *Process Biochemistry*, 99, 202-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.010>



Xi, L., Ruan, J., y Huang, Y. (2012). Diversity & biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the China seas. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 5917-5932. <https://doi.org/10.3390/ijms13055917>

Xia, L., Miao, Y., Cao, A., Liu, Y., Liu, Z., Sun, X., Xue, Y., Xu, Z., Xun, W., Shen, Q., Zhang, N., y Zhang, R. (2022). Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism & phylogeny in *Bacillus*. *Nature Communications*, 13(1), 1023. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28668-z>

Xing, M., Zheng, L., Deng, Y., Xu, D., Xi, P., Li, M., Kong, G., y Jiang, Z. (2018). Antifungal activity of natural volatile organic compounds against litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchii*. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020358>

Xu, C., Singh, D., Dorgan, K. M., Zhang, X., y Chen, S. (2015). Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(10), 745-752. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0156>

Xu, W., Wang, H., Lv, Z., Shi, Y., y Wang, Z. (2019). Antifungal activity & functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1042-1052. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1637279>



Yan, H., Yun, J., Ai, D., Zhang, W., Bai, J., y Guo, J. (2018). Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 & their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(2), 21. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2392-5>

Yang, G., Li, P., Meng, L., Xv, K., Dong, F., Qiu, Y., He, L., y Lin, L. (2018). Diversity & communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs & non-geoh herbs), & their biosynthetic potential analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 47-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.006>

- Yang, J.-K., Zhang, J.-J., Yu, H.-Y., Cheng, J.-W., y Miao, L.-H. (2014). Community composition & cellulase activity of cellulolytic bacteria from forest soils planted with broad-leaved deciduous & evergreen trees. *Applied Microbiology & Biotechnology*, *98*(3), 1449-1458. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5130-4>
- Yang, R., Lei, S., Xu, X., Jin, H., Sun, H., Zhao, X., Pang, B., y Shi, J. (2020). Key elements & regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, *104*(19), 8077-8087. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10801-x>
- Yang, Z., y Zhang, Z. (2019). Recent advances on production of 2, 3-butanediol using engineered microbes. *Biotechnology Advances*, *37*(4), 569-578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.019>
- Yuan, S., Gopal, J. V., Ren, S., Chen, L., Liu, L., y Gao, Z. (2020). Anticancer fungal natural products: mechanisms of action & biosynthesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *202*, 112502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112502>
- Yue, Z., y Economy, J. (2017). Carbonization & activation for production of activated carbon fibers. En J. Y. B. T.-A. C. F. & T. Chen (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Textiles* (pp. 61-139). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100660-3.00004-3>



- Zamil, M. S., y Geitmann, A. (2017). The middle lamella - more than a glue. *Physical Biology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa5ba5>
- Zarza, E., Alcaraz, L. D., Aguilar-Salinas, B., Islas, A., y Olmedo-Álvarez, G. (2018). Complete genome sequences of two *Bacillus pumilus* strains from Cuatrociénegas, Coahuila, Mexico. *Genome Announcements*, *6*(17). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00364-18>
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., y Rotsztein, H. (2018). Antioxidant properties of ferulic acid & its possible application. *Skin Pharmacology & Physiology*, *31*(6), 332-336. <https://doi.org/10.1159/000491755>
- Zeng, S., Ling, J., Ahmad, M., Lin, L., Zhang, Y., Wang, C., y Dong, J. (2019). Culturable fungal diversity & cellulase production by mixed culture *Aspergillus* fungi from Sanya mangrove. *The Journal of General & Applied Microbiology*, *64*(6), 293-298. <https://doi.org/10.2323/jgam.2018.02.004>
- Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., y Chen, X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes & their biological activities against plant diseases. *The Journal of Antibiotics*, *73*(5), 265-282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
- Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X., y Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology & Biochemistry*, *100*, 64-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.017>
- Zhang, H., White-Phillip, J. A., Melançon, C. E., Kwon, H., Yu, W., y Liu, H. (2007). Elucidation

- of the kijanimicin gene cluster: insights into the biosynthesis of spirotetrone antibiotics & nitrosugars. *Journal of the American Chemical Society*, 129(47), 14670-14683. <https://doi.org/10.1021/ja0744854>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., y Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W95-W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zhang, S., Wang, X., Yang, J., Lu, S., Lai, X.-H., Jin, D., Huang, Y., Zhu, W., Li, J., Pu, J., Huang, Y., Tian, Z., Dong, K., Zhang, G., Lei, W., Wang, S., y Xu, J. (2020). *Nocardioides dongxiaopingii* sp. nov., isolated from leaves of *Lamiophlomis rotata* on the Qinghai-Tibet Plateau. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3234-3240. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004161>
- Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Hirayama, K., Tanaka, K., Pointing, S. B., Spatafora, J. W., y Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological & evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology*, 64, 85-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.04>
- Zhang, Z., Yin, L., Li, X., Zhang, C., Zou, H., Liu, C., y Wu, Z. (2019). Analyses of the complete genome sequence of the strain *Bacillus pumilus* ZB201701 isolated from rhizosphere soil of maize under drought & salt stress. *Microbes & Environments*, 34(3), 310-315. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18096>
- Zhao, C., Cui, B.-K., y Dai, Y.-C. (2014). Morphological & molecular identification of two new species of *Hyphodontia* (Schizoporaceae, Hymenochaetales) from Southern China. *Cryptogamie, Mycologie*, 35, 87-97. <https://doi.org/10.7872/crym.v35.iss1.2014.87>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., y Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 101(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., y Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200-206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>
- Zhou, K., Zhang, X., Zhang, F., y Li, Z. (2011). Phylogenetically diverse cultivable fungal community & Polyketide Synthase (PKS), Non-ribosomal Peptide Synthase (NRPS) genes associated with the South China sea sponges. *Microbial Ecology*, 62(3), 644-654. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9859-y>
- Zidour, M., Belguesmia, Y., Cudennec, B., Grard, T., Flahaut, C., Souissi, S., y Drider, D. (2019). Genome sequencing & analysis of *Bacillus pumilus* ICVB403 isolated from *Acartia tonsa* copepod eggs revealed surfactin & bacteriocin production: insights on anti-*Staphylococcus* activity. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 11(3), 990-998. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9461-4>

## *Otras*

---

Іваниця, В. О., Штеніков, М. Д., Остапчук, А. М., Васильєва, Н. Ю., y Калиновський, Й.

(2020). Sequencing of the genome *Bacillus pumilus* ONU 554 isolated from deep water sediments of black sea. *Microbiology & Biotechnology*, 3(50), 46-57. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3\(50\).219362](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2020.3(50).219362)



# 7. Anexos



1. *L. Mironauta curilochus*. 2. *Mironauta peloides*. 3. *Faclyptara arcas*  
aus. Surinam. aus. Ost-Indien. aus. Brasilien.

Pag 47. Por: Hermann Friedrich Rudolf Heinrich Gadamer (1848). En: *Insecta Svecica et exotica*. Librería de la Universidad de Alberta.



## 7.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO

## 7.1.1. Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Muestras de madera en degradación analizadas.

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
TRD01		Pi1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1	X		
TRD02		Pi1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	2-3	X		
TRD03		Pi2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1-2	X		
TRD04		S4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD05		S3	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD06		S3	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	1-2	X		
TRD07		S1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	0-1	X		

Aislamiento y caracterización de microorganismos de madera en degradación

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
TRD08		S4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD08		S4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD10		S2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	1-2	X		
TRD11		S2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4			
TRD12		B	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Betulaceae, <i>Betula</i>	3-4	X		
TRD13		Pi3	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Junio-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	3	X		
TRD14		Pi1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1	X		
TRD20		Ap	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Salicaceae, <i>Populus</i>	3	X		
TRD23		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	3	X		

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
TRD24		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	4	X		
TRD25		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	2-3	X		
TRD26		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	4	X		
TRD27		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1-2	X		
TRD28		Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Agosto-2017	Pinaceae, <i>Pinus</i>	3	X		
TRD29		S5	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	2	X		
TRD30		S5	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD31		S5	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	3-4	X		
TRD32		S6	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD33		S6	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		

Aislamiento y caracterización de microorganismos de madera en degradación

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
TRD34		S6	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	3	X		
TRD35		S7	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	2	X		
TRD36		S7	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	2-3	X		
TRD37		S7	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	4	X		
TRD38		S8	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	2-3	X		
TRD39		S8	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	2	X		
TRD40		S8	Estenstadmarka, Trondheim, Noruega	63°23'15"N 10°28'53", 310 MASL	Octubre-2017	Pinaceae, <i>Picea</i>	3-4	X		
TRD41	Prow41	Pi1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Pinus</i>	2		X	6 (0,8)
TRD42	Prow42	Pi1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1		X	8 (1,1)

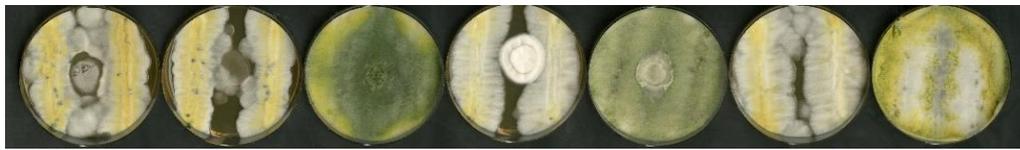
Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
TRD43	Prow43	Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Pinus</i>	2		X	4 (0,6)
TRD44	Prow44	Pi4	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Pinus</i>	2		X	19 (2,6)
TRD45	Prow45	S2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Picea</i>	2		X	26 (3,6)
TRD46	Prow46	S2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Picea</i>	1		X	20 (2,8)
TRD47	Prow47	Ap	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Salicaceae, <i>Populus</i>	4		X	20 (2,8)
TRD48	Prow48	B1	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Betulaceae, <i>Betula</i>	3		X	28 (3,9)
TRD49	Prow49	S9	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Picea</i>	2-3		X	8 (1,1)
TRD50	Prow50	S9	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Picea</i>	2-3		X	11 (1,5)
TRD51	Prow51	Pi2	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Pinus</i>	1		X	9 (1,3)
TRD52	Prow52	S10	Bymarka, Trondheim, Noruega	63°24'24"N 10°18'46", 290 MASL	Enero-2018	Pinaceae, <i>Picea</i>	3		X	22 (3,1)

Aislamiento y caracterización de microorganismos de madera en degradación

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
LENV04		Pe	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Rosaceae, <i>Pyrus</i>	4	X		
LENC07	C07	Cn1	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Fagaceae, <i>Castanea</i>	2-3	X	X	57 (7,9)
LEN01	V01	OI	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Oleaceae, <i>Olea</i>	1	X	X	24 (3,3)
LEN02	V02	Oa	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Fagaceae, <i>Quercus</i>	2	X	X	36 (5,0)
LEN03	V03	Wi	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Saliaceae, <i>Salix</i>	1-2	X	X	55 (7,6)
LEN04	V04	Pe	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Rosaceae, <i>Pyrus</i>	1	X	X	29 (4,0)
LEN05	V05	Ah	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Oleaceae, <i>Fraxinus</i>	2	X	X	15 (2,1)
LEN08	V08	Wa	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Juglandaceae, <i>Juglans</i>	3	X	X	109 (15,1)
LEN12	V12	M	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Moraceae, <i>Morus</i>	1	X	X	40 (5,6)

Cod. Metagenómica	Cod. Aislamientos	Árbol	Ciudad, Región, País	Coordenadas GPS	Mes de recogida	Familia, genero	NFI	Metagen.	Aislam.	Nº microorganismos aislados (%)
LEN13	V13	Cn2	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Fagaceae, <i>Castanea</i>	2-3	X	X	12 (1,7)
LEN17	V17	Cn3	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Fagaceae, <i>Castanea</i>	1	X	X	14 (1,9)
LEN23	V23	Cn4	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Fagaceae, <i>Castanea</i>	1	X	X	43 (6,0)
LEN36	V36	F	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Moraceae, <i>Ficus</i>	1-2	X	X	35 (4,9)
LEN42	V42	Cr1	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Rosaceae, <i>Prunus</i>	1-1	X	X	39 (5,4)
LEN56	V56	Cr2	Villavieja, Leon, España	42.485015, -6.684764, 765 MASL	Junio-2017	Rosaceae, <i>Prunus</i>	3-4	X	X	31 (4,3)

7.1.2. Figuras suplementarias



P48C14, *Trichoderma harzianum*



C7C15, *Trichoderma citrinoviride*



P44C12, *Trichoderma koningii*



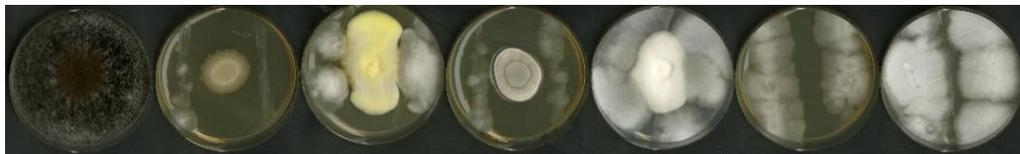
V23C22, *Trichoderma lixii*



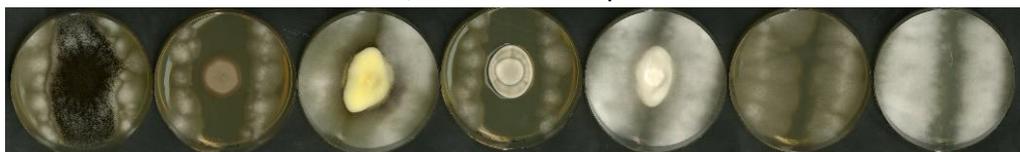
V5C7, *Trichoderma gamsii*



P42S2, *Trichoderma* sp.



V23C29, *Trichoderma* sp.

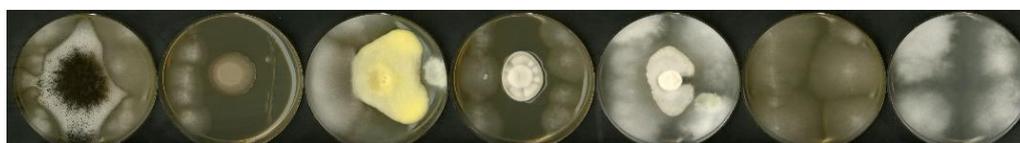


V5S9, *Trichoderma* sp.

Figura suplementaria S1. Bioensayos con hongos frente a hongos degradadores de madera.



V5S9,2, *Trichoderma* sp.



V56i1, *Trichoderma atroviride*



V42C66, *Penicillium aenum*



V42C63, *Penicillium charlesii*



V8C126, *Penicillium toxicarium*



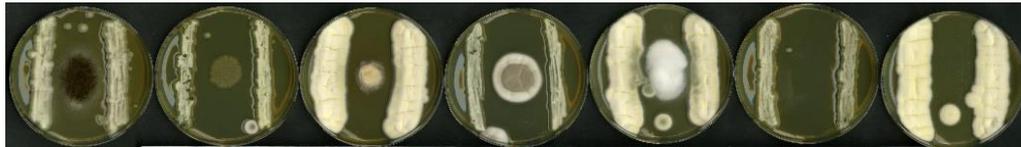
V8C64, *Penicillium expansum*



V8C31, *Penicillium decaturense*



V8C26, *Penicillium corylophilum*



E2C22, *Penicillium citrosulfuratum*



V12S13, *Penicillium brevicompactum*



V8i77, *Penicillium murcianum*



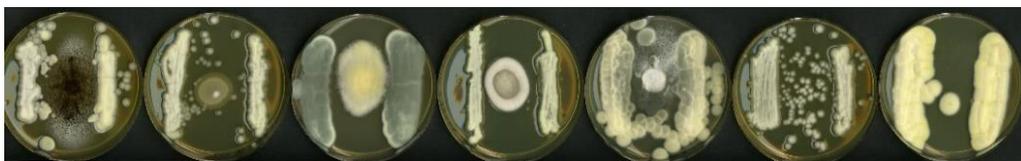
V4S2, *Penicillium* sp.



V8C15, *Penicillium roseopurpureum*



V8C14, *Penicillium steckii*



V4C34, *Penicillium aenum*



V42C65, *Penicillium crustosum*

---

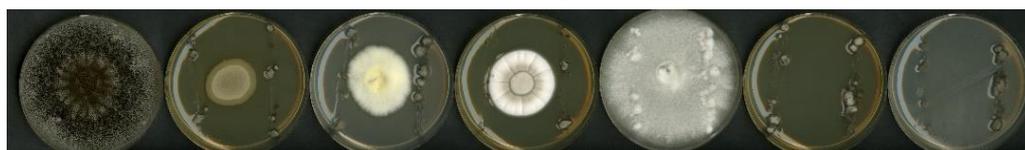
Figura suplementaria S1. Cont.



P51S8, *Penicillium* sp.



V42C41, *Penicillium fellutanum*



V8C35, *Penicillium herbarum*



V8C83, *Penicillium sanguifluum*



V7C19, *Penicillium glabrum*



V12C14, *Penicillium citreosulfuratum*



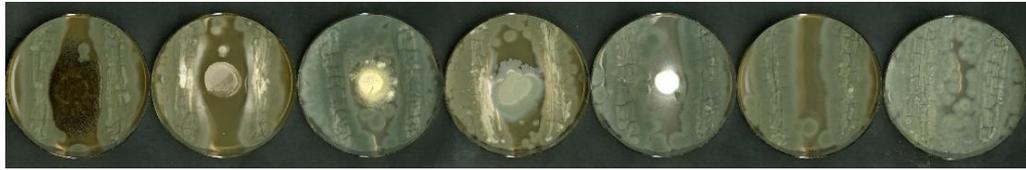
V8C89, *Penicillium ubiqueum*



P51S8, *Penicillium* sp.



V8C107, *Penicillium pancosmium*



V42C33, *Penicillium* sp.



V12C13, *Penicillium* sp.



V8C33, *Penicillium citrinum*



V4C17, *Penicillium spinulosum*



E2S10, *Penicillium* sp.



E2C16, *Penicillium melinii*

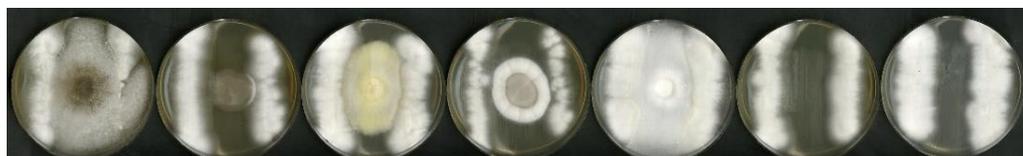


V8C36, *Alternaria atra*

Figura suplementaria S1. Cont.



V8C91, *Cladosporium cladosporoides*



V42C62, *Clonostachys rosea*



V8C16, *Candida* sp.



V8C102, *Coniochaeta mutabilis*



V8C77, *Coniochaeta prunicola*



V8C19, *Filobasidium magnum*



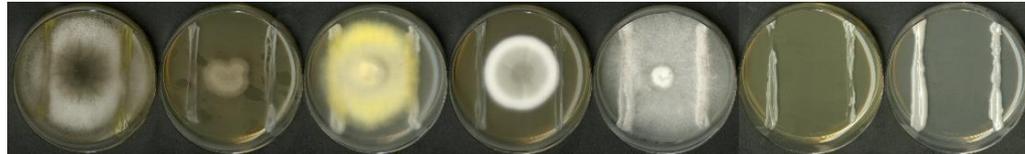
V8C80, *Lecytophora mutabilis*



V4i51, *Neobulgaria pura*



V4i27, *Tremella* sp.



V4i38, *Rhodotorula philyla*



V8C11, *Scheffersomyces stipitis*



C7C25, *Coniochaeta hoffmannii*



C7C24, *Tromeropsis microtheca*



V1i9, *Trichosporon moniliiforme*



V3S24, *Debaryomyces udanii*



V12i13, *Tremella moriformis*

---

Figura suplementaria S1. Cont.

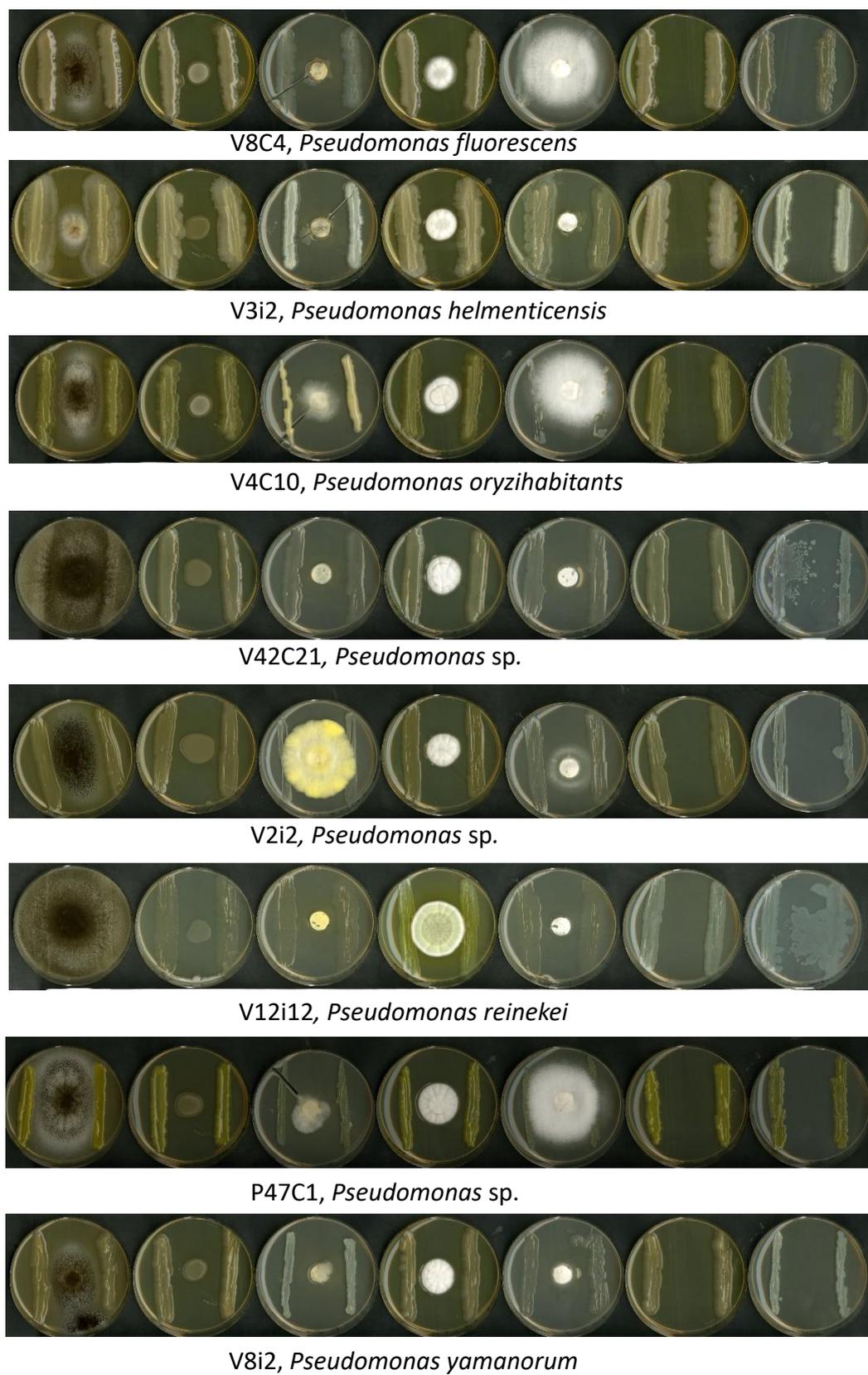
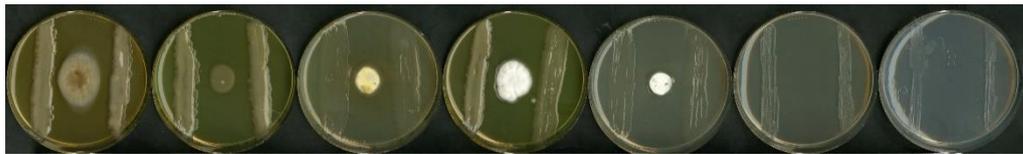


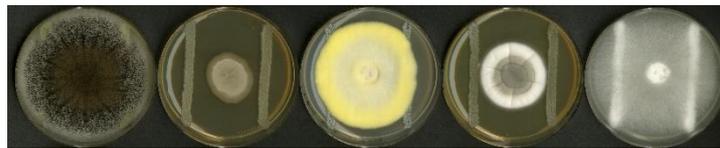
Figura suplementaria S2. Bioensayos con bacterias frente a hongos degradadores de madera.



V49S4, *Pseudomonas* sp.



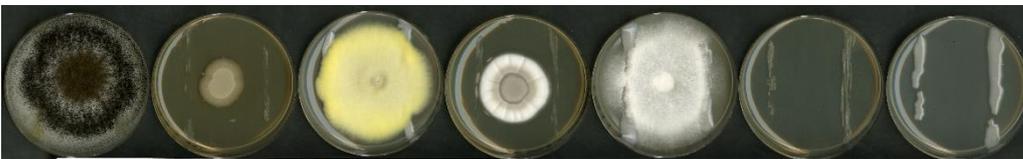
P41S1, *Pseudomonas trivialis*



V8i6, *Burkholderia bryophila*



P50S1, *Burkholderia sordidicola*



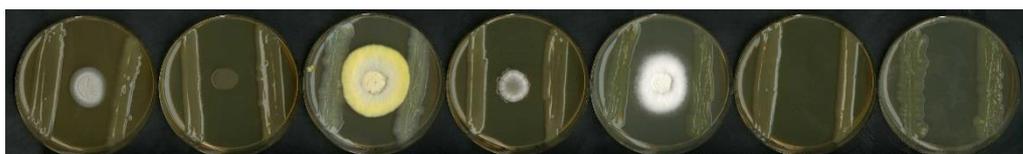
P50S3, *Burkholderia sordidicola*



P45C10, *Pedobacter* sp.



V5C1, *Stenotrophomonas maltophilia*



V56C13, *Stenotrophomonas rizophila*

---

Figura suplementaria S2. Cont.

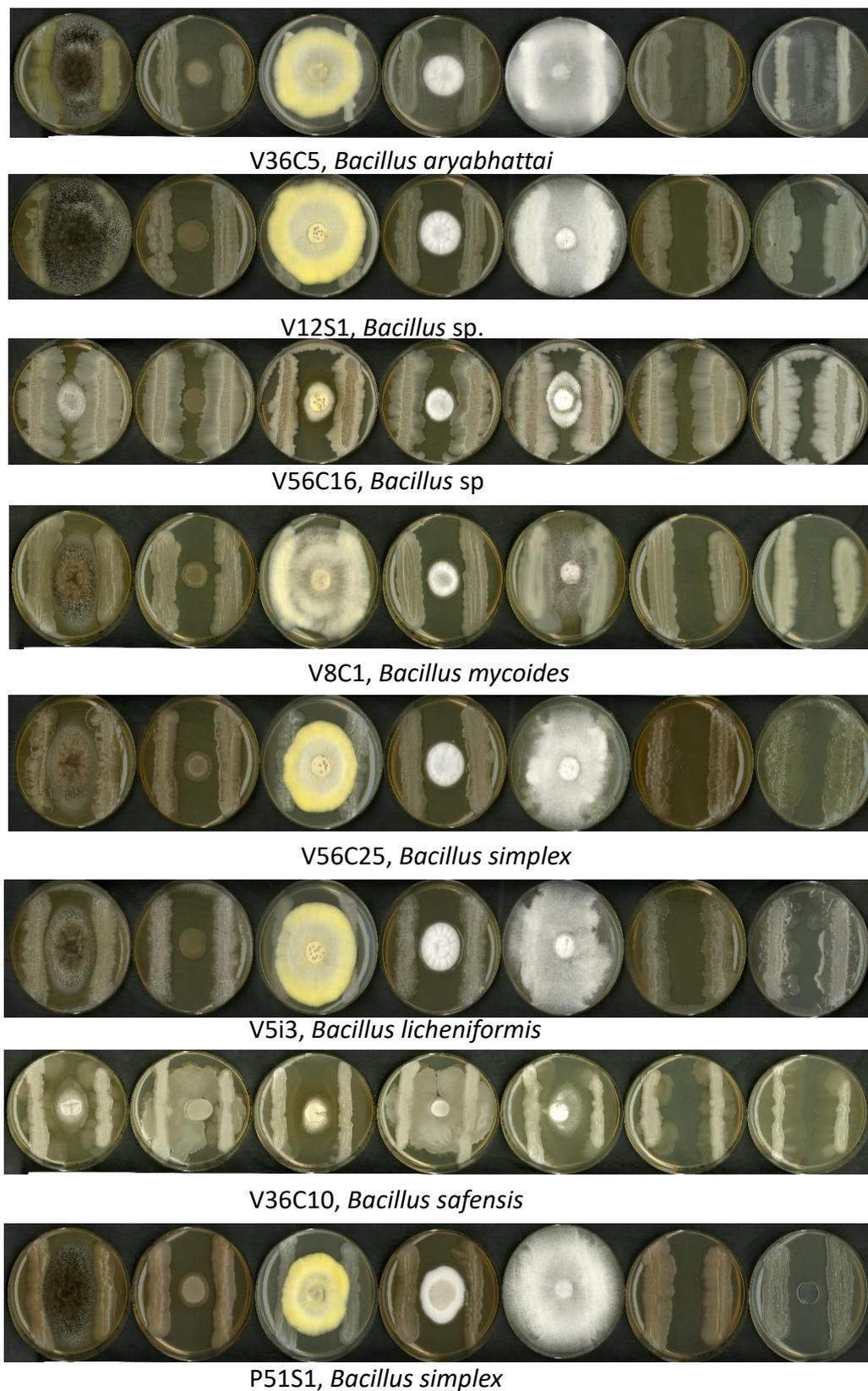
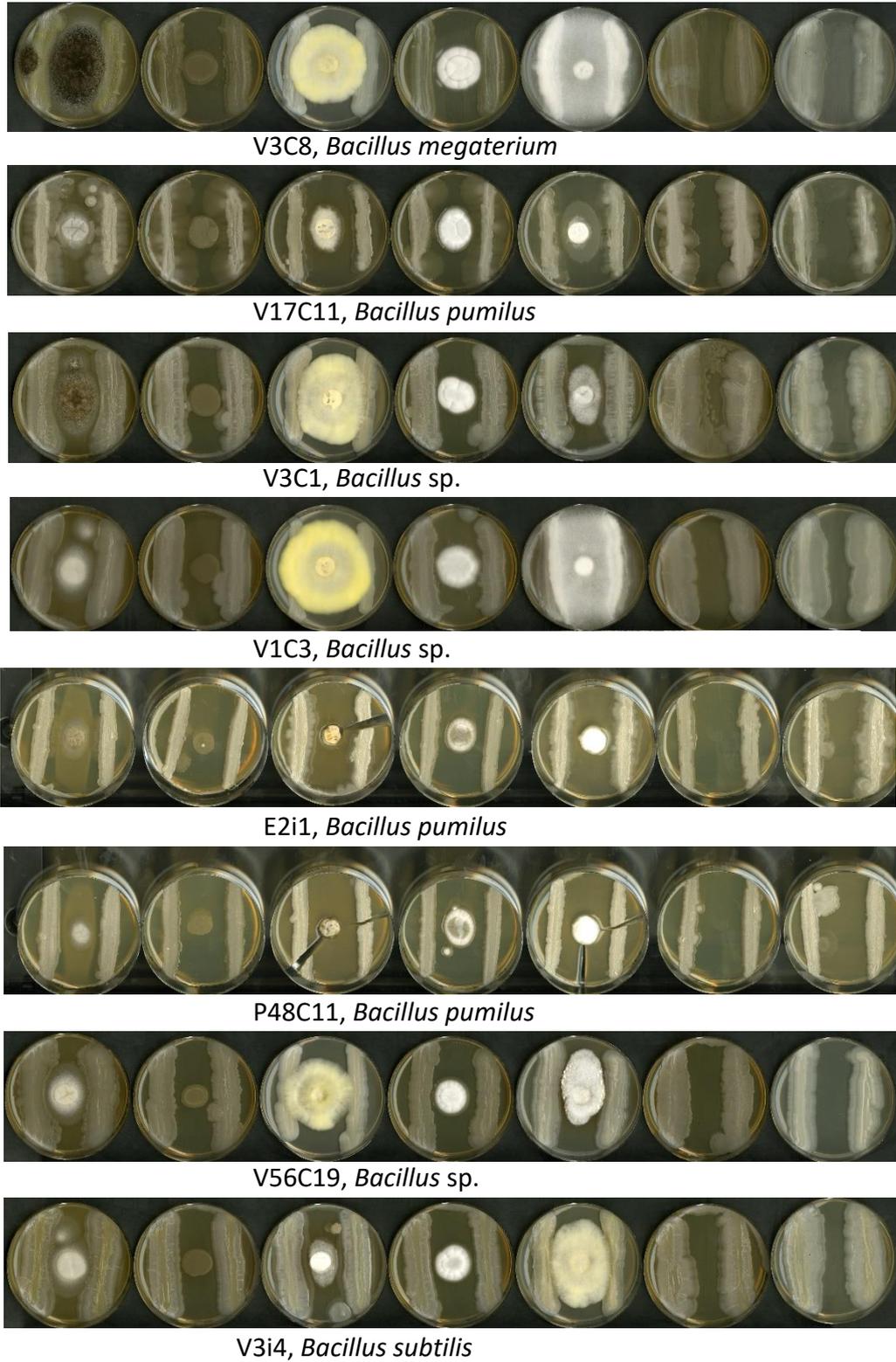


Figura suplementaria S2. Cont.



---

Figura suplementaria S2. Cont.



V42i11, *Agromyces terreus*



V12C2, *Arthrobacter* sp.



V3C11, *Microbacterium* sp.



V4C4, *Microbacterium oxydans*



V2C5, *Arthrobacter rhombi*



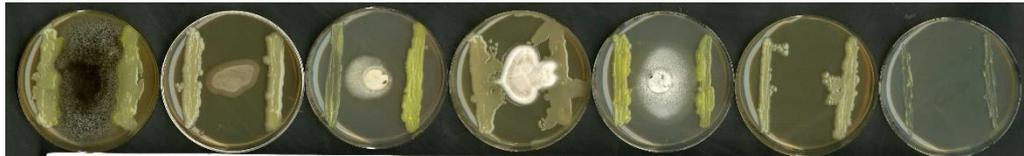
C7C3, *Microbacterium* sp.



V12C7, *Arthrobacter citrius*



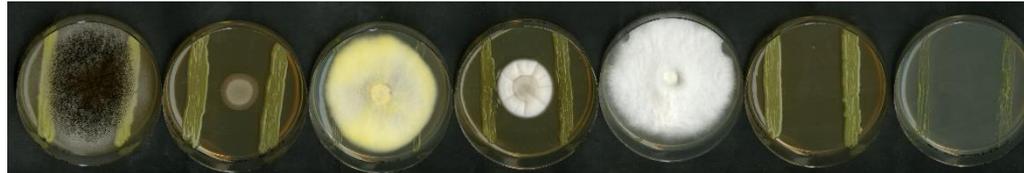
V4C3, *Microbacterium phyllosphaerae*



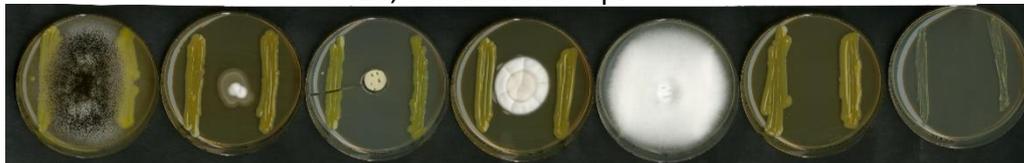
V58, *Arthrobacter gandavensis*



V8C6, *Arthobacter* sp.



C7C14, *Cellulomonas* sp.



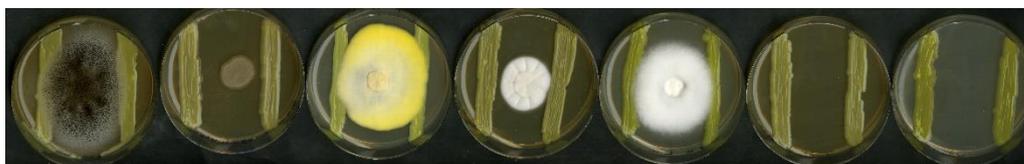
V42C25, *Curtobacterium flacumfaciens*



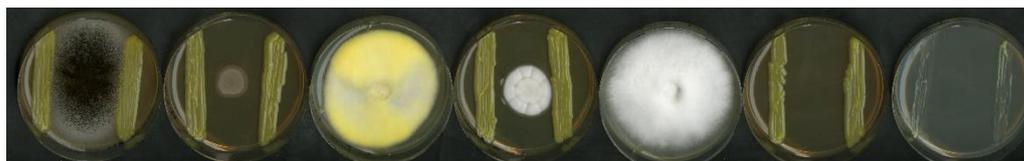
V42C22, *Janibacter melonis*



C7C10, *Leifsonia poae*



V36S5, *Leucobacter alluvii*



V12C5, *Microbacterium* sp.

---

Figura suplementaria S2. Cont.



V12C15, *Microbacterium* sp.



P41C4, *Mycobacterium salmoniphium*



C714, *Rhodococcus opacus*



C7C6, *Rhodococcus fascians*



V5C2 *Streptomyces* sp.



V5i1 *Streptomyces kanamyceticus*



V5i2 *Streptomyces* sp.



V5S6 *Streptomyces lavendulae*



V5S7 *Streptomyces* sp.



V42C53 *Streptomyces lividans*



V56S7 *Streptomyces niveus*



V17C6 *Streptomyces* sp.



C7i7 *Streptomyces* sp.



V56S1 *Streptomyces fimicarius*



V36C4 *Streptomyces flavogriseus*



V3i17 *Streptomyces drozdowiczii*



V42C49 *Streptomyces hygroscopicus*



V56C17 *Streptomyces* sp.



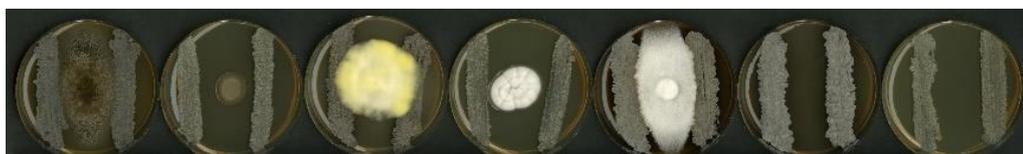
V42C52 *Streptomyces fractus*



C7C8 *Streptomyces* sp.



V2S3 *Streptomyces* sp.



C7S7 *Streptomyces laculatispora*



V8I7, *Rhodococcus erythropolis*



V8C9, *Arthrobacter agilis*



*Bacillus muralis* V8C2

Figura suplementaria S2. Cont.

## 7.2 PUBLICACIONES

## 7.2.1. Artículos

Velasco-Rodríguez, Ó., Fil, M., Heggset, T. M. B., Degnes, K. F., Becerro-Recio, D., Kolsaková, K., Haugen, T., Jønsson, M., Toral-Martínez, M., García-Estrada, C., Sola-Landa, A., Josefsen, K. D., Sletta, H., y Barreiro, C. (2022). Characterization of microbial diversity in decayed wood from a Spanish Forest: an environmental source of industrially relevant microorganisms. *Microorganisms*, 10(6), 1249. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061249>


microorganisms


---

Article

## Characterization of Microbial Diversity in Decayed Wood from a Spanish Forest: An Environmental Source of Industrially Relevant Microorganisms

Óscar Velasco-Rodríguez <sup>1,†</sup>, Mariana Fil <sup>1,†</sup>, Tonje M. B. Heggset <sup>2</sup>, Kristin F. Degnes <sup>2</sup>, David Becerro-Recio <sup>1</sup>, Katarina Kolsaková <sup>1</sup>, Tone Haugen <sup>2</sup>, Malene Jonsson <sup>2</sup>, Macarena Toral-Martínez <sup>1</sup>, Carlos García-Estrada <sup>1,3</sup>, Alberto Sola-Landa <sup>1</sup>, Kjell D. Josefsen <sup>2</sup>, Håvard Sletta <sup>2</sup> and Carlos Barreiro <sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> INBIOTEC (Instituto de Biotecnología de León), Avda Real 1, 24006 León, Spain; ovelr@unileon.es (Ó.V.-R.); mariana.fil@inbiotec.com (M.F.); davidbecerro92@gmail.com (D.B.-R.); katarina.kolsakova@inbiotec.com (K.K.); mtoralm00@gmail.com (M.T.-M.); c.gestrada@unileon.es (C.G.-E.); alberto.sola@inbiotec.com (A.S.-L.)

<sup>2</sup> SINTEF Industry, Department of Biotechnology and Nanomedicine, P.O. Box 4760 Torgarden, N-7465 Trondheim, Norway; tonje.heggset@sintef.no (T.M.B.H.); kristin.f.degnes@sintef.no (K.F.D.); tone.haugen@sintef.no (T.H.); malene.ljonsson@gmail.com (M.J.); kjell.d.josefsen@sintef.no (K.D.J.); havard.sletta@sintef.no (H.S.)

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24007 León, Spain

<sup>4</sup> Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Molecular, Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071 León, Spain

\* Correspondence: c.barreiro@unileon.es

† These authors contributed equally to this study and are co-first authors.

**Abstract:** Rotting wood is inhabited by a large diversity of bacteria, fungi, and insects with complex environmental relationships. The aim of this work was to study the composition of the microbiota (bacteria and fungi) in decaying wood from a northwest Spanish forest as a source of industrially relevant microorganisms. The analyzed forest is situated in a well-defined biogeographic area combining Mediterranean and temperate macroclimates. Bacterial diversity, determined by metagenome analyses, was higher than fungal heterogeneity. However, a total of 194 different cultivable bacterial isolates (mainly *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae*, *Paenibacillaceae*, and *Microbacteriaceae*) were obtained, in contrast to 343 fungal strains (mainly *Aspergillaceae*, *Hypocraeaceae*, and *Coniochaetaceae*). Isolates traditionally known as secondary metabolite producers, such as Actinobacteria and members of the *Penicillium* genus, were screened for their antimicrobial activity by the detection of antibiotic biosynthetic clusters and competitive bioassays against fungi involved in wood decay. In addition, the ability of *Penicillium* isolates to degrade cellulose and release ferulic acid from wood was also examined. These results present decaying wood as an ecologically rich niche and a promising source of biotechnologically interesting microorganisms.

**Keywords:** fungi; bacteria; wood decay; rotten wood; secondary metabolites; antibiotic; polyketide synthase (PKS); non-ribosomal peptide synthetase (NRPS); cellulase; esterase; ferulic acid; enzyme

 **check for updates**

**Citation:** Velasco-Rodríguez, Ó.; Fil, M.; Heggset, T.M.B.; Degnes, K.F.; Becerro-Recio, D.; Kolsaková, K.; Haugen, T.; Jonsson, M.; Toral-Martínez, M.; García-Estrada, C.; et al. Characterization of Microbial Diversity in Decayed Wood from a Spanish Forest: An Environmental Source of Industrially Relevant Microorganisms. *Microorganisms* 2022, 10, 1249. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061249>

Academic Editor: Edward A. Bayer and Matthias Noll

Received: 25 February 2022  
Accepted: 16 June 2022  
Published: 18 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**7.2.2. Capítulos**

Velasco-Rodríguez, O., Fil, M., García-Calvo, L., Kosalková, K., y Barreiro, C. (2021). Microbial isolation & characterization of new antibiotic-producing strains from decayed wood. En C. Barreiro & J.-L. Barredo (Eds.), *Antimicrobial Therapies-Methods & Protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1358-0>

**Chapter 3****Microbial Isolation and Characterization of New Antibiotic-Producing Strains from Decayed Wood**

**Óscar Velasco-Rodríguez, Mariana Fil, Laura García-Calvo, Katarina Kosalková, and Carlos Barreiro**

**Abstract**

Microbial drug resistance is increasing over the last years, becoming one of the most important health concerns in the twenty-first century. It encourages the discovery of new antibiotics. Thus, novel antibiotics discovered by exploring different environments that previously have been left out of the scientific focus is a realistic opportunity. One of these habitats can be forest deadwood, which is a specific niche inside of the forest that provides shelter and nutrition to a great variety of organisms, such as fungi, bacteria, or saproxylic insects. Different studies have found the existence of complex antagonisms and symbiotic interactions among them, which points at decayed wood as a competitive environment. Besides, it is an interesting niche to look for new antibiotic producer microorganisms and active chemicals. This chapter describes isolation and screening methods of novel producers of antimicrobial compounds from decayed wood.

Fil, M., Velasco-Rodríguez, O., García-Calvo, L., Sola-Landa, A., y Barreiro, C. (2021). Screening of antibiotic gene clusters in microorganisms isolated from wood. En C. Barreiro & J.-L. Barredo (Eds.), *Antimicrobial Therapies-Methods & Protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1358-0>



## Chapter 8

### Screening of Antibiotic Gene Clusters in Microorganisms Isolated from Wood

Mariana Fil, Óscar Velasco-Rodríguez, Laura García-Calvo, Alberto Sola-Landa, and Carlos Barreiro

#### Abstract

The biosphere of Earth is made up of a variety of ecosystems governed by complex biological interactions, some of them mediated by microbial bioactive secondary metabolites. These metabolites such as antibiotics (e.g., polyketides and nonribosomal peptides) have been receiving increasing attention, due to their multiple pharmaceutical uses. Besides, antibiotic resistance is on the rise, and it is currently regarded as one of the greatest threats to global human health. The screening of novel antimicrobial polyketides and nonribosomal peptides in poorly studied ecosystems is an interesting alternative to address the problem of antibiotic resistance. This chapter updates a molecular method to identify antibiotics gene clusters and their subsequent production and activity validation. On the one hand, a PCR method based on degenerated primers for nonribosomal peptide synthases (NRPS) and the polyketide synthases (PKS) genes is used as an initial fast screening. On the other hand, a bioassay-based method is the protocol selected for the production confirmation and antibacterial effect estimation. These methods are applied to screen Actinobacteria and *Penicillium* species as main antibiotic producers isolated from wood.