



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA INTERACCIÓN DUAL ENTRE MICROMICETOS SAPROBIOS †

[ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OBTAINED FROM THE DUAL INTERACTION BETWEEN SAPROPHYTIC MICROMYCETES]

Irma L. Medina-Baizabal¹, Gabriela Heredia² and Marcela Gamboa-Angulo^{1*}

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México, *Email:*

baizabal@cicy.mx; mmarcela@cicy.mx

²Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A.C., Km 2.5 carretera antigua Xalapa-Coatepec, C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México, *Email:*

gabriela.heredia@inecol.mx

*Corresponding autor

SUMMARY

Background: Saprophytic micromycetes are recognized for their extraordinary ability to biosynthesize various metabolites with biological properties that can be modified when interacting with other organisms. **Objective:** To evaluate the antibacterial and antifungal activity of extracts obtained from dual interactions of *Acremonium massei* CICY029 (*Am*), *Beltraniella portoricensis* MR42 (*Bp*), *Cylindrium elongatum* MR45 (*Ce*) y *Stachybotrys* sp. MR33 (*Ssp*) and to obtain the chemical profile of the most active interaction. **Methodology:** The ethyl acetate extracts of the four strains and their six dual interactions were evaluated against ten pathogens by the microdilution method to determine their antifungal and antibacterial capacity. The most active extracts were partitioned, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of their fractions were determined. The chemical profile of the most active interaction was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Results:** The highest mycelial growth inhibitory activity (MCI = 100%) was obtained from the fungal extracts of the single culture of *Stachybotrys* sp., and the dual *Ce-Ssp* interaction against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* at the concentration of 2000 µg/mL, as well as against *Candida albicans* and *Xanthomonas campestris* at 400 µg/mL. The acetonitrile fraction of *Stachybotrys* sp. showed high effectiveness against *Alternaria tagetica*, *C. gloeosporioides*, *M. fijiensis* and *X. campestris* (MIC ≤ 250 -1000 µg/mL). A mixture of fatty acids and three unidentified components not observed in the single cultures were detected by GC-MS in the *Ce-Ssp* extract. **Implications:** Biological interactions between two saprophytic fungi are a viable alternative for inducing the production of new metabolites with the potential to control pathogenic bacteria and fungi. **Conclusions:** The antifungal and antibacterial potential of saprophytic micromycetes can be improved in their dual interaction, particularly between *C. elongatum* MR45 and *Stachybotrys* sp. MR33, is a promising option for further investigation as potential natural antimicrobials.

Key words: *Acremonium massei*; *Beltraniella portoricensis*; *Cylindrium elongatum*; fungal extracts; Phytopathogenic fungi; *Stachybotrys*.

RESUMEN

Antecedentes: Los micromicetos saprobios son reconocidos por su alta capacidad para biosintetizar diversos metabolitos con propiedades biológicas las cuales pueden modificarse cuando interaccionan con otros organismos. **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos de las interacciones duales entre *Acremonium massei* CICY029 (*Am*), *Beltraniella portoricensis* MR42 (*Bp*), *Cylindrium elongatum* MR45 (*Ce*) y *Stachybotrys* sp. MR33 (*Ssp*) y obtener el perfil químico de la interacción más activa. **Metodología:** Los extractos de acetato de etilo de las cuatro cepas y sus seis interacciones duales se evaluaron contra diez patógenos por el método de microdilución para determinar su capacidad antifúngica y antibacteriana. Los extractos más activos se particionaron y a las fracciones obtenidas se les determinó su concentración mínima inhibitoria (MIC). El perfil químico de la interacción más activa se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. **Resultados:** Los extractos fúngicos del cultivo individual de *Stachybotrys* sp. y la interacción dual *Ce-Ssp* mostraron la mayor actividad inhibitoria del crecimiento micelial (ICM = 100%) contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 2000 µg/mL, así como contra *Candida albicans* y *Xanthomonas campestris* a 400 µg/mL. La

† Submitted January 14, 2022 – Accepted March 21, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4199>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID. I.L. Medina-Baizabal: 0000-0002-5313-2053; G. Heredia: 0000-0001-7047-412X; M. Gamboa-Angulo: 0000-0002-0618-0335

fracción de acetonitrilo de *Stachybotrys* sp. mostró alta efectividad contra *Alternaria tagetica*, *C. gloeosporioides*, *M. fijiensis* y *X. campestris* (MIC \leq 250 -1000 $\mu\text{g/mL}$). Una mezcla de ácidos grasos y tres componentes no identificados se detectaron por CG-EM en el extracto de *Ce-Ssp* los cuales no se observaron en los cultivos individuales.

Implicaciones: Las interacciones biológicas entre dos hongos saprófitos son una alternativa viable para la inducir la producción de nuevos metabolitos con potencial para controlar hongos y bacterias patógenas. **Conclusiones:** El potencial antifúngico y antibacteriano de micromicetos saprobios puede incrementarse en su interacción dual, en particular entre *C. elongatum* MR45 y *Stachybotrys* sp. MR33, siendo una opción promisoría para continuar investigando la obtención de posibles antimicrobianos naturales.

Palabras clave: *Acremonium maseei*; *Beltraniella portoricensis*; *Cylindrium elongatum*; extractos fúngicos; hongos fitopatógenos; *Stachybotrys*

INTRODUCCIÓN

Los hongos microscópicos, también denominados micromicetos, continúan siendo una fuente prometedora de nuevos metabolitos secundarios con alto potencial de aplicación en farmacia y agricultura (Genilloud, 2014). En la constante búsqueda de metabolitos secundarios novedosos para el control de enfermedades ocasionadas por patógenos microbianos, nuevas estrategias están siendo utilizadas, como son los co-cultivos también denominadas interacciones duales (Arora *et al.*, 2020; Bertrand *et al.*, 2014; Damasceno *et al.*, 2021). En la naturaleza, las interacciones se establecen entre dos o más organismos vivos que compiten por la necesidad de obtener alimento y espacio para desarrollarse y sobrevivir (Boege y del Val 2011). Entre los hongos se reconocen dos tipos de competencia, por explotación y por interferencia. El primero involucra el agotamiento del sustrato por un organismo, evitando que otro individuo o población acceda a dicho sustrato. Los hongos adaptados a este tipo de competencia tienen una rápida germinación seguida de una colonización, además de una alta capacidad para digerir nutrientes y amplia tolerancia a factores ambientales (Moore & Landecker 1996). En la competencia por interferencia, el efecto de la interacción se da directamente en las actividades de los organismos, ya sea por parasitismo, depredación o la secreción de metabolitos que pueden ser tóxicos (Fernández-Larrea 2001). Los cultivos por pares de organismos permiten simular *in vitro* interacciones entre microorganismos que pueden darse en el entorno natural. Las investigaciones sobre las interacciones duales han ido en aumento en la última década, para la producción de nuevos metabolitos secundarios con diversas aplicaciones en farmacia y la industria alimentaria (Triastuti *et al.* 2021; Xu *et al.*, 2021). Esta estrategia posee un alto potencial para la activación y producción de metabolitos antimicrobianos, utilizando los extractos de hongos filamentosos, capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos. Por ejemplo, el co-cultivo antagonista de *Bionectria ochroleuca* con *Trichophyton rubrum* induce a la biosíntesis del metabolito 4"-hidroxisulfoxi-2,2"-dimetiltilavina (Bertrand *et al.*, 2013a), también entre *Fusarium solani* FKI-6853 y *Talaromyces* sp. FKA-65 se produce coculnol un

nuevo metabolito derivado del ácido penicilínico, con actividad antiviral (Nonaka *et al.*, 2015).

En investigaciones previas en la búsqueda de alternativas naturales en el control de organismos fito y zoopatógenos, se aislaron micromicetos de suelos tropicales y sub-tropicales, los cuales se evaluaron en ensayos antimicrobianos, insecticidas y/o nematocidas (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008; 2011; Ruiz-Jiménez *et al.*, 2017). Entre estos micromicetos, *Beltraniella portoricensis* MR42, *Cylindrium elongatum* MR45 y *Stachybotrys* sp. MR33 (antes *Memmoniella*) destacaron por su actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris*, la levadura *Candida albicans* y/o los hongos fitopatógenos *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pythium aphanidermatum* (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008; 2011); así como *Acremonium maseei* CICY029 el cual demostró alta actividad insecticida contra *Myzus persicae* (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2017). En estos estudios, los micromicetos individuales se cultivaron en los medios líquidos de caldo de papa dextrosa, Czapek-dox-extracto de levadura (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008) y en medio sólido de arroz fermentado (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

En el presente trabajo los micromicetos *A. maseei* CICY029, *B. portoricensis* MR42, *C. elongatum* MR45 y *Stachybotrys* sp. MR33 se cultivaron individualmente y por pares, en arroz fermentado, obteniéndose seis interacciones duales. Los extractos de los cultivos individuales y sus interacciones se evaluaron contra una serie de fito y zoopatógenos que incluyeron a *Alternaria chrysanthemi*, *A. tagetica*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella fijiensis*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *Erwinia carotovora*, *S. aureus* y *X. campestris*. Además, el perfil químico de los extractos obtenidos de la interacción dual con mayor actividad antimicrobiana y los respectivos cultivos individuales se analizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Micromicetos saprobios

Los micromicetos saprobios *A. massei* (Sacc.) W. Gams cepa CICY029 (*Am*), *B. portoricensis* (F. Stevens) Piroz. y S.D. Patil cepa MR42 (*Bp*), *C. elongatum* Bonord cepa MR45 (*Ce*) y *Stachybotrys* sp. cepa MR33 (*Ssp*, antes *Memmoniella* sp.), se obtuvieron del cepario de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Estos se encuentran preservados en glicerol al 20% mantenidos a temperatura ambiente y en ultracongelación a -80°C en glicerol (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Estos cuatro hongos saprófitos se reactivaron en cajas de Petri (90 x 15 mm) conteniendo medio de agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y se dejaron incubar a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por siete días con luz natural.

Cultivo en arroz fermentado de las cepas saprófitas

El arroz (Valle Verde) se depositó en frascos de vidrio (20 g por frasco) y se le adicionaron 30 mL de agua destilada permaneciendo en fermentación a temperatura ambiente por una noche. Posteriormente, estos se esterilizaron a 20 lbs de presión y $120 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos (Felisa, FE398), permaneciendo 24 h a prueba de esterilidad. Cada frasco con el arroz fermentado (AF) se inoculó con 2 mL de propágulos (fragmentos de hifas/esporas) de cada cepa individual y en cultivos duales (1:1, v/v) de las cuatro cepas y se incluyó como blanco el AF sin inocular (Tabla 1). Las cepas individuales se cultivaron por duplicado, las interacciones duales y el blanco con ocho réplicas cada una. Los cultivos resultantes se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 40 días, con fotoperiodo de 12/12 h luz-oscuridad (Reyes-Estebanez *et al.* 2011). Después del tiempo de incubación, el micelio obtenido de cada cultivo y sus repeticiones no contaminadas se liofilizaron (Labconco 7670520 Freezezone 2.5) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Obtención de extractos de acetato de etilo de los hongos saprobios e interacciones duales

Los 10 cultivos liofilizados se fragmentaron y se sometieron a maceración con acetato de etilo (50 mL por cada frasco) a temperatura ambiente. Después de 48 horas se decantaron y el disolvente se filtró a través de algodón y papel filtro Whatman de poro mediano, repitiendo el proceso tres veces. El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio (Ika modelo 110) a 40°C , a vacío hasta obtener el extracto fúngico seco, el cual se almacenó a 4°C en oscuridad hasta su evaluación biológica (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Partición de los extractos orgánicos de acetato de etilo

Los extractos fúngicos de los cultivos individuales y de las interacciones duales más activas y el blanco se disolvieron en una mezcla de acetonitrilo-metanol (2:1, v/v) y se partitionaron con hexano (3x, 2:1, 1:1, 1:1, v/v). El disolvente se eliminó a vacío (*vide supra*) hasta obtener las fracciones hexánica (A) y de acetonitrilo (B), almacenadas a 4°C en oscuridad hasta su evaluación biológica (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Bioensayos por microdilución

Cepas fitopatógenas

Los organismos patógenos evaluados incluyeron a los hongos filamentosos *A. chrysanthemi* (CICY-004) aislada de *Dendranthema grandiflorum*, *A. tagetica* (ATCC-58771), *C. gloeosporioides* (CICY-002) aislada de *Carica papaya*, *Fusarium oxysporum* (CICY-003) de *Solanum lycopersicum* y *Mycosphaerella fijiensis* (C1233) aislada de *Musa acuminata*; la levadura *C. albicans* (ATCC 10231) y las cepas bacterianas *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. carotovora* subsp. *carotovorum* (ATCC 138); *Staphylococcus aureus* (ATCC 6536) y *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* (ATCC 10547). Todas las cepas se obtuvieron del cepario institucional (*vide supra*). Los

Tabla 1. Micromicetos saprobios en estudio y sus interacciones duales.

Especie fúngica	Sitio de colecta	Clave	Interacción			
			<i>Am</i>	<i>Bp</i>	<i>Ce</i>	<i>Ssp</i>
<i>Acremonium massei</i> CICY029	Yucatán	<i>Am</i>	X	<i>Am-Bp</i>	<i>Am-Ce</i>	<i>Am-Ssp</i>
<i>Beltraniella portoricensis</i> MR42	Veracruz	<i>Bp</i>		X	<i>Bp-Ce</i>	<i>Bp-Ssp</i>
<i>Cylindrium elongatum</i> MR45	Veracruz	<i>Ce</i>			X	<i>Ce-Ssp</i>
<i>Stachybotrys</i> sp. MR33	Yucatán	<i>Ssp</i>				X
Blanco Arroz fermentado		AF				

X: cultivo individual

hongos fitopatógenos se reactivaron en cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo PDA y se dejaron incubar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por siete días con luz natural, las cepas bacterianas se reactivaron en agar Müller Hinton e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Suspensión de esporas de hongos filamentosos. En la superficie micelial del hongo fitopatógeno cultivado en una caja de Petri se le adicionaron 5 mL de la solución salina al 0.85 % y con ayuda de un portaobjetos estéril se removieron las esporas. Posteriormente, las esporas obtenidas se contabilizaron en una cámara de Neubauer (10 μL) y se ajustaron a una concentración de 5×10^4 esporas/mL para *A. chrysanthemi* y *A. tagetica*, 2×10^5 esporas/mL para *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). La concentración para la cepa monoascospórica *M. fijiensis*, fue de 5×10^4 conidios/mL, los cuales se obtuvieron al añadir 2.4 mL de gelatina al 1% a la superficie micelial en cada caja de Petri, los conidios se suspendieron con un pincel y se contabilizaron en una cámara de Sedgwick Rafter (Peraza-Echeverría *et al.*, 2008).

Bioensayo antifúngico contra hongos filamentosos. Los extractos crudos de los monocultivos y de las interacciones duales se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, p/v. Una alícuota de 10 μL (400 μg) de cada muestra se transfirieron a una microplaca estéril de 96 pozos, que previamente contenía 90 μL de medio Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (20 mM HEPES y L-glutamina, sin NaHCO_3 , Sigma). Finalmente, en cada micropozo se adicionaron 100 μL de la suspensión de esporas del hongo fitopatógeno en evaluación, con un volumen final de 200 μL a la concentración final de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto. Como controles negativos de crecimiento se empleó el medio RPMI 1640, el blanco (AF) y la suspensión de esporas; y como control positivo se utilizó Mirage CE 45® (2.25 μg , Procloraz, 0.45 μg i.a./ μL) para los hongos fitopatógenos, excepto para *M. fijiensis*, con el cual se utilizó neomicol (1 μg , 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Cada muestra y los controles negativos y positivo se evaluaron por triplicado y las microplacas se incubaron a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 96 horas (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Las fracciones obtenidas con hexano y acetonitrilo se evaluaron a 1000, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con tres réplicas para cada concentración, con los cuales se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) a la cual el patógeno no crece.

Después de 96 horas de incubación la lectura de la microplaca se realizó de manera visual en base a los parámetros establecidos por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés, 2002). Esta lectura se basa en el

crecimiento micelial (CM), siendo nulo (0) en el control positivo, ligero (1 = 25% de CM), medio (2 = 50% de CM), abundante (3 = 75% de CM) o total en el control negativo (4 = 100% CM).

Antibacteriano y anti-Candida. Los extractos crudos de las cepas saprófitas y de sus cultivos duales se evaluaron contra *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. carotovora* subsp. *carotovorum*, *S. aureus* y *X. campestris* pv. *carotae* mediante el bioensayo de microdilución (Andrews, 2001). Las bacterias y la levadura se reactivaron en el medio agar Müller-Hinton (AMH) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, después de 24 horas las colonias puras se transfirieron a caldo Müller-Hinton (CMH). La densidad del inóculo se ajustó a 1×10^8 UFC/mL por comparación visual con el nefelómetro 0.5 de McFarland.

Los extractos crudos de los monocultivos y las seis interacciones duales se disolvieron con DMSO a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, p/v. Posteriormente, cada extracto (10 μL) se transfirió a un micropozo, donde el primero previamente contenía 90 μL de medio CMH y se le adicionaron 100 μL del inóculo para tener una concentración final de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto orgánico y un inóculo de 1×10^4 UFC/mL. Las fracciones hexánicas y de acetonitrilo se evaluaron en diluciones seriadas a concentraciones finales de 400, 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como control positivo se empleó Amikacina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y DMSO al 40% y como control negativo se empleó el medio CMH y DMSO al 5% y la suspensión de esporas. Tres réplicas de cada tratamiento se llevaron a incubación en la oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para *E. carotovora* y *X. campestris*; $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para *B. subtilis*, *S. aureus* y *C. albicans*. A las 24 h se adicionaron 50 μL de cloruro de trifetil tetrazolium al 1% (TTC) a cada pocillo, observando una coloración roja intensa cuando las bacterias estaban vivas, indicando la ausencia de actividad antibacteriana (-), e incolora cuando las bacterias estaban muertas (+) (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Análisis por CG-EM

Los análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG/EM) se realizaron en un cromatógrafo Agilent Technology 7890A acoplado a un detector másico Agilent Technology 5975C. Las muestras (10%) se diluyeron en una mezcla de diclorometano/metanol 9:1, inyectando 1.5 μL , en una columna HP-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano- no polar) con longitud de 30 m, diámetro interno de 0.32 mm y una película de 0.5 μm ; flujo de helio de 1 mL/min. Temperatura inicial de 150°C , temperatura final de 280°C y gradiente de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tiempo de corrida de 37 min. La identificación de los metabolitos se realizó por

comparación de sus espectros de masas con la base de datos del equipo (NIST 05).

RESULTADOS

Rendimiento de los extractos fúngicos

Los rendimientos de los extractos de acetato de etilo de los cultivos fúngicos individuales, en interacción dual y el blanco de AF se muestran en la tabla 2. El medio de cultivo AF sin inocular mostró el rendimiento más bajo (0.14%), al compararlo con los extractos obtenidos en los monocultivos e interacciones duales. El mayor rendimiento (3.52%) obtenido correspondió al extracto de la interacción dual *Am-Ssp*, seguido por *Bp-Ce* (2.99%) y el monocultivo de *C. elongatum* (2.97%).

Actividad antimicrobiana de los extractos fúngicos

Entre los 10 extractos fúngicos evaluados a la concentración de 2000 µg/mL, nueve mostraron capacidad antifúngica en al menos uno de los hongos fitopatógenos, excepto contra *F. oxysporum*. Un efecto inhibitorio total (ICM = 100%) se observó con seis extractos fúngicos, que correspondieron a *A. massei*, *Stachybotrys* sp. y las interacciones duales *Am-Ce*, *Am-Ssp* y *Ce-Ssp* contra *C. gloeosporioides* y únicamente la última interacción contra *M. fijiensis*. Con menor ICM (25 -50 %) de los hongos fitopatógenos se detectaron a los extractos de *A. massei*, *B. portoricensis* y la interacción de ambos contra *A. chrysanthemi* y *A. tagetica*. El extracto de *C.*

elongatum no mostró efecto contra alguno de los fitopatógenos evaluados, pero su interacción con *A. massei* afectó a todos en diferente intensidad, excepto a *F. oxysporum*.

Todos los extractos fúngicos mostraron efecto bactericida contra *X. campestris* a 400 µg/mL. Por lo contrario, únicamente el extracto de *Stachybotrys* sp. y su interacción con *C. elongatum* mostraron efecto anti-*Candida* a 400 µg/mL. Los patógenos *B. subtilis*, *E. carotovora* y *S. aureus* no fueron inhibidos por los extractos obtenidos de los cultivos individuales, así como tampoco por sus interacciones duales (Tabla 3).

Actividad de las fracciones de los extractos fúngicos

La actividad de las fracciones hexánicas con menor MIC y de acetonitrilo obtenidas de los extractos fúngicos de cuatro de las interacciones más activas y de las cepas individuales se muestran en la tabla 4. Las fracciones con menor MIC (≤ 250 µg/mL) correspondieron a las hexánicas de las cuatro cepas individuales y la fracción de acetonitrilo de *Stachybotrys* sp. La fracción de acetonitrilo de *B. portoricensis* ocasionó la más baja MIC (≤ 250 µg/mL) contra *M. fijiensis*, mientras la de *Stachybotrys* sp. mostró una MIC de 500 µg/mL contra este patógeno y la más baja contra *A. tagetica* a 1000 µg/mL. En cuanto a las interacciones duales, las fracciones hexánicas de *Am-Bp*, *Am-Ce*, *Am-Ssp* (MIC de 1000 µg/mL) y la de acetonitrilo de *Ce-Ssp* (MIC de 500 µg/mL) mostraron actividad únicamente contra *C. gloeosporioides*.

Tabla 2. Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos ocasionado por los extractos fúngicos individuales y sus interacciones en el bioensayo de microdilución (2000 µg/mL).

Especie/interacción	Inhibición del Crecimiento Micelial (%)					Rendimiento (%)
	<i>Ac</i>	<i>At</i>	<i>Cg</i>	<i>Fo</i>	<i>Mf</i>	
<i>Acremonium massei</i> (<i>Am</i>)	50	25	100	0	0	1.71
<i>Beltraniella portoricensis</i> (<i>Bp</i>)	50	50	0	0	25	2.42
<i>Cylindrium elongatum</i> (<i>Ce</i>)	0	0	0	0	0	2.97
<i>Stachybotrys</i> sp. (<i>Ssp</i>)	0	0	100	0	0	2.65
<i>Am-Bp</i>	25	50	0	0	0	2.27
<i>Am-Ce</i>	25	25	100	0	25	1.91
<i>Am-Ssp</i>	0	0	100	0	25	3.52
<i>Bp-Ce</i>	0	25	0	0	0	2.99
<i>Bp-Ssp</i>	0	25	0	0	0	2.73
<i>Ce-Ssp</i>	0	0	100	0	100	2.47
Blanco	0	0	0	0	0	
Control negativo	0	0	0	0	0	0.14
Control positivo	100	100	100	100	100	

Ac: *Alternaria chrysanthemi*; *At*: *Alternaria tagetica*; *Cg*: *Colletotrichum gloeosporioides*; *Fo*: *Fusarium oxysporum*; *Mf*: *Mycosphaerella fijiensis*; Blanco: Arroz fermentado sin inocular, Control negativo: medio RPMI 1640; Control positivo: Neomicol (1 µg, *Mf*), Mirage (2.25 µg, *Ac*, *At*, *Cg*, *Fo*)

Tabla 3. Actividad antibacteriana y anti-*Candida* de los extractos obtenidos de las interacciones duales y cultivos de hongos saprófitos en el bioensayo en microdilución (400 µg/mL).

Hongo/interacción	Sa	Ca	Xc	Ec	Bs
<i>Acremonium masseei</i> (Am)	-	-	+	-	-
<i>Beltraniella portoricensis</i> (Bp)	-	-	+	-	-
<i>Cylindrium elongatum</i> (Ce)	-	-	+	-	-
<i>Stachybotrys</i> sp. (Ssp)	-	+	+	-	-
Am-Bp	-	-	+	-	-
Am-Ce	-	-	+	-	-
Am-Ssp	-	-	+	-	-
Bp-Ce	-	-	+	-	-
Bp-Ssp	-	-	+	-	-
Ce-Ssp	-	+	+	-	-
Blanco	-	-	-	-	-
Control negativo	-	-	-	-	-
Control positivo	+	+	+	+	+

Sa: *Staphylococcus aureus*; Ca: *Candida albicans*; Xc: *Xanthomonas campestris*; Ec: *Erwinia carotovora*; Bs: *Bacillus subtilis*; (+): Activo; (-): No activo; Blanco: Arroz fermentado sin inocular; Control positivo: amikacina (5 µg) para bacterias, neomicol (1 µg) para Ca.

En cuanto al efecto antibacteriano de las fracciones de los extractos fúngicos, la menor MIC detectada correspondió a la fracción hexánica de *A. masseei* a 200 µg/mL contra *X. campestris*, seguida por las fracciones de acetonitrilo de *A. masseei*, *B. portoricensis*, *Stachybotrys* sp. y las interacciones Am-Bp y Ce-Ssp a 400 µg/mL. Ninguna fracción afectó el crecimiento de *A. chrysanthemi* ni de *C. albicans* a las concentraciones evaluadas.

Perfil químico de Ce, Ssp y la interacción Ce-Ssp por CG-EM

La interacción dual con mayor bioactividad detectado con los micromicetos saprobios *C. elongatum* y *Stachybotrys* sp., se analizó por CG/EM. En los cromatogramas y espectros de masas de los extractos de las cepas *C. elongatum* y *Stachybotrys* sp., así como su interacción dual obtenidos por CG-EM se observaron diferencias en sus perfiles químicos (Tabla 5). Los metabolitos detectados con abundancia (área ≥ 1%) incluyeron ácidos grasos, sus derivados esterificados y otros no identificados, con énfasis en los metabolitos observados únicamente en la interacción dual Ce-Ssp. En el cromatograma de *Stachybotrys* sp. se detectó un pico mayoritario

(34.96% de abundancia), con t_R de 11.43 min, el cual no coincidió con algún metabolito reportado previamente después de comparar su espectro de masas con la base de datos del equipo. Este metabolito no identificado continuó produciéndose como mayoritario durante la interacción con *C. elongatum*, aunque con una ligera reducción del 10%. Con respecto a *C. elongatum*, en su cromatograma presenta dos picos los cuales se identificaron como hexadecanoato de etilo (t_R = 10.31 min) y 9,12-octadecadienoato de etilo (t_R = 11.99 min) por comparación de sus espectros de masas con la base de datos del equipo. En el cromatograma de la interacción Ce-Ssp se detectaron cinco metabolitos abundantes (> 1%) ausentes en los cultivos individuales. Esos correspondieron al hexadecanoato de propilo (t_R = 11.31 min), ácido 9,12-octadecadienoico (t_R = 16.34 min) y a tres metabolitos no identificados (t_R = 10.15, 17.13 y 20.90 min) por comparación de sus espectros de masas con la base de datos del equipo.

DISCUSIÓN

En nuestra continua búsqueda de alternativas naturales para el control de microorganismos patógenos, se estudiaron cuatro micromicetos saprobios pertenecientes a especies no evaluadas previamente en interacción dual. Todos los extractos fúngicos de los cultivos individuales y las interacciones duales demostraron actividad contra al menos uno de los patógenos evaluados. Los perfiles de actividad antimicrobiana revelaron diferencias en los cultivos individuales y en sus interacciones duales. La cepa de *M. fijiensis*, un patógeno de alta importancia en el cultivo del banano, presentó sensibilidad baja únicamente a *B. portoricensis* y se observa en tres interacciones, siendo altamente efectivo en la interacción Ce-Ssp. Muy interesantemente se detectó que esta interacción también fue altamente efectiva contra *C. gloeosporioides*, pero el extracto de acetato de etilo de *C. elongatum* únicamente mostró actividad contra *X. campestris*. Esta estrategia de cultivos duales enriquece la efectividad biológica que tienen los microorganismos la cual se atribuye a los metabolitos secundarios que se biosintetizan en condiciones de estrés por competencia, induciendo la activación de genes silenciados (Arora et al., 2020; Damasceno et al., 2021; Xu et al., 2021). Por ejemplo, *Alternaria tenuissima* cepa SS77 en co-cultivo con *Nigrospora sphaerica* cepa SS67 produce stemfirepilenol, un policétido antifúngico que bloquea el crecimiento de *N. sphaerica* a 200 µM (Chagas et al., 2013); los hongos endófitos *Alternaria* sp. E33 y *Phomopsis* sp. K38 co-cultivados producen un ciclotetrapéptido identificado como ciclo-(L-leucil-*trans*-4-hidroxi-L-prolil-D-leucil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina con actividad contra los hongos fitopatógenos *Fusarium graminearum*, *Gaeumannomyces graminis*,

Helminthosporium sativum y *Rhizoctonia cerealis*, con una MIC en el rango de 130 - 250 µg/mL (Li *et al.*, 2014); en otra investigación, las bacterias marinas *Janthinobacterium* spp. cepas ZZ145 y ZZ148 co-cultivados biosintetizan los policétidos janthinopolyenemicinas A y B que inhiben el crecimiento de *C. albicans* con una MIC de 15.5

µg/mL (Anjum *et al.*, 2018). En la presente investigación, el perfil químico de la interacción *Ce-Ssp* muestra claramente la presencia de componentes que no se detectan en los cultivos individuales, de los cuales dos son ácidos grasos y tres no se identificaron. Esto abre la posibilidad de que sean componentes novedosos.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) de las fracciones obtenidas de extractos fúngicos y sus interacciones duales contra zoo y fitopatógenos en el ensayo de microdilución en dilución seriada.

Especie fúngica	Fracción	Ac	At	Cg	Mf	Ca	Xc
<i>Acremonium maseei</i> (Am)	H	>1000	>1000	500	>1000	>400	200
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	400
<i>Beltraniella portoricensis</i> (Bp)	H	>1000	>1000	≤250	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	500	≤250	>400	400
<i>Cylindrium elongatum</i> (Ce)	H	>1000	>1000	≤250	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	>400
<i>Stachybotrys</i> sp. (Ssp)	H	>1000	>1000	≤250	>1000	>400	>400
	A	>1000	1000	≤250	500	>400	400
Am-Bp	H	>1000	>1000	1000	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	400
Am-Ce	H	>1000	>1000	1000	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	>400
Am-Ssp	H	>1000	>1000	1000	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	>400
Ce-Ssp	H	>1000	>1000	>1000	>1000	>400	>400
	A	>1000	>1000	500	>1000	>400	400
Blanco	H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	A	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Control positivo

Ac: *Alternaria chrysanthemi*; At: *Alternaria tagetica*; Cg: *Colletotrichum gloeosporioides*; Fo: *Fusarium oxysporum*; Mf: *Mycosphaerella fijiensis*; Ca: *Candida albicans*, Xc: *Xanthomonas campestris*; A: Acetonitrilo; H: hexánica; Blanco: Arroz fermentado sin inocular; Mirage CE 45® (2.25 µg, Procloraz, 0.45 µg i.a./µL) para los hongos fitopatógenos, amikacina (5 µg) para bacterias, neomicol (1 µg) para *Ca*.

Tabla 5. Metabolitos detectados en los extractos de acetato de etilo de *Cylindrium elongatum* MR45 (Ce), *Stachybotrys* sp. MR33 (Ssp) y su interacción dual (Ce-Ssp), cultivados en arroz fermentado por CG-EM.

No. Pico	Metabolitos	tr min	% Área		
			Ce	Ssp	Ce-Ssp
1	No identificado	10.15	nd	nd	2.67
2	Hexadecanoato de etilo	10.31	2.74	nd	1.41
3	Hexadecanoato de propilo	11.31	nd	nd	1.16
4	No identificado	11.43	nd	34.96	31.48
5	9,12-Octadecadienoato de etilo	11.99	1.69	nd	1.00
6	Ácido 9,12-octadecadienoico	16.34	nd	nd	3.01
7	No identificado	17.13	nd	nd	5.78
8	No identificado	20.90	nd	nd	2.12

nd = no detectado

Por otra parte, la alta sensibilidad de *C. gloeosporioides* y *X. campestris* a los extractos fúngicos individuales y las interacciones duales se mantienen cuando se fracciona el extracto. Con excepción de la interacción *Ce-Ssp*, todas las fracciones hexánicas demostraron su capacidad de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Los hongos producen una gran variedad de ácidos grasos tanto libres como esterificados (Sancholle *et al.*, 2004). En muchos de los casos los más abundantes son el palmítico (16:0), seguido del oleico (18:1) y el linoleico (18:2), los cuales han demostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos (Pohl *et al.*, 2011) y bacterias (Casillas-Vargas *et al.*, 2021). En general, los ácidos grasos y sus derivados han sido reportados con actividad antifúngica. por ejemplo, a partir del co-cultivo de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en presencia de micelio inactivo de *C. gloeosporioides* se detectó una mezcla de ácido acético, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, butanoato de etilo y acetato de butilo con actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. El componente mayoritario correspondió al acetato de butilo, con efecto mortal a la concentración de 0.5 μ M (Ramírez-Vigil *et al.*, 2020). Por otra parte, la insaturación en las estructuras de los ácidos grasos, como el ácido 9,12-octadecadienoico, juega un papel importante con respecto a la actividad biológica, pues los dobles enlaces ocupan una mayor sección transversal en la membrana de los hongos, confiriendo mayor capacidad de movimiento dentro de ellas incrementando la actividad antifúngica (Avis y Bélanger, 2001). Probablemente el mecanismo de acción se dé a través del ataque a la membrana celular, causando un aumento en la fluidez de la membrana induciendo la filtración de los componentes intracelulares lo que ocasiona la muerte celular (Casillas-Vargas *et al.*, 2021; Pohl *et al.*, 2011).

En la evaluación antimicrobiana los resultados mostraron que *A. massei* (Sacc.) W. Gams CICY029 posee efectividad contra cuatro de los patógenos evaluados. Este correspondería al primer reporte de *A. massei* con actividad antimicrobiana contra *A. chrysanthemi*, *A. tagetica*, *C. gloeosporioides* y *X. campestris*. El extracto de esta misma cepa no mostró actividad contra *E. carotovora*, *S. aureus* y *X. campestris* al ser cultivado en los medios líquidos caldo de papa dextrosa y caldo Czapeck-Dox-Levadura (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008). Al fraccionar el extracto de *A. massei*, ambas fracciones mostraron efecto antibacteriano contra *X. campestris*, pero únicamente la fracción hexánica mostró efecto contra *C. gloeosporioides*. Al estar en interacción con *Ssp* y *Ce* se mantiene la alta actividad contra *C. gloeosporioides* y aparece una ligera inhibición contra *M. fijiensis* (ICM = 25%); el % ICM se ve aumentado a 50% contra *A. tagetica* al interactuar con *B. portoricensis*. La cepa *A. massei* CICY029 posee

propiedades disuasorias contra los insectos chupadores *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. Este efecto se demostró que fue producido por los ácidos grasos identificados como ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido 9-octadecenoico y el ácido 9,12-octadecadienoico, así como por sus esteres hexadecanoato de metilo y el 9-octodecanoato de metilo (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2017).

Con respecto a *B. portoricensis*, la actividad antimicrobiana se reporta por primera vez contra *A. chrysanthemi*, *A. tagetica* y *M. fijiensis*. Esta misma cepa mostró efecto bactericida (MIC de 200 μ g/mL) contra *S. aureus* en su extracto de filtrado al ser cultivado en CPD y una MIC mayor de 400 μ g/mL contra *B. subtilis* (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008; 2011). Al fraccionar el extracto de AcOEt de *B. portoricensis*, ambas fracciones mostraron alto efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides* y la de mayor polaridad incrementó su actividad contra *M. fijiensis*. Un estudio realizado menciona que la actividad de los extractos puede ser variable y esto se debe a la naturaleza química de los disolventes, lo que hace que la actividad cambie, aunque provengan de una misma fuente (Shafique *et al.*, 2019). En las interacciones, *B. portoricensis* perdió o bajó su efecto antifúngico contra *A. chrysanthemi*. Después de una búsqueda exhaustiva no se encontraron reportes de *B. portoricensis* en los que se evaluó su efecto contra estos patógenos y tampoco de interacciones o de compuestos, únicamente se encontró el efecto antimicrobiano contra *B. subtilis* de la cepa *Beltraniella humicola* (Gajbhiye *et al.*, 2013). Por otra parte, también se ha reportado que *B. portoricensis* podría ser de mucha utilidad en la industria de los detergentes (Baba *et al.*, 2005).

En cuanto a *C. elongatum* MR45, se reporta por primera ocasión su evaluación contra *A. chrysanthemi* y *M. fijiensis*, sin efecto antifúngico. En estudios previos, los extracto de la cepa MR45 demostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* cuando son cultivados en medio líquido CPD; así como contra *E. carotovora* y *X. campestris* (400 μ g/mL) en el medio líquido CDL (Reyes-Estebanez *et al.*, 2008); y contra *A. tagetica*, *C. gloeosporioides* y *Phythium aphanidermatum* (500 μ g/disco), *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. carotovora*, *S. aureus* y *X. campestris* (MIC = 100-400 μ g/mL) en el medio sólido de arroz fermentado (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Sin embargo, en el presente estudio se observó que la actividad antimicrobiana de *C. elongatum* MR45 se perdió con el extracto en la cepa individual, esto pudo deberse a la pérdida de su capacidad de producir metabolitos antagonistas a su cultivo continuo en medio ricos en nutrientes. En la naturaleza, los microorganismos coexisten en comunidades los cuales son diversos en especies y géneros, donde los metabolitos secundarios pueden utilizarse para

protección, cooperación o como mediadores de comunicación. En general la activación o inhibición de los grupos de genes que regulan el metabolismo secundario en los hongos es muy complejo en la naturaleza (Macheleidt *et al.*, 2016).

Por otra parte, el extracto individual de *Stachybotrys* (Ssp) inhibe el 100% el crecimiento de *C. gloeosporioides* y en estudios previos, únicamente contra *C. albicans* (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Mientras que al estar en interacción con la cepa *C. elongatum* el efecto antifúngico de su extracto de acetato de etilo inhibe totalmente el crecimiento (ICM = 100%) del hongo *M. fijiensis*. Lo anterior, sugiere que se activan complejos mecanismos de biosíntesis que dan lugar a otros productos naturales (Bertrand *et al.*, 2013a; 2013b). El género *Stachybotrys* ha sido reportado como una fuente de nuevos y bioactivos metabolitos secundarios que han demostrado actividades antimalárica, anti virus influenza A, anticancerígena y antifúngica, entre otras (Wang *et al.*, 2015), así como también tipo tricotecenos macrocíclicos que son altamente citotóxicos encontrados en *Stachybotrys chartarum* genotipo S (Ulrich y Schäfer, 2020).

CONCLUSIONES

El conocimiento de la capacidad antibacteriana y antifúngica de cuatro micromicetos aislados de la hojarasca en suelos de Yucatán y Veracruz se enriquece con la presente contribución, en particular por ser la primera vez que se reporta la actividad antimicrobiana de la especie *A. maseei* contra cuatro fitopatógenos: *A. chrysanthemi*, *A. tagetica*, *C. gloeosporioides* y *X. campestris*. Las interacciones duales pueden incrementar el potencial antimicrobiano de las especies, siendo la interacción más efectiva la de *C. elongatum* MR45 y *Stachybotrys* sp. MR33 contra *M. fijiensis*, *Colletrichum gloeosporioides* y *X. campestris*. El perfil químico por CG-EM reveló la presencia de componentes únicos en la interacción *C. elongatum-Stachybotrys* sp. diferentes a los que producen los monocultivos. Estudios dirigidos al aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana de la interacción dual de *C. elongatum* MR45 y *Stachybotrys* sp. MR33 son necesarios para entender desde el punto de vista químico la dinámica de las interacciones, así como también para optimizar su rendimiento, evaluar su toxicidad hacia otros organismos benéficos y su efectividad en condiciones *in vivo*. Esta estrategia con hongos saprobios de suelos es reportada por primera vez con hongos nativos de México, siendo una opción promisoriosa para continuar investigando y desarrollarlos como posibles antimicrobianos naturales contra hongos y bacterias fitopatógenas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Leticia Peraza Echeverría por proporcionar el material biológico de *Mycosphaerella fijiensis* para los bioensayos, a Fabiola Escalante Erosa por su apoyo en la realización de los análisis de CG/EM y al personal técnico bibliotecario del CICY por su valiosa asistencia técnica.

Funding. This research was financed by the CONACYT project CB-131256.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Compliance with ethical standards. Not applicable.

Data availability. The data is available upon request, with the corresponding author mmarcela@cicy.mx.

Author contribution statement (CRediT). IL.

Medina-Baizabal: Performing the experiment, Data collection, Writing original draft. **G. Heredia:** Conceptualization, Investigation, Methodology. **M. Gamboa-Angulo:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Resources, Project administration, Writing-review & editing.

REFERENCIAS

- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, Suppl. S1, pp. 5–16.
- Anjum, K., Sadiq, I., Chen, L., Kaleem, S., Li, X.-C., Zhang, Z. and Lian, X.-Y. 2018. Novel antifungal janthinopolyenemycins A and B from a co-culture of marine-associated *Janthinobacterium* spp. ZZ145 and ZZ148. *Tetrahedron Letters*, 59, pp. 3490–3494. <https://doi.org/0.1016/j.tetlet.2018.08.022>
- Arora, D., Gupta, P., Jaglan, S., Roullier, C., Grovel, O. and Bertrand, S. 2020. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook. *Biotechnology Advances*, 107521. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107521>
- Avis, T.J. and Bélanger, R.R. 2001. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 956–960. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.956-960.2001>
- Baba, Y., Shimonaka, A., Koga, J., Murashima, K., Kubota, H. and Kono, T. 2005. Purification and characterization of a new endo-1,4-β-D-

- glucanase from *Beltraniella portoricensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, pp. 1198–1201. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1198>
- Bertrand, S., Azzollini, A., Schumpp, O., Bohni, N., Schrenzel, J., Monod, M., Gindro K. and Wolfender, J.L. 2014. Multi-well fungal co-culture for *de novo* metabolite-induction in time-series studies 10ase don untargeted metabolomics. *Molecular BioSystems.*, 10, pp. 2289–2298. <https://doi.org/10.1039/c4mb00223g>
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K. and Wolfender, J.L. 2013a. *De novo* production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* an *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*. 76, pp.1157–1165. <https://doi.org/10.1021/np400258f>
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Bujard, A., Azzollini, A., Monod, M., Gindro, K., Wolfender, J.L. 2013b. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Chromatography A*, 1292, pp. 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.098>
- Boege, K. and del Val, E. 2011. Bugs we see, relationships we don't know: diversity and importance of biotic interactions. *Ciencias*, 102, pp. 4–11.
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., García Del Valle, R., Carballeira, N.M. and Sanabria-Ríos, D.J. 2021. Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82, pp. 101093. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
- Chagas, F.O., Dias, L.G. and Pupo, M.T. 2013. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *Journal of Chemical Ecology*, 39, pp. 1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0351-7>
- Damasceno-Silva, A., Pepe-Ambrozin, A.R., S. de Camargo, A.F., Nogueira-Cruz, F.d P., Gomes-Ferreira, L.L., Krogh, R., Lopes-Silva, T., Lopes Baratella da Cunha Camargo, I., Defini-Andricopulo, A. and Vieira P.C. 2021. Liquid fungal cocultivation as a strategy to access bioactive metabolites. *Planta Medica*, 87, pp. 187–195. <https://doi.org/10.1055/a-1200-2046>
- Fernández-Larrea Vega, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 62, pp. 96–100. <https://doi.org/10.1080/09583150310001517992>
- Gajbhiye, M.H., Sathe, S.J., Marathe, R.J. and Deshmukh, R.B. 2013. Antifungal *Bacillus subtilis* AFB22 from pomegranate with potential to control fruit rot. *Research Journal of Biotechnology*, 8, pp. 26–35.
- Genilloud, O. 2014. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, pp. 173-178. <https://doi:10.1007/s10482-014-0204-6>
- Li, C., Wang, J., Luo, C., Ding, W. and Cox, D.G. 2014. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Natural Product Research*, 28, pp. 616–621. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.887074>
- Macheleidt, J., Mattern, D.J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V. and Brakhage, A.A. 2016. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annual Review of Genetics*. 50: 16.1 -16.2. <https://371-92.10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Moore-Landecker, E. 1996. Metabolism, Part II Physiology and Reproduction, in *Fundamentals of the fungi*, Fourth edition. Prentice Hall, Chapter 13 New Jersey. pp. 383- 386.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Rex. J.H., Alexander B.D., Andes D., Arthington S.B., Brown S.D., Chaturveli V., Espinel I. A., Ghannoum M.A., Knapp, C. C., Motyl M.R., Ostrosky Z. L., Pfaller M., Sheehan D.J. and Walsh T.J. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Nonaka, K., Chiba, T., Suga, T., Asami, Y., Iwatsuki, M., Masuma, R., Omura, S. and Shiomi, K. 2015. Coculnol, a new penicillic acid produced by a coculture of *Fusarium solani* FKI-6853 and *Talaromyces* sp. FKA-65. *The Journal of Antibiotics*, 68, pp. 530-532.
- Peraza-Echeverría, L., Rodríguez-García, C.M. and Zapata-Salazar, D.M. 2008. A rapid, effective

- method for profuse in vitro conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37, pp. 460-463. <https://doi.org/10.1071/AP08042>
- Pohl, C.H., Kock, J.L.F. and Thibane, V.S. 2011. Antifungal free fatty acids: a review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed), Badajoz: *Microbiology Series, Format Research Center*, pp. 61-71.
- Ramírez-Vigil, E., Peña-Urbe, C.A., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes de la Cruz, H. and Chávez-Avilés, M.N. 2020. *In vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 10, pp. 329. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>
- Reyes-Estebanez, M., Heredia-Abarca, G. and Gamboa-Angulo, M.M. 2008. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología*, 28, pp. 49–56.
- Reyes-Estebanez, M., Herrera-Parra, E., Cristobal-Alejo, J., Heredia-Abarca, G., Canto-Canche, B., Medina-Baizabal, I. L., Gamboa-Angulo, M.M. 2011. Antimicrobial and nematocidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 5, pp. 1083–1089.
- Ruiz-Jiménez, A. L., González-Coloma, A., Andrés-Yeves, M.F., Ruiz-Sánchez, E., Heredia, G., Peraza-Sánchez, S.R., Medina-Baizabal, I.L., Reyes-Estebanez, M., Canto-Canché, B. and Gamboa-Angulo, M. 2017. Insect deterrent and nematocidal screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix masseei*. *Revista Argentina de Microbiología*, 49, pp. 83–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.009>
- Shafique, S., Shafique, S., Javed, A., Akhtar, N. and Bibi, S. 2019. Analysis of antagonistic potential of secondary metabolites and organic fractions of *Trichoderma* species against *Alternaria Alternata*. *Bioccontrol Science*, 24, pp. 81-88. <https://doi.org/10.4265/bio.24.81>
- Sancholle, M., Lösel D.M. and Laruelle E. 2004. Lipids in Fungal Biotechnology. In: Kück U. (eds) Genetics and Biotechnology. *The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 2. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07426-8_19
- Triastuti, A., Haddad, M., Barakat, F., Jargeat, P., Rabouille G., Fabre N., Amasifuen, C., Mejia K. and Vansteelandt, M. 2021. Dynamics of chemical diversity during co-cultures: an integrative time-scale metabolomics of fungal endophytes *Cophinforma mamane* and *Fusarium solani*. *Chemistry & Biodiversity*, 18, e2000672. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000672>
- Ulrich, S. and Schäfer, C. 2020. Toxin production by *Stachybotrys chartarum* genotype S on different culture media. *Journal of Fungi*, 6, 159 pp. 1–10. <https://doi.org/10.3390/jof6030159>
- Vargas-Díaz, A.A., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, I. L. and Pérez-Brito, D. 2014. Evaluation of native yucatecan plant extracts against *Alternaria chrysanthemi* and antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, pp. 1-11.
- Wang, A., Xu Y., Gao Y., Huang, Q., Luo X., An H., Dong J. 2015. Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry Review*, 14, pp. 623–655. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9365-1>
- Xu, X., Qu, R., Wu, W., Jiang, C., Shao, D., Shi, J. 2021. Applications of microbial co-cultures in polyketides production. *Journal of Applied Microbiology*, 130, pp. 1023–1034. <https://doi.org/10.1111/jam.14845>