



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura

Estudio de Hongos marinos para la posibilidad de obtención de bioproductos

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Marina y Acuicultura.

Por: Elizabeth Espinoza Muñoz
Profesor Guía: Dr. Felipe Galleguillos G.
Co-Profesor Guía: Dr. Víctor Hernández S.

Concepción, 15 de octubre del 2024

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primera instancia a mi madre, que estuvo del primer momento apoyando la decisión de entrar a esta carrera, sintiéndose orgullosa de quien soy y los méritos que he logrado a lo largo de los años.

También quiero agradecer a mi pololo Jonathan que desde que nos conocimos hace más de 10 años siempre ha estado apoyando mi progreso y me sigue alentando a ser mejor en esta vida y a cumplir mis sueños y aspiraciones.

Agradecer a mi papito padrino todo que siempre me cuida y me quiso como una hija.

Agradecer a mi amiga Kayna, que fue la primera amiga que hice al entrar en la universidad y espero y quiero seguir siendo amiga.

Agradecer a los amigos que fui adquiriendo en el paso de estos años Rafael, Guido, Felipe, Hugo, Gonzalo, Gustavo, Sebastián y Bastián.

Agradecer a mi amiga Paula a quien conocí después de pandemia, que de igual manera me apoyó en estos momentos.

Agradecer al otro amigo Felipe que conocí por casualidad por terceros, con quien ya llevamos casi 2 años de una amistad muy linda.

Agradecer a mis profesores tutores Felipe Galleguillos y Víctor Hernández que me ayudaron y apoyaron en este proceso.

Y agradecer a los profesores Fernando Cruzat, Allisson Astuya, Alejandra Llanos y Jorge Silva que me hicieron ver que sí podía crecer como estudiante y futura profesional.

Agradecer al Proyecto Fondecyt número 11230014 de ANID por el apoyo en la ejecución del proyecto.

Y agradecer al Laboratorio de Química de Productos naturales por su apoyo a cada uno de los docentes y auxiliares presentes.

Contenido

Contenido.....	3
1. Resumen	10
2. Introducción.....	11
2.1. Organismos y microorganismos del ambiente marino	11
2.2. Hongos marinos	12
2.3. Hongos marinos filamentosos	16
2.4. Poliestireno expandido: problema de gran contaminación.....	17
2.5. Micelio de hongos para obtención de un biomaterial.....	18
2.6. Metabolitos secundarios activos en hongos marinos	20
2.7. Pigmentos sintéticos.....	20
2.8. Pigmentos fúngicos de hongos marinos	21
3. Pregunta de investigación.....	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general.....	25
6. Objetivos específicos	25
7. Metodología.....	26
7.1. Aislamiento y cultivo de hongos marinos.....	26
7.2. Extracción y secuenciación	28
7.2.1. Extracción de ADN y amplificación de ADN.....	28
7.2.2. Secuenciación del producto de PCR.	28
7.2.3. Inoculación, diseño molde y secado biomaterial	29
7.3. Prueba de resistencia.....	30
7.4. Cultivo de hongos marinos en medio líquido para obtención de pigmentos y posterior análisis	30
7.4.1. Cultivo en medio líquido	30
7.4.2. Extracción	31
7.4.3. Proceso de secado en rotavapor	31
7.4.4. GC-MS	31

7.4.5. Preparación de muestras para ensayo de actividad antimicrobiana	32
7.4.6. Pruebas de actividad antimicrobiana	32
8. Resultados	34
8.1. Fotografías aislamiento de hongos marinos en medio sólido	34
8.2. Amplificación en gel de agarosa	35
8.3. Secuenciación del producto por PCR	36
8.4. Fotografía de cultivos líquidos	37
8.5. Fotografías microscopio óptico	38
8.6. Fotografías microscopio eléctrico de barrido (SCAN)	43
8.7. Prototipo biomaterial	48
8.8. Prueba de resistencia	49
8.9. Análisis cromatográfico	50
8.10. Compuestos con propiedades de interés:	Error! Bookmark not defined.
9. Discusión	64
10. Conclusión	68
11. Anexo	69
12. Bibliografía	72

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de productos a base de micelio vs materiales poliméricos. (Alemu, Tafesse et al. 2022).....	20
Tabla 2. Medio de cultivo estándar.	26
Tabla 3. Medio de cultivo adaptado a hongos marinos.....	27
Tabla 4. Medio de cultivo adaptado para hongos marinos.....	27
Tabla 5. Medio de cultivo para replicar los cultivos ya aislados.....	27
Tabla 6. Tratamiento de inoculación de sustrato solido en porcentaje.	29
Tabla 7. Tratamiento de inoculación de sustrato solido en gramos.....	29
Tabla 8. Medio de cultivo para cultivo líquido con agua de mar.	30
Tabla 9. Medio de cultivo para cultivo liquido con agua destilada.	30
Tabla 10. Configuración del método cromatográfico.	32
Tabla 11. Pesos secos de extractos.	32
Tabla 12. Cepas de microorganismos ensayados con interés biomédico.	32
Tabla 13. Secuenciación del producto PCR.	36
Tabla 14. Tamaño estimado de esporas	48
Tabla 15. Mar Micelio, MQ>90%	50
Tabla 16. Mar Micelio, MQ entre 60-89%.....	50
Tabla 17. Mar Medio, MQ>90%	51
Tabla 18. Mar Medio, MQ entre 70-89%.....	51
Tabla 19. Destilada Micelio, MQ >90%	54
Tabla 20. Destilada Micelio, MQ entre 70-89%.....	55
Tabla 21. Destilada Medio, MQ>90%	59
Tabla 22. Destilada Medio, MQ entre 70-89%	60
Tabla 23. Screening de concentraciones bioactivas.....	62
Tabla 24. Características de los biomateriales en comparativa con el EPS.	65

Índice de figuras

Figura 1: Filogenia de hongos acuáticos (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019)).....	12
Figura 2 Habitats artificiales para hongos acuáticos. (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019))	14
Figura 3 papel ecológico de los hongos acuáticos (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019))	15
Figura 4. Estructuras fructíferas de hongos marinos: (a) <i>Amylocarpus encephaloides</i> es una de las pocas especies de hongos marinos que pueden observarse e identificarse a simple vista ya en el campo; (b) estos “puntos negros” en el receptáculo de la macroalga <i>Ascophyllum nodosum</i> son cuerpos fructíferos de <i>Stigmatidium ascophylli</i> (<i>Mycosphaerella</i> / especies de bivalvos. <i>Xylophaga</i>), en un pozo realizado por una <i>Zalerion maritima</i> (= <i>Lulwoana uniseptata</i>) masa conidial de la forma asexual del hongo, d; (sobre muertos y en descomposición <i>Calycina marina</i>) cuerpos fructíferos apotéticos de c); (<i>Mycophycias ascophylli</i>).....	16
Figura 5. Diagrama de flujo que muestra la producción de compuestos a base de micelio. (Alemu, Tafesse et al. 2022). Se procede a la recolección y aislamiento del hongo filamentoso, el sustrato tiene un proceso de esterilización por un tiempo determinado, para su posterior inoculación y moldeado, y secado a temperaturas entre 70° a 100°C, para la obtención del biomaterial final.	19
Figura 6. Hongos cultivados en placas. En a, b, c, d, e, f, g, h, i y j se observan las placas cultivadas ya aisladas de sedimentos marinos, con letras asignadas para diferenciar cada hongo.....	34
Figura 7. Se puede observar la amplificación de las 11 muestras de los hongos cultivados.....	35
Figura 8. Hongo <i>Alternaria sp.</i> (C) Cultivo medio líquido. Dejado en agitación con medio líquido compuesto de Agua de Mar y Extracto de Malta al 2%. En el cual es posible observar esporulación y micelio por todo el cultivo.....	37
Figura 9. Hongo <i>Talaromyces sp.</i> Cultivo medio líquido. Dejado en agitación, desprendiendo una coloración de color amarillenta.	37
Figura 10. Hongo <i>Talaromyces sp</i> replica. Cultivo medio líquido. Dejado en agitación, esporulado y con baja coloración.	38
Figura 11. Hongo <i>Cadophora sp.</i> , observado a 10x y 100x, es posible observar en a y b si hubo crecimiento de esporas del hongo cultivado, el hongo en placa tiene una coloración un tanto amarillenta, pero al ocupar el medio KHO3 su coloración cambio a rojiza.....	38

Figura 12. Hongo <i>Penicillium sp.</i> , observado a 10x y 100x, es posible observar las esporas en abundancia tanto juntas como dispersas en la fotografía, las esporas observables son de una coloración verdosa.	39
Figura 13. Hongo <i>Alternaria sp.</i> , observado a 10x y 100x, es posible observar el micelio de color negrísimo, las hifas son bastante finas.	39
Figura 14. Hongo No identificado (E), observado a 10x y 100x, es posible observar tanto esporas como micelio, además de estructuras, como es posible visualizar en b	40
Figura 15. Hongo <i>Talaromyces sp.</i> , observado a 10x y 100x, es posible observar en a diversos pequeños puntos los cuales serían las esporas, y en b se visualiza tantas esporas de pequeñas dimensiones y micelio en conjunto.	40
Figura 16. Hongo <i>Cadophora sp.</i> , observado a 10x y 100x, tanto en a como en b se visualizan esporas como micelios mezclados entre sí.	40
Figura 17. Hongo No identificado (H), observado a 10x y 100x, en a se visualizan esporas en gran cantidad, a comparación de en b que se visualiza mejor el micelio.	41
Figura 18. Hongo <i>Talaromyces flavus.</i> , observado a 10x y 100x, tanto en a como en b se observan esporas, de diversas tonalidades amarillentas y anaranjadas.	41
Figura 19. Hongo No identificado (J), observado a 10x y 100x, es posible visualizar tanto en a como en b esporas, en a son de un color negro y ya en b es posible observar un color más claro con bordes oscuros.	42
Figura 20. Hongo No identificado (K), observado a 10x y 100x, se visualiza en a esporas como estructuras las cuales tienen más esporas pegadas alrededor, lo cual en b es posible observar a mayor detalle, una forma de abanico con esporas a su alrededor.	42
Figura 21. Hongo <i>Cadophora sp.</i> Estructura de esporas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).	43
Figura 22. Hongo <i>Penicillium sp.</i> Al observar las esporas las cuales tienen una forma de verrucosa (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).....	43
Figura 23. Hongo <i>Alternaria sp.</i> Estructura de esporas(Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).	44
Figura 24. Hongo No identificado (E). Al observar la forma esporas listadas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).....	44
Figura 25. Hongo <i>Talaromyces sp.</i> Al observar la imagen no es posible distinguir el tipo de espora.	45

Figura 26. Hongo <i>Cadophora sp.</i> . Al observar la imagen no es posible distinguir el tipo de espora.	45
Figura 27. Hongo No identificado (H). Al observar la estructura es similar a una proliferación simpodial de conidióforo (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).	46
Figura 28. Hongo <i>Talaromyces flavus</i> . Al observar las esporas espinosas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).....	46
Figura 29. Hongo No identificado (J). Al observar la forma es de verrucosa (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).....	47
Figura 30. Hongo No identificado (K). Al observar la imagen no es posible distinguir el tipo de espora.	47
Figura 31. En la figura es posible observar los 6 prototipos de material con los 2 tratamientos mencionados en la metodología.	48
Figura 32. Prototipo biomaterial desmoldado y terminado.	49
Figura 33. Comparativa de resistencia a la compresión (MPa) por muestra. EPS tipo XI, un biomaterial obtenido con el hongo <i>P. sanguineus</i> con sustrato de aserrín de pino y el biomaterial obtenido con el hongo <i>Alternaria sp.</i>	49
Figura 34. Mar Micelio. Abundancia por tiempo.	50
Figura 35. Mar Medio. Abundancia por tiempo.	51
Figura 36. Metabolito Lactona Dehidromevalonica en tiempo 4.786 minutos.	52
Figura 37. Metabolito 3-hydroxy-4-methoxy-benzaldehido, en tiempo 8.34 minutos.	52
Figura 38. Metabolito 2-Hidroxi-4-isopropil-7metoxitropona en tiempo 14.062 minutos.	52
Figura 39. Metabolito Acido n-Hexadecanoico en tiempo 14.68 minutos.	53
Figura 40. Metabolito 9(11)-Dehidroergosteroltosilato en tiempo 23.309 minutos.	53
Figura 41. Destilada Micelio. Abundancia por tiempo.	53
Figura 42. Metabolito 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-benzopiran-1-one, en tiempo 10.27 minutos.	55
Figura 43. Metabolito (-)-Spatulenol en tiempo 10.65 minutos.	56
Figura 44. Metabolito 13-metil-, (8á,13á)-17-Norkaur-15-ene, en tiempo 10.72 minutos.	56
Figura 45. Metabolito Octacosano en tiempo 17.68 minutos.	56
Figura 46. Metabolito Heptacosano en tiempo 18.49 minutos.	57
Figura 47. Metabolito Heneicosano en tiempo 19.30 minutos.	57

Figura 48. Metabolito 2-metil-1-hexadecanol, en tiempo 20.02 minutos.	57
Figura 49. Metabolito Heptacosano en tiempo 20.80 minutos.	57
Figura 50. Metabolito Octacosano en tiempo 22.37 minutos.	58
Figura 51. Metabolito Tetratetracontano en tiempo 24.55 minutos.	58
Figura 52. Destilada Medio. Abundancia por tiempo.....	58
Figura 53. Metabolito 4- etoxi- Benzaldehido, en tiempo 8.039 minutos.....	61
Figura 54. Metabolito 3-hidroxi-4metox-Benzaldehido, en tiempo 8.33 minutos.	61
Figura 55. Metabolito 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-2-Benzopiran-1-ona, en tiempo 10.23 minutos.	61
Figura 56. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa E. coli.	62
Figura 57. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa S. aureus.	62
Figura 58. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa C. albicans. ...	63
Figura 59. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa P. aeruginosa. ...	63
Figura 60. Gráfico de diferentes propiedades mecánicas de materiales. El círculo que encierra las líneas indica el lugar al cual quedaría el biomaterial obtenido.	66

Resumen

Los hongos son organismos que habitan ambientes marinos y costeros, desempeñando roles importantes en los ecosistemas, como la descomposición de materia orgánica y la formación de simbiosis con otros organismos. Estos hongos poseen características únicas que los vuelven atractivos para la biotecnología, entre los potenciales biotecnológicos de interés para este trabajo de investigación se encuentra la obtención de biomateriales y metabolitos secundarios.

En el trabajo de investigación se evaluará el uso de hongos marinos para la obtención de biomateriales, determinando sus propiedades mecánicas como alternativa al poliestireno expandido, y la obtención de metabolitos con propiedades antimicrobianas, para esto, se aislaron y cultivaron hongos marinos desde sedimentos de la Bahía de Dichato con el fin de obtener bioproductos, de las especies cultivadas e identificadas por morfología y biología molecular se utilizaron dos, la especie *Alternaria sp*, para la formulación de un biomaterial cuya resistencia es fue similar a la del poliestireno expandido, y la especie *Talaromyces flavus*, que fue utilizada para la producción de metabolitos (pigmentos) con actividad antimicrobiana evaluado por *screening*, con actividad contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con importancia en el área biomédica.

Introducción

Los océanos son un conjunto de aguas saladas de la Tierra que son comunicadas entre sí, cubriendo aproximadamente el 71% de la superficie, con una profundidad media de 3800 metros. Tienen influencia en los fenómenos atmosféricos y geológicos debido a la magnitud de la energía en forma de calor y a la cantidad de agua como vapor que entrega a la atmosfera, y del monto de los productos de la erosión que recibe de la tierra como resultado de la acción de los vientos, el escurrimiento y el batir de las olas sobre las orillas (Panzarini, Rodolfo N., 1984).

Sus características principales son la salinidad, temperatura y densidad. La salinidad del agua depende de la diferencia entre la evaporación y la precipitación, otros factores de menor relevancia son el congelamiento y derretimiento de hielo marino. La temperatura es la variable más comúnmente medida. Y la densidad del agua de mar varía entre 1,02 y 1,07 gr/cm³, que es controlada por tres variables que son la salinidad, temperatura y presión, la cual aumenta debido al incremento de la salinidad y presión, y la disminución de temperatura. (Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada (Chile)., 2004)

Organismos y microorganismos del ambiente marino

Los organismos pueden ser clasificados por su modo de locomoción y tipo de hábitat y, por otra parte, taxonómicamente. Según el primer criterio se clasifican en bentos, necton y plancton. El bento corresponde a los organismos asociados al fondo marino, incluyendo las plantas de aguas someras, participan en cambios de algunas propiedades físicas y químicas del sedimento. El necton esta constituido por organismos que son capaces de nadar libremente y poseen la habilidad de buscar comida de forma muy activa, además de evadir a los depredadores y emigrar en la columna de agua. El plancton son organismos pequeños con baja capacidad locomotora, que a su vez son arrastrados por las corrientes marinas. Esta constituido a su vez por zooplancton y fitoplancton. (Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada (Chile)., 2004)

Según el segundo criterio la división es más simple dividiendo por el reino vegetal y animal. En el caso del reino vegetal las plantas marinas se encuentran rodeadas por agua que transporta nutrientes, por lo cual no necesitan un sistema de raíces, exceptuando las plantas de agua someras para su fijación. El reino vegetal puede clasificarse en cuatro divisiones espermatofita (granos y plantas con flores), teridofita (helechos), briofita (musgos) y talofita (algas y hongos). Por otra parte, el reino animal se divide en dos grandes grupos que son los protozoos (organismos unicelulares) y los metazoos (organismos pluricelulares). (Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada (Chile), 2004)

Hongos marinos

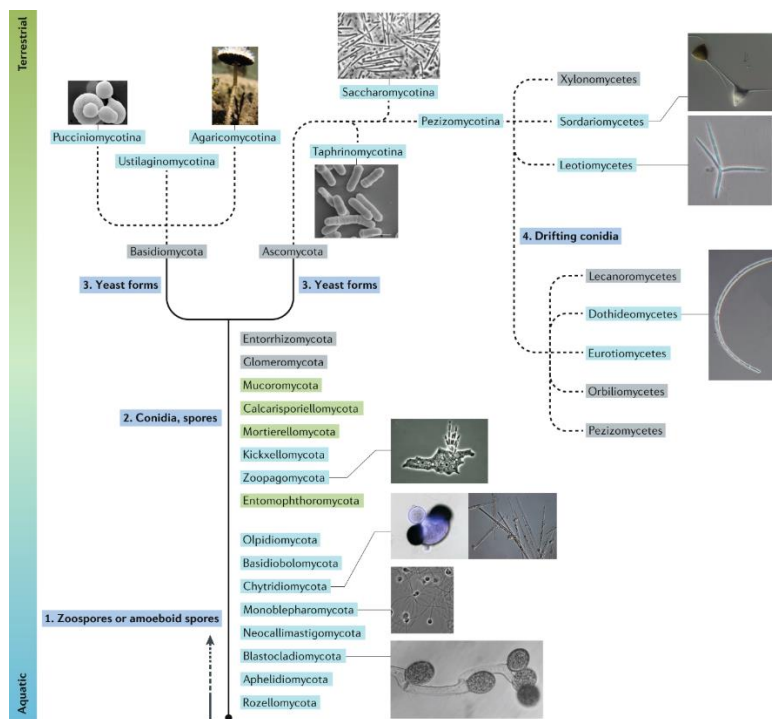


Figura 1: Filogenia de hongos acuáticos (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019))

Las clases filo, subfilo y Pezizomycotina, que contienen hongos acuáticos típicos, se representan en azul. Los primeros linajes divergentes en la base del árbol fúngico tienen un origen acuático y muestran adaptaciones morfológicas en forma de zoosporas o esporas ameboideas que se adaptan a la dispersión en hábitats acuáticos. Muchos de ellos pueden clasificarse dentro del grupo ecológico de los Phycomycetes, asociados como saprófitos o parásitos al polen, macrófitos, algas y fitoplancton. Zoopagomycota y Kickxellomycota incluyen hongos amebófagos y depredadores y Trichomycetes, un grupo ecológico diverso de endosimbiontes obligados en el intestino de muchos insectos acuáticos. Los hifomicetos acuáticos polifiléticos, asociados con hojarasca, macrófitos en descomposición y madera flotante en hábitats marinos y de agua dulce, se encuentran principalmente dentro de Ascomycota y ocasionalmente dentro de Basidiomycota. Lo más probable es que los hifomicetos acuáticos hayan evolucionado a partir de hongos terrestres y adaptaciones morfológicas (por ejemplo, conidiosporas y ascosporas ramificadas y a la deriva con vainas pegajosas) para colonizar hábitats acuáticos y adherirse a sustratos sumergidos. Este grupo también contiene especies que pueden alternar su ciclo de vida entre hábitats acuáticos y terrestres (hongos aeroacuáticos). Se han encontrado varias levaduras unicelulares y hongos similares dentro de Ascomycota y Basidiomycota en ambientes marinos y de agua dulce, que van desde fermentadores biotecnológicos hasta levaduras extremófilas del hielo marino de la Antártida. La mayoría de las especies de Basidiomycota son especies parecidas a levaduras, con la maravillosa excepción del basidiomiceto *Psathyrella acuático*, que degrada la madera, que es la primera especie submarina descubierta con branquias verdaderas. Tenga en cuenta que las líneas discontinuas indican el nivel de subfilo del árbol filogenético, mientras que las líneas continuas marcan el núcleo del árbol fúngico. Los cuadros verdes marcan los filos, que se sospecha que contienen linajes acuáticos, mientras que los cuadros grises muestran linajes terrestres (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019).

Mediante técnicas dependientes de cultivo, se han logrado aislar varios hongos filamentosos y levaduras de numerosos hábitats naturales. Algunos de los géneros predominantes en los ecosistemas acuáticos son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Candida* y *Rhodotorula* (Raghukumar, Damare et al. 2010), los cuales fueron aislados de ecosistemas como el mar profundo, piso submarino, fuentes

hidrotermales, aguas marinas costeras, lagos, hielo, nieve, ecosistemas de agua dulce y salobres.

En el caso de métodos de cultivo independientes confirmo, en algunos casos, que los grupos predominantes determinados mediante las técnicas de cultivo eran de sedimentos marinos, acuíferos y ambientes acuáticos contaminados, algunos linajes de estos hongos son *Rozellomycota* y *Chytridiomycota*, y *LKM11*, *Rhizophyidium* y *Lobulomyces* (Edgcomb, Beaudoin et al. 2011).

Debido a la intervención humana en los ecosistemas terrestres, se fueron generando nuevos ecosistemas acuáticos como alcantarillas, tuberías de agua, sistemas de alcantarillado, plantas de tratamientos de aguas residuales y depósitos para enfriar plantas de energía y almacenar desechos, los cuales son colonizados por microorganismos entre ellos una variedad de hongos (Gilbert and Stephens 2018).

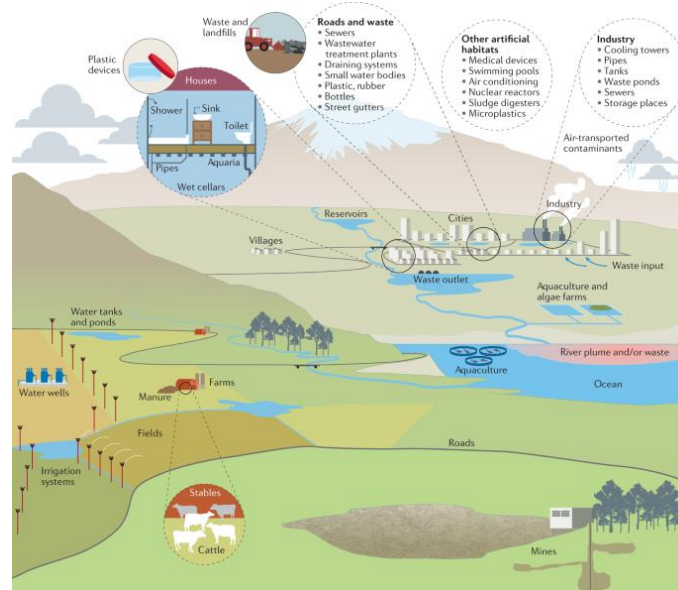


Figura 2 Habitats artificiales para hongos acuáticos. (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019))

El papel ecológico que cumplen los hongos acuáticos es variado, pero destacan tres procesos los cuales son: mycoloop, micoflujo y macrozoobentos. El mycoloop es el proceso mejor descrito el cual se refiere a que los hongos parásitos hacen que el fitoplancton que no es comestible se vuelva comestible para los zooplánctones dependientes de fitoplancton. El micoflujo no ha sido del todo definido, pero describe cualquier interacción fúngica que conduzca a

la agregación o desintegración de materia orgánica. El macrozoobentos puede proporcionar una fuente alimentaria para los niveles tróficos más altos (Senga, Yabe et al. 2018).

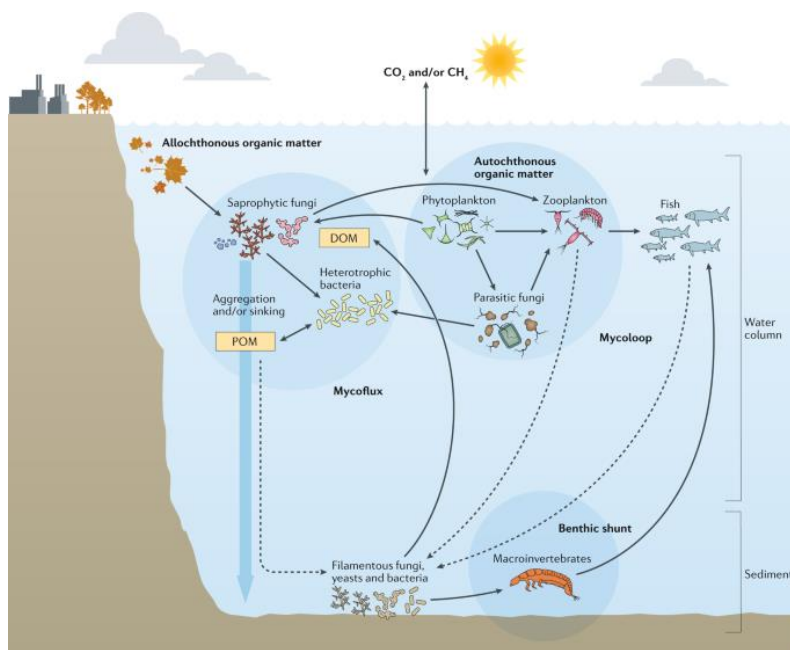


Figura 3 papel ecológico de los hongos acuáticos (extraída de (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019))

Existen dos grupos de hongos marinos, los marinos obligados y marinos facultativos. Los hongos marino-obligados son aquellos que su desarrollo es en hábitats marinos y estuarios, y tienen la capacidad de esporular en el ambiente, en cambio los hongos marinos facultativos provienen de ecosistemas terrestres, pero no tienen la capacidad de esporular en el ambiente (Tamallo Cevallos 2020). Según lo descrito por “Pang et al” (2016), un hongo marino debe establecer una relación simbiótica con organismos marinos y demostrar adaptación genética o ser metabólicamente activo en el ambiente para desarrollarse y esporular. Estos hongos son capaces de sintetizar metabolitos con capacidad antitumoral, inmunomoduladora, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, neuroprotectoras, antidiabéticas y finalmente protectores de la salud ocular y ósea (Fernández et al, 2020).

Hongos marinos filamentosos

Los hongos filamentosos desempeñan un papel fundamental como descomponedores principalmente de sustratos orgánicos, estos organismos se propagan mediante esporas, ya sean conidios asexuales o por ascosporas, basidiósporas o zigosporas sexuales. En los ecosistemas marinos las esporas se dispersan y transportan de manera pasiva a través del agua, aterrizando en el sustrato adecuado para su germinación y colonización (Overy et al, 2019). En la colonización, las hifas crecen por todo el sustrato formando una red de micelio, al momento de que se presenten las condiciones ambientales ideales, serán capaces de diferenciarse sus estructuras especializadas para la reproducción. Los hongos marinos pueden tener diferentes aplicaciones contrarrestando problemas ambientales como sustitutos a sustancias o materiales altamente contaminantes.

En la **Figura 4**, extraída de “Overy et al, 2019”, es posible observar estructuras fructíferas, como picnidios o ascomas y conidióforos.



Figura 4. Estructuras fructíferas de hongos marinos: (a) Amylocarpus encephaloides es una de las pocas especies de hongos marinos que pueden observarse e identificarse a simple vista ya en el campo; (b) estos “puntos negros” en el receptáculo de la macroalga Ascophyllum nodosum son cuerpos fructíferos de Stigmatidium ascophylli (Mycosphaerella/ especies de bivalvos. Xylophaga), en un pozo realizado por una Zalerion

maritima (=Lulwoana uniseptata) masa conidial de la forma asexual del hongo, **d**; (sobre muertos y en descomposición Calycina marina) cuerpos fructíferos apotéticos de **c**); (Mycophycias ascophylli)

Poliestireno expandido: problema de gran contaminación

El poliestireno expandido procede del petróleo, del cual se obtiene el monómero estireno son moléculas orgánicas que a su vez conforman a polímeros sintéticos como el poliestireno, nylon, entre otros (López and Cánepa 2013). Este se polimeriza empleando agua y un agente expansor que produce el EPS, el cual es utilizado en embalaje, transporte de alimentos y construcción, pero que a su vez es un material químicamente inerte, no biodegradable, el cual afecta al ambiente ya que no puede ser reciclado. Si bien es altamente higiénico, no se descompone, no genera moho, ni se pudre, lo que lo vuelve atractivo para su uso, ya que sirve además como material aislante de calor y frío, pero su desventaja es que solo puede utilizarse una vez (López and Cánepa 2013).

El daño ambiental que se ha generado en Chile según noticia del diario “elmostrador” (elmostrador, 2019) indica que hasta el año 2019 cuando se registró en la revista el artículo los desechos de al año es cercano a 360 millones de toneladas, donde el estimado es de 60 millones en productos de trabajos industriales y los 300 millones restantes de uso personal y doméstico. Además, en el país no hay un tratamiento de reutilización y/o reciclaje de este.

En varios países cuando son desechados caen a los ecosistemas marinos, contaminando el agua, afectando la macro y microfauna marina ya que pueden asociar estos desechos con alimento. También es perjudicial para la salud humana ya que el consumir alimentos calientes que son envasados en este material que a su vez se consumen dioxinas (Cruz Carrillo, Moreno Figueredo et al. 2010) las cuales afectan el sistema inmune, siendo una de las posibles enfermedades a contraer por el consumo de Aislapol es cáncer.

Debido al aumento de contaminación por materiales no biodegradables como derivados de petróleo o plásticos es considerado un problema mundial por la toxicidad para el ecosistema y seres humanos. Esto ha generado una necesidad y desafío para la obtención de nuevos materiales sustentables (*Eco-*

friendly), biodegradables y sin impacto en el medioambiente. Estas innovaciones tecnológicas son clave en la transición y el desarrollo hacia una economía circular (Meyer, Basenko et al. 2020). {Meyer, 2020 #1}

Micelio de hongos para obtención de un biomaterial

El micelio es definido como la estructura vegetativa de los hongos y consiste en una red de filamentos delgados y ramificados llamados hifas (Susel, Domínguez et al. 2021). Esta estructura es responsable de la absorción de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica. Además, el micelio de los hongos ofrece una perspectiva prometedora para la obtención de biomateriales, ya que tiene la capacidad de crecer y colonizar diversos sustratos orgánicos, formando estructuras resistentes y sólidas con propiedades como materiales alternativos a los existentes (Elsacker, Vandeloek et al. 2019).

Los biomateriales de hongos o BMM (base mycelium material) se definen como materiales biocompatibles producidos total o parcialmente a partir de materias primas como madera y otros sustratos especiales, como la lignocelulosa y el caucho natural, entre otras (Susel, Domínguez et al. 2021). Estos biomateriales son versátiles y encuentran aplicaciones en diversas áreas como la medicina, farmacología, alimentación, industria automotriz, textil y construcción (Meyer, Basenko et al. 2020). Su uso principal es en envases de alimentos y sus características dependen de las aplicaciones donde se utilizarán. La relevancia de estos es su menor impacto ambiental, ya que pueden completamente ser degradados, contribuyendo así a la disminución de la contaminación. La producción de estos materiales se han generado principalmente con especies de hongos filamentosos descomponedores de madera como *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma sp*, entre otros (Cerimi, Akkaya et al. 2019) y presentan propiedades fisicoquímicas específicas como resistencia, aislación térmica y acústica, elasticidad. Que los hace excelentes sustitutos para materiales sintéticos como plásticos y otros (Appels et al, 2019, Elsacker et al, 2019). Un estudio realizado por Sun, 2019 (Sun, Tajvidi et al. 2019) logró optimizar las propiedades físicas y mecánicas de un material compuesto por micelio y fibras de madera con un alto potencial para uso en embalaje y en la fabricación de muebles.

La **Figura 5**, extraída de “Alemu et al, 2022” ilustra el proceso de obtención de los biomateriales a base de micelio, donde se evalúa su desarrollo

mediante parámetros fisicoquímicos como la prueba de pH, contenido de materia orgánica, contenido de agua y morfología de la superficie del micelio. Durante el desarrollo del micelio fúngico que se ha desarrollado disminuye el nivel de pH y materia orgánica total, lo que se debe a la digestión enzimática, mientras que la cantidad de nitrógeno y agua aumenta a medida que este se desarrolla (Attias, Danai et al. 2017).

El micelio posee la capacidad de transformarse en un material denso en un molde para formar diferentes elementos ya que, se puede adaptar al sustrato y crear diferentes estructuras o nuevos objetos de diseño ((Elkhateeb and Daba 2019), (Galena et al., 2021)). Una vez que se alcanzan las características deseadas, se detiene el crecimiento, mediante secado y/o calentando el sustrato colonizado. Este incremento de temperatura desactiva el crecimiento del hongo de forma permanente (Girometta, Picco et al. 2019).

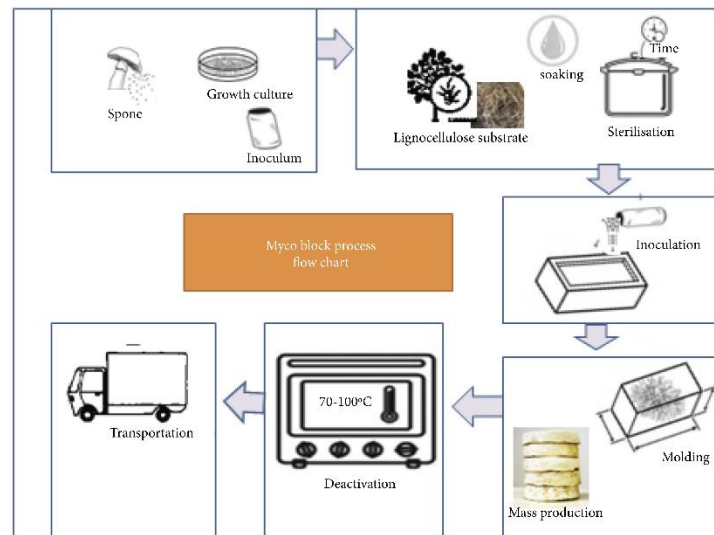


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra la producción de compuestos a base de micelio. (Alemu, Tafesse et al. 2022). Se procede a la recolección y aislamiento del hongo filamentoso, el sustrato tiene un proceso de esterilización por un tiempo determinado, para su posterior inoculación y moldeado, y secado a temperaturas entre 70° a 100°C, para la obtención del biomaterial final.

En la **Tabla 1** extraída de “Alemu et al, 2022” se presenta un estudio comparativo entre el material a base de micelio y el utilizado actualmente en términos de densidad, resistencia, costo, reciclabilidad, persistencia, entre otros. Los resultados demuestran que los compuestos obtenidos a base de micelio son poco densos y de bajo costo, reciclables y que pueden ser obtenidos con materias primas disponibles localmente y/o con desechos orgánicos.

Tabla 1. Comparación de productos a base de micelio vs materiales poliméricos. (Alemu, Tafesse et al. 2022)

Propiedad material	Materiales a base de micelio	Materiales poliméricos
Densidad (kg/m ³)	110+- 0,01 a 330+- 0,05	22 a 30
Costo(\$/kg)	0,07-0,17 (horas)	2,1-2,3 (horas)
Costo(\$/m ³)	19.05	-
Resistencia a la compresión (kPa)	360+- 5 a 520 +-8	69-400
Absorción de agua (%)	200	6,9
Reciclabilidad	Totalmente degradable	Décadas, siglo
Materias primas	Micelio y residuos o sustratos orgánicos	Polímeros y gases naturales
Proceso de manufactura	Moldear y crecer	Polimerización y expansión

(Tabla modificada a partir de cita bibliográfica)

Metabolitos secundarios activos en hongos marinos

Los metabolitos secundarios activos basados en microorganismos marinos son considerados área de interés debido a que muchos de sus compuestos son agentes antibacterianos, antifúngicos, antialgales, antitumorales, entre otros (Bajpai 2016). Entre los metabolitos presentes en los hongos marinos se encuentran los compuestos coloreados y/o pigmentos los cuales ecológicamente tienen un papel importante a la hora de dar resistencia a diversos factores ambientales o interacciones ecológicas con otros organismos, por esta razón muchos de los metabolitos secundarios de hongos muestran actividades biológicas que son de interés para las industrias farmacéutica, alimentaria y agroquímica (Fouillaud, Venkatachalam et al. 2017).

Pigmentos sintéticos

En la actualidad, la contaminación de los sistemas acuáticos es un fenómeno mundial que afecta mayoritariamente a los países en desarrollo, como consecuencia del vertimiento de aguas residuales sin tratamientos o parcialmente tratadas. Entre las mayores preocupaciones por vertimiento de

aguas residuales con pigmentos se destaca la toxicidad generada, así como los impactos estéticos negativos sobre organismos acuáticos, como el fitoplancton, que son la base de productores primarios que garantizan los flujos de energía a niveles tróficos superiores (Sharma, Sharma et al. 2007).

Más de diez mil pigmentos y/o colorantes sintéticos son utilizados en diferentes industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica, entre otras, muchas de estas actividades industriales liberan grandes volúmenes de efluentes contaminados con dichos pigmentos y/o colorantes al medio ambiente (Martínez, Olivares et al. 2014).

Por esto las industrias alimentarias, farmacéuticas, cosméticas y textiles están buscando alternativas naturales a los pigmentos sintéticos. Especialmente la industria alimentaria se ha visto presionada por la incorporación de colorantes y/o pigmentos naturales en respuesta a las preocupaciones de los consumidores respecto a productos más sostenibles y saludables. Esto está asociado con las implicaciones negativas a la salud por el uso de colorantes y/o pigmentos sintéticos en los snacks y bebidas (Sezgin, Ayyıldız et al. 2017).

Pigmentos fúngicos de hongos marinos

Los pigmentos naturales son pigmentos de origen natural sintetizados principalmente por plantas, animales y microbios (Chattopadhyay, Chatterjee et al. 2008). Debido a la demanda por la obtención de pigmentos derivados de plantas de temporada y/o que puedan estar en peligro de extinción se optó por utilizar microorganismos, incluidas las bacterias, los hongos y las algas (Dufossé 2006).

Los pigmentos fúngicos tienen varias propiedades, como actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígenas y citotóxicas, además sus atributos colorantes (Caro, Venkatachalam et al. 2017).

- Pigmentos fúngicos como colorantes alimenticios: como los pigmentos *Monascus*, el rojo arpink de *P. oxalicum*, la riboflavina de *Ashbya gossypii* y el β -caroteno de *B. trispora* (Sen, Barrow et al. 2019).
- Pigmentos fúngicos como agentes antimicrobianos: desde ciertas especies de géneros de hongos (*Monascus*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Asper*

gillus) y la levadura *R. glutinis* se ha descubierto que poseen actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias patógenas, así como hongos y levaduras. Lo que sugieren los estudios es el potencial uso de estos pigmentos bioactivos como conservantes de alimentos o como ingredientes antibacterianos en las industrias alimentarias y farmacéuticas (Mani, Priya et al. 2015) (Frandsen, Rasmussen et al. 2016). Al igual que la posibilidad de ser utilizados para el uso en elaboración de productos para el área médica, como vendajes, hilos de sutura, mascarillas faciales, entre otros (Poorniammal, Parthiban et al. 2013).

- Pigmentos fúngicos como agentes antioxidantes: los pigmentos microbianos carotenoides, la violaceína y las naftoquinonas tienen propiedades antioxidantes (Ramesh, Vinithkumar et al. 2019). Además se ha mencionado en estudios que ciertos hongos y levaduras tienen propiedades antioxidantes, como *Penicillium* (*P. miczynskii*, *P. purpureogenum*, *P. purpuroscens*, *Penicillium* sp.), *Fusarium* sp., *Thermomyces* sp., *Chaetomium* sp., *Sanghuangporus baumii*, *Stemphylium lycopersici* y especies de *Trichoderma* (*T. afroharzianum*, *Trichoderma* spp.) (Mani, Priya et al. 2015) (Li, Xue et al. 2017), confirmando su potencial uso en la industria de la salud.
- Pigmentos fúngicos como agentes citotóxicos: se ha evaluado la actividad citotóxica de ciertos aislados fúngicos (*F. oxysporum*, *T. verruculosus* y *Chaetomium* spp.), por diferentes métodos lo que confirma la posible aplicación de pigmentos en diferentes industrias, especialmente en la salud y farmacéutica (Rao, Xiao et al. 2017). En el caso de estudios de la toxicidad dérmica de *Thermomyces* spp. y *P. purpureogenum* en ratas de Wistar ha revelado la naturaleza no tóxica de los pigmentos y la posible aplicación en cosméticos y teñidos (Poorniammal, Prabhu et al. 2019).
- Pigmentos fúngicos como agentes anticancerígenos: es sabido que los pigmentos fúngicos tienen propiedades anticancerígenas/antitumorales, diversos estudios avalan que los pigmentos fúngicos pueden ser fármacos anticancerígenos. Algunas especies son *Monascus purpureus* y *Monascus pilosus* los pigmentos obtenidos monascina, ankaflavina, monafilona A-B, monasfilona A-B, monapilol A-D y monapurona A-C poseen potencial anticancerígeno en diversos tipos de cáncer como carcinoma de piel de ratón, carcinoma laríngeo humano,

adenocarcinoma de colon humano, carcinoma hepatocelular humano y adenocarcinoma pulmonar (Feng, Wu et al. 2010).

Pregunta de investigación

¿Es posible que los hongos marinos, al igual que los hongos terrestres, puedan desarrollar bioproductos para diferentes aplicaciones como biomateriales y metabolitos activos?

Hipótesis

Hipótesis 1: Los hongos marinos tienen la capacidad de producir biomateriales para sustituir al poliestireno expandido.

Hipótesis 2: Los hongos marinos tienen la capacidad de producir metabolitos (pigmentos) con propiedades antimicrobianas.

Objetivo general

Evaluar el uso de hongos marinos para la obtención de bioproductos como biomateriales, determinando su funcionalidad como alternativa al poliestireno expandido, y metabolitos (pigmentos) con propiedades antimicrobianas.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Aislamiento de hongos desde sedimentos marinos provenientes de la bahía de Dichato, Región del Biobío, Chile.

Objetivo específico 2: Identificación morfológica y molecular de los aislados por amplificación del Espacio Interno transcrito (ITS) y posterior secuenciación.

Objetivo específico 3: Obtención de biomasa fúngica a partir del cultivo en medio líquido para la obtención de los prototipos de un biomaterial.

Objetivo específico 4: Obtener un cultivo de una cepa de hongo en medio líquido para la obtención de metabolitos (pigmentos) con actividad antimicrobiana.

Metodología

Aislamiento y cultivo de hongos marinos

En primera instancia se realizó el medio de cultivo sólido estándar, para comprobar que tan efectivo era el aislamiento de hongos marinos y su posible crecimiento, este medio está compuesto por el Gelificante Agar agar al 2%, Extracto de malta al 2% y agua destilada hasta aforar. Se hicieron 700 ml de medio en donde se añadieron 14 gr de Agar agar y 14 gr de Extracto de Malta. De este medio se obtuvieron 24 placas Petri.

Se procedió 24 horas después de la refrigeración de las placas con medio a aislaron 3 muestras de sedimentos marinos de la Bahía de Dichato, Región del Biobío y se cultivó 5 muestras aisladas pertenecientes al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Concepción.

Tabla 2. Medio de cultivo estándar.

Compuesto	Cantidad
Agar-agar	14 gr
MEA 2%	14 gr
H2O	hasta aforar 700 ml

Se realizó un segundo medio el cual está compuesto por el Gelificante Agar agar al 2%, Extracto de Malta al 2%, un antibiotico Estreptomicina y agua de mar extraída de la caleta Cocholgue, Tomé, Región del Biobío (25 de marzo, 2024). Nuevamente se realizaron 700 ml de medio, se añadió 140 microgramos de Estreptomicina al medio en estado líquido antes de ser depositado en las placas Petri.

Tabla 3. Medio de cultivo adaptado a hongos marinos.

Compuesto	Cantidad
Agar-agar	14 gr
MEA 2%	14 gr
H2O mar	hasta aforar 700 ml
Estreptomicina	140 µg

Además se realizó un tercer medio compuesto por el Gelificante Agar agar al 2%, Glucosa al 1%, Estreptomicina 140 microgramos y se aforó con agua de mar hasta los 700 ml.

Tabla 4. Medio de cultivo adaptado para hongos marinos.

Compuesto	Cantidad
Agar-agar	14 gr
Glucosa 1%	14 gr
H2O mar	hasta aforar 700 ml
Estreptomicina	140 µg

- Se realizó una observación de las placas en cultivo para determinar su morfología. Esto se hizo con todas las placas con el propósito de determinar cuáles son los hongos presentes en la Bahía de Dichato de donde provienen las muestras.

Se realizaron cultivos líquidos en 2 matraces los cuales contenían 5gr de Extracto de Malta y 500 ml de Agua de mar.

Para las réplicas de los cultivos en placas se hizo un medio de cultivo de 1% de Extracto de Malta, Agar 2% con Agua de mar.

Tabla 5. Medio de cultivo para replicar los cultivos ya aislados.

Compuesto	Cantidad
H2O mar	aforar a 600ml
Agar-agar 2%	12 gr
Malta 1%	6 Gr

Extracción y secuenciación

Extracción de ADN y amplificación de ADN

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo a partir de micelio de los hongos marinos aislados, utilizando la metodología de CTAB (Doyle & Doyle., 1990). En resumen, se pesaron la muestra entre 30-50 mg, se añadió 500 µl buffer y se molió hasta quedar homogéneo, se centrifugo a 13000 rpm por 1 minuto, se extrajo el sobrenadante entre 350-400 µl y se añadió Isopropanol 400 µl, se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo por 5 minutos a 13000 rpm, luego se descartó el sobrenadante, se agregó 500 µl etanol 70%, se centrifugo por 5 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante, se dejó secar en ambiente y se resuspendio en agua Nanopure en 100 µl.

Para la amplificación de la región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS), se empleó los partidores (ITS1F-ITS4), descritos por (White et al, 1990).

Secuenciación del producto de PCR.

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados directamente a la empresa Macrogen para su secuenciación. Posteriormente, se evaluó la identidad y cobertura con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, usando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) disponible en el sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Inoculación, diseño molde y secado biomaterial

Inoculación en sustrato sólido

Para esto se tomaron muestras de 10 ml de los cultivos líquidos de la cepa de hongo, las muestras serán colocadas en una placa Petri con paja, madera de pino radiata y hojas de té reutilizadas. Se debió asegurar de tomar una buena cantidad de micelio para que el crecimiento dentro de la placa sea favorable. Se realizó en 3 placas para asegurar éxito en el crecimiento del micelio, las placas se incubaron a 25°C y se dejaron hasta el crecimiento del hongo sobre el sustrato. (Furci George-Nascimento).

Se planteó las cantidades óptimas de cada sustrato para la realización del crecimiento del micelio.

Tabla 6. Tratamiento de inoculación de sustrato solido en porcentaje.

Tratamiento (%)	Hojas de té	Paja	Aserrin de Madera Pino radiata
1	50%	10%	40%
2	10%	70%	20%

Tabla 7. Tratamiento de inoculación de sustrato solido en gramos.

Tratamiento (gr)	Hojas de té	Paja	Aserrin de Madera Pino radiata
1	10	2	8
2	2	14	4

Diseño del molde

Para la fabricación del biomaterial a base de micelio, se necesitaron el molde correspondiente a la forma que se requiera, el sustrato obtenido del punto anterior será puesto sobre el molde (placa de Petri) y se dejó en incubación a 25°C por aproximadamente 10 días o hasta colonizar completamente el sustrato. Es recomendado utilizar contenedores plásticos o de fácil manipulación (Furci George-Nascimento).

Incubación y secado

El sustrato colonizado se desmoldo y coloco dentro de un contenedor hermético más grande o directamente dentro de la incubadora, controlando las condiciones ambientales y en ambiente estéril. Nuevamente se dejará crecer el micelio durante 7 días aproximadamente, dependiendo del hongo utilizado. En la última etapa la pieza obtenida se secará en un horno convencional, dejándolo a 120°C por 30 minutos, esto se realizará para que la cepa del hongo ocupada se desactive, impidiendo su posterior crecimiento (Furci George-Nascimento).

Prueba de resistencia

Las Propiedades mecánicas se midieron con una prueba de compresión de 1 ciclo utilizando una prensa estática de compresión, a una velocidad de 1 mm/s, determinando el esfuerzo máximo en kgf/mm² soportado por el material antes de la ruptura. El material fue cortado en cilindros de 30 mm de diámetro por 10 mm de altura.

Cultivo de hongos marinos en medio líquido para obtención de pigmentos y posterior análisis

Cultivo en medio líquido

Se utilizo un matraz Erlenmeyer de 1000ml el cual fue esterilizado junto con el medio agregado por 20 minutos en autoclave. Esto se dejó fermentar por un mes para esperar crecimiento del hongo.

Tabla 8. Medio de cultivo para cultivo líquido con agua de mar.

Compuesto	Cantidad
H ₂ O mar	aforar a 500ml
Malta 1%	5 gr

Tabla 9. Medio de cultivo para cultivo liquido con agua destilada.

Compuesto	Cantidad
H ₂ O destilada	aforar a 500ml
Malta 1%	5 gr

Extracción

Se procedió a filtrar el medio de cultivo de la cepa de Hongo (identificado como “P”) con agua destilada, así como la misma cepa, pero en agua de mar con Bomba de vacío y papel filtro de 7µm. El papel filtro con la biomasa acumulada se traspasó a un matraz de 50 ml, el que se llevó a ultrasonido para extraer con 10 ml de acetona durante 30 minutos.

El medio líquido filtrado (500ml) se traspasó a un embudo de decantación de 1000ml, para extraer con 2 alícuotas de 20ml de Diclorometano cada una y posteriormente otra extracción con Acetato de etilo en alícuotas de 20 y 10 ml cada una.

Proceso de secado en rotavapor

Las muestras obtenidas posterior al tiempo transcurrido se procedieron a secar en rotavapor a 40°C y se resuspendieron en 2ml de acetato de etilo, 300 µL de las muestras fueron añadidos a viales. Para proceder a analizar en cromatógrafo de masa (Fouillaud, Venkatachalam et al. 2017).

GC-MS

El análisis de los extractos obtenidos se realizó mediante cromatografía de gas con detección de masas. Para ello se empleó una columna cromatográfica J&W scientific de 30 m de largo y 0,5 mm de diámetro, con 2 µm de espesor de film de polaridad intermedia. Se utilizó Helio como gas de arrastre a un flujo de 1 ml por minuto.

Se analizó 1µm de cada muestra mediante inyección automática. La configuración de temperaturas del horno y detector se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Configuración del método cromatográfico.

Equipo	Temperatura	Tiempo
Horno	100°C	5min
(incremento de 10°C/min)	280°C	20min
Inyector	250°C	
Detector	285°C	

Preparación de muestras para ensayo de actividad antimicrobiana

Con el fin de conocer el peso de los extractos, tanto de medio líquido como de micelio, se procedió a secar las muestras en viales en viales previamente tarados como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Pesos secos de extractos.

N° viales	Peso de viales (gr)	Peso de viales etiquetados (gr)	Peso con extracto seco (gr)	Diferencia en gr	Diferencia en ug	Concentración en g/L
1	2,3807	2,4084	2,4092	0,0008	800	8
2	2,3808	2,4079	2,4087	0,0008	800	8
3	2,3818	2,4092	2,4103	0,0011	1100	11
4	2,3991	2,4264	2,4354	0,009	9000	90

Pruebas de actividad antimicrobiana

Reactivos:

- Placas agar Muller-Hinton
- Placas agar Sabouraud
- Suero fisiológico
- Compuesto a evaluar (20µl por pocillo por cepa a evaluar)
- DMSO 10%

Tabla 12. Cepas de microorganismos ensayados con interés biomédico.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Gram (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	

Los metabolitos de hongos se solubilizaron en 100 µl de DMSO al 10%, para realizar un *screening* de concentración bioactiva. Para ello se sembró 20 µl de cada compuesto en los micropocillos de cada placa de microorganismo ensayada.

Este ensayo se realizó bajo el siguiente protocolo:

1. Planificación de la cantidad de placas a utilizar según el N° de cepas a evaluar (4) y el número de compuestos. Se debe incluir control negativo (pocillo con solvente en el que está diluido el compuesto).
2. Con un sacabocado y condiciones de esterilidad (bajo mechero) se preparan los micropocillos según la planificación.
3. A partir de placas ensayadas entre 16-18 horas con las cepas, se realizó una prueba McFarland 0,5 (en suero fisiológico).
4. Se siembra en tapiz en las placas preparadas con los micropocillos.
5. Se dispone un volumen 20 ul (aproximado) del compuesto más el control negativo por cada micropocillo.
6. Finalmente, se incuba a 37°C por 24 horas.

Resultados

Fotografías aislamiento de hongos marinos en medio sólido

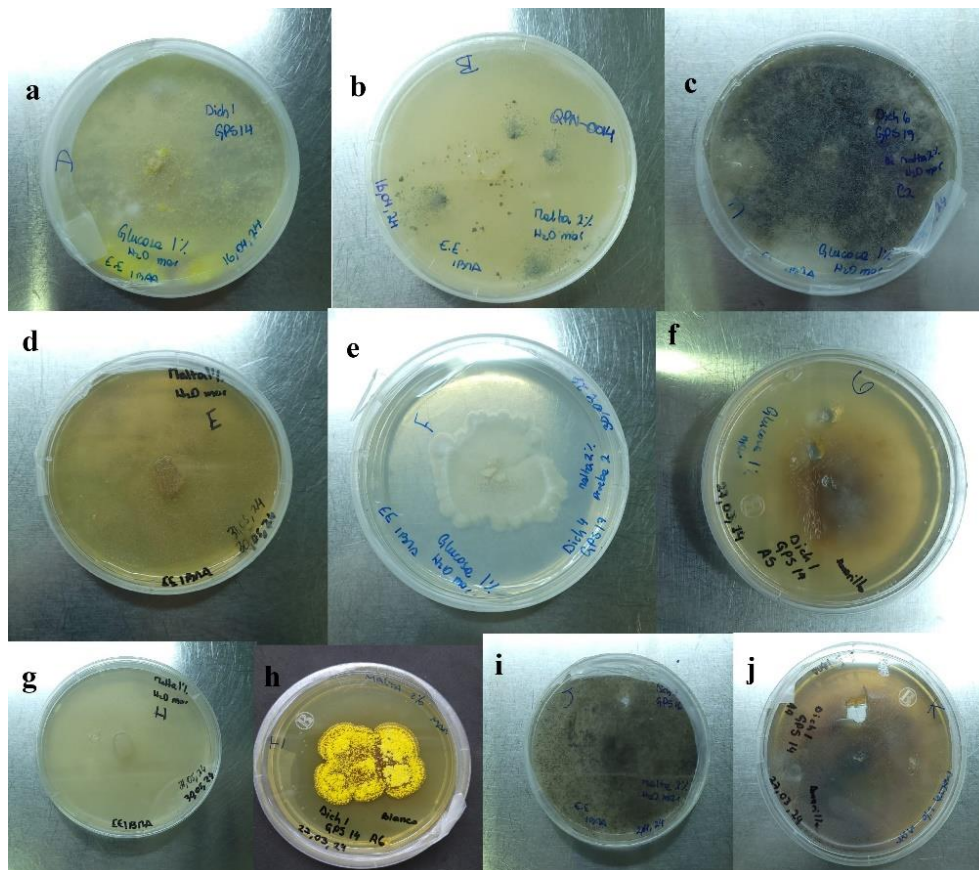


Figura 6. Hongos cultivados en placas. En a, b, c, d, e, f, g, h, i y j se observan las placas cultivadas ya aisladas de sedimentos marinos, con letras asignadas para diferenciar cada hongo.

Amplificación en gel de agarosa

De las 11 muestras de hongos marinos cultivados, 3 de estas no tuvieron amplificación.

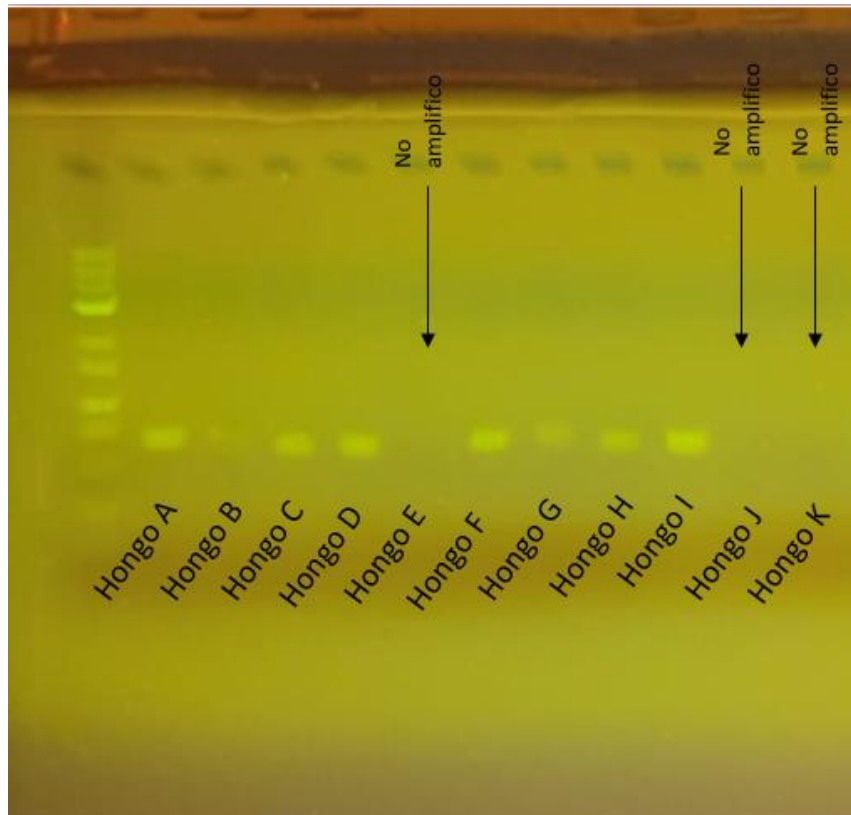


Figura 7. Se puede observar la amplificación de las 11 muestras de los hongos cultivados.

Secuenciación del producto por PCR

Tabla 13. Secuenciación del producto PCR.

Muestra	GenBank	Identidad Blast (%)	N° Acceso	N° Bases	Potencial aplicación
A	Cadophora sp.	99.61	<u>MH029121.1</u>	522	Producción de metabolitos antifúngicos (Wang, Shen et al. 2019).
B	Penicillium sp.	91.13	<u>MF077227.1</u>	286	Producción de antibióticos (Brian, Hemming et al. 1953).
C	Alternaria sp.	99.56	<u>MT420650.1</u>	451	Producción de metabolitos citotóxicos, posibles inhibidores de quinasas (Aly, Edrada-Ebel et al. 2008).
D	Talaromyces flavus.	99.36	<u>MH855968.1</u>	474	Producción de metabolitos activos (Kim, Fravel et al. 1988).
F	Talaromyces sp.	99.79	<u>KU556530.1</u>	491	Producción de pigmentos (Kim, Fravel et al. 1988).
G	Cadophora sp.	99.42	<u>OP412813.1</u>	520	Producción de metabolitos antifúngicos (Wang, Shen et al. 2019).
H	Indeterminada	----	-----	0	--
I	Talaromyces flavus.	99.56	<u>MH855968.1</u>	463	Producción de metabolitos activos

					(Kim, Fravel et al. 1988).
--	--	--	--	--	----------------------------

Muestras E, J y K no amplificaron por lo tanto no se pudieron secuenciar.

Fotografía de cultivos líquidos

- Hongo *Alternaria sp*

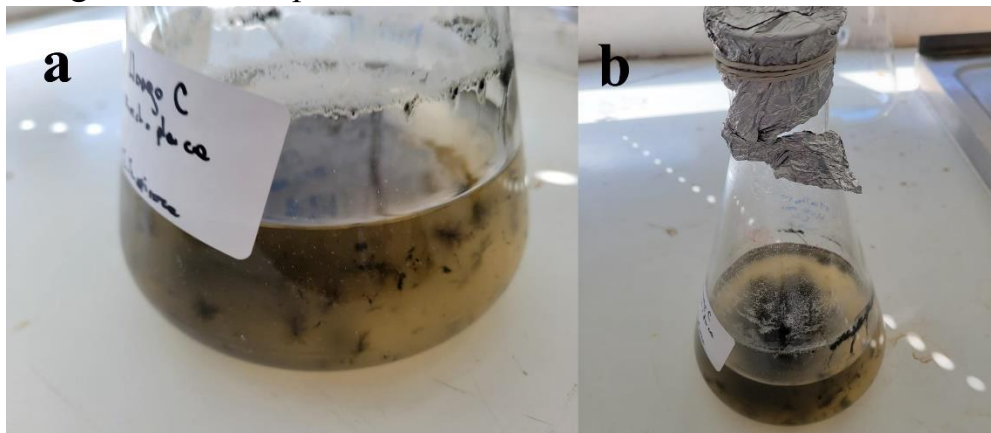


Figura 8. Hongo *Alternaria sp.* (C) Cultivo medio líquido. Incubación en agitación con medio líquido compuesto de Agua de Mar y Extracto de Malta al 2%. En el cual es posible observar esporulación y micelio por todo el cultivo.

- Hongo *Talaromyces sp.*



Figura 9. Hongo *Talaromyces sp.* Cultivo en medio líquido y incubado en agitación con una coloración de color amarillo.

- Hongo *Talaromyces sp replica*

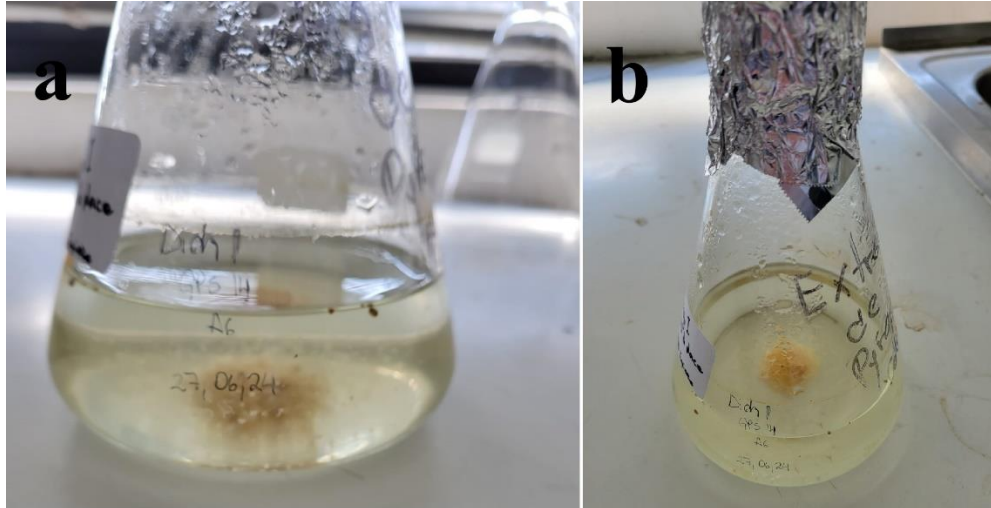


Figura 10. Hongo *Talaromyces sp replica*. Cultivo medio líquido. Incubado en agitación, esporulado y con baja coloración.

Fotografías microscopio óptico

En este caso para observar las esporas y/o micelio, se añadió una gota de medio KHO3.

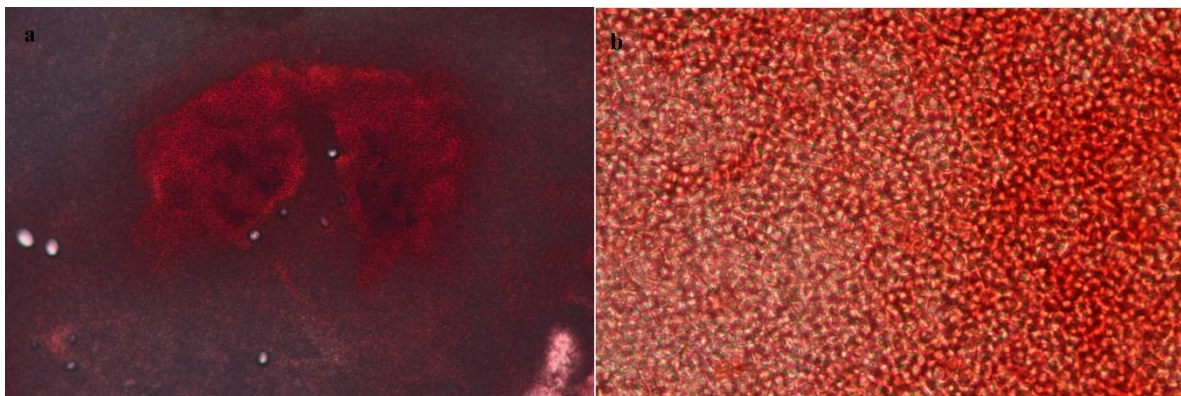


Figura 11. Hongo *Cadophora sp.*, observado a 10x y 100x, es posible observar en **a** y **b** si hubo crecimiento de esporas del hongo cultivado, el hongo en placa

tiene una coloración amarilla, pero al ocupar el medio KHO3 su coloración cambio a rojiza.

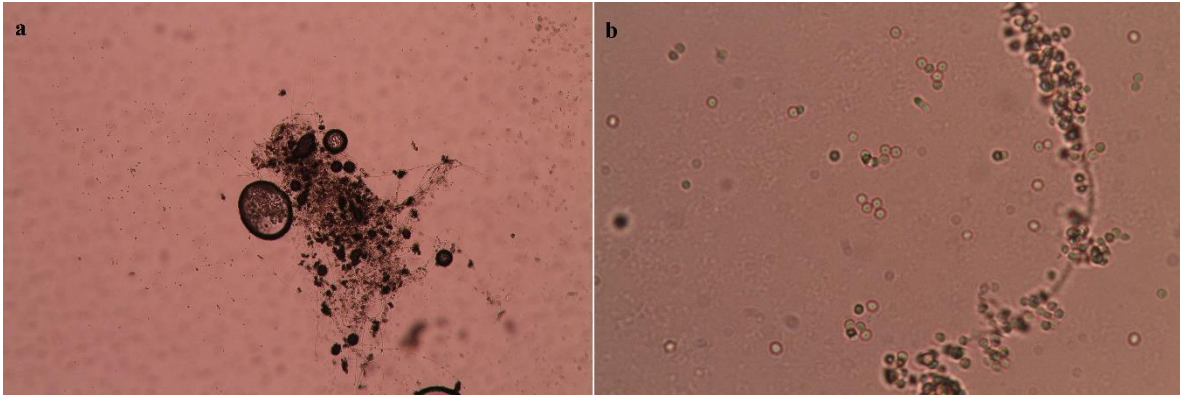


Figura 12. Hongo Penicillium sp., observado a 10x y 100x, es posible advertir las esporas de una coloración verdosa.

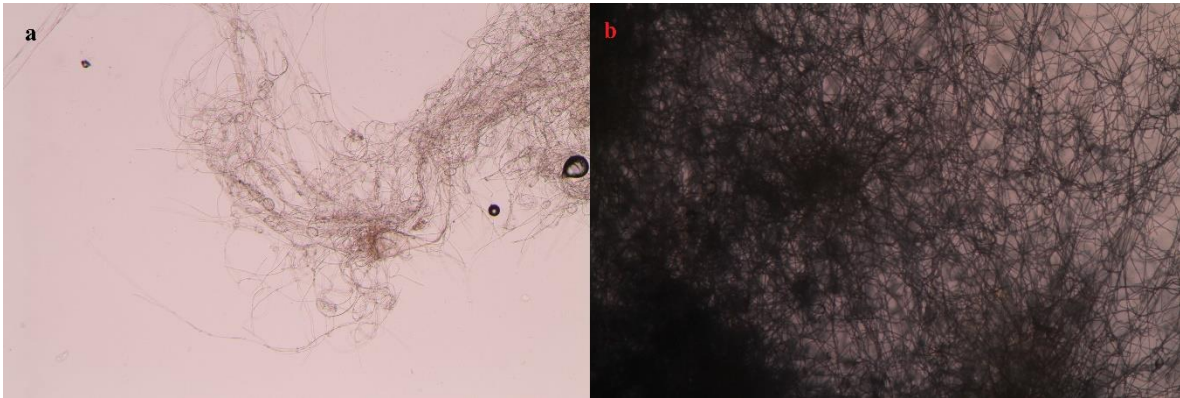


Figura 13. Hongo Alternaria sp., observado a 10x y 100x, es posible observar el micelio de color oscuro con hifas finas.

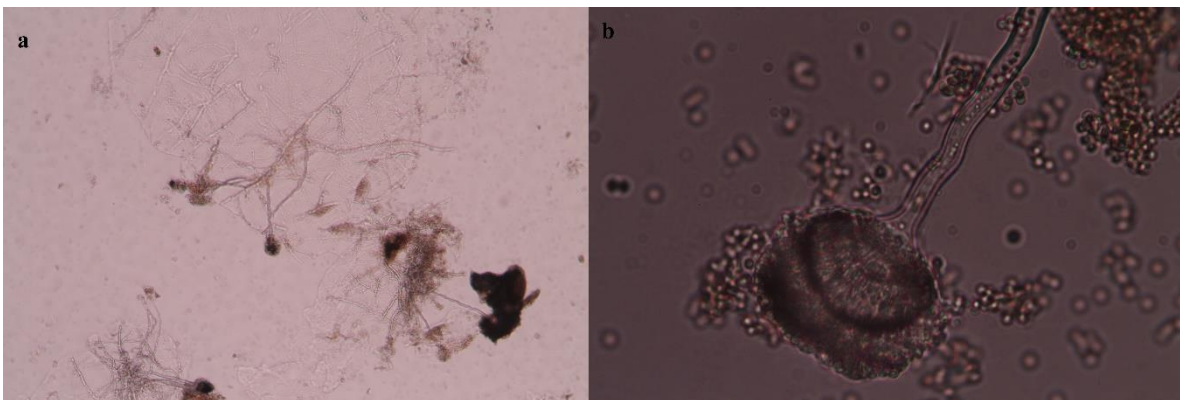


Figura 14. Hongo No identificado (E), observado a 10x y 100x, es posible observar tanto esporas como micelio, además de estructuras reproductivas b.

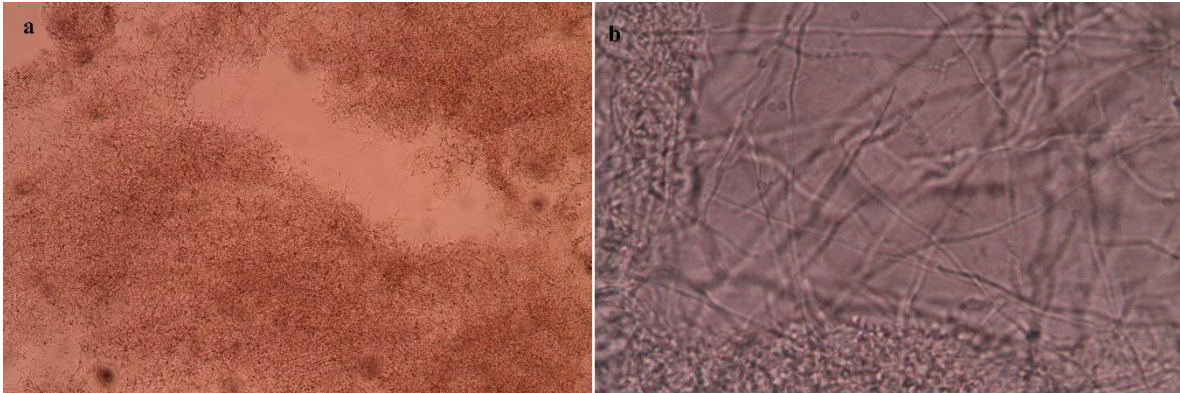


Figura 15. Hongo Talaromyces sp., observado a 10x y 100x, es posible observar en a esporas, y en b esporas y micelio.

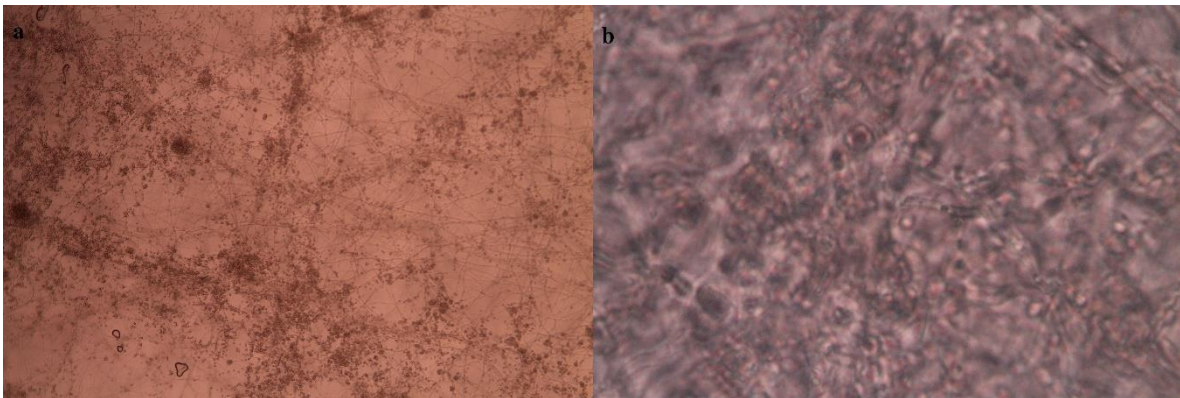
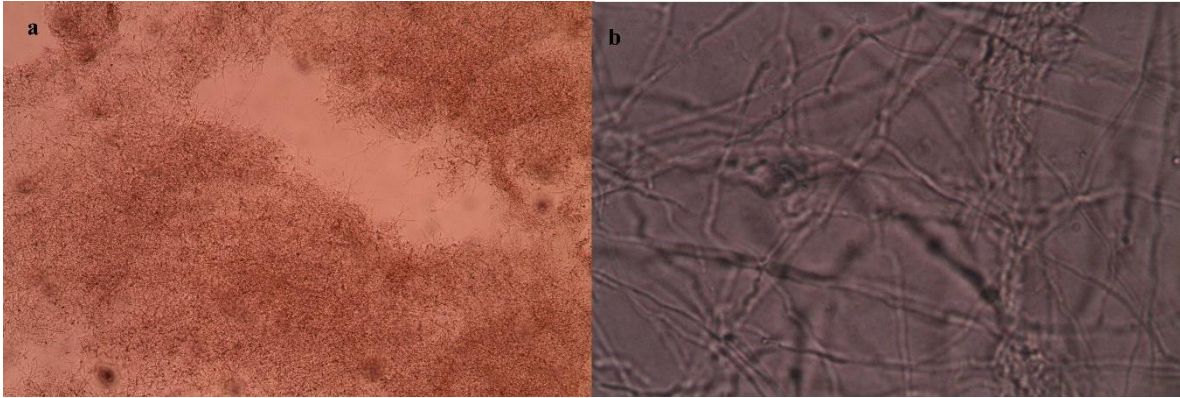
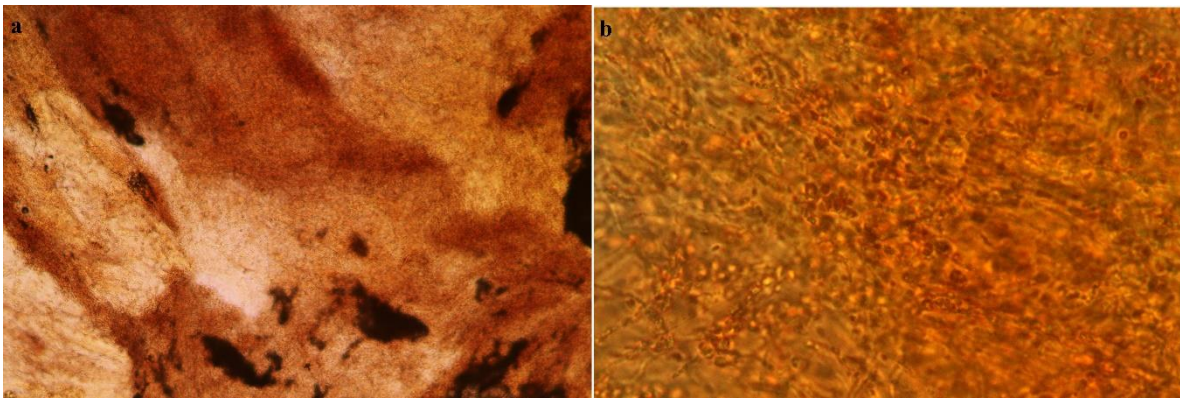


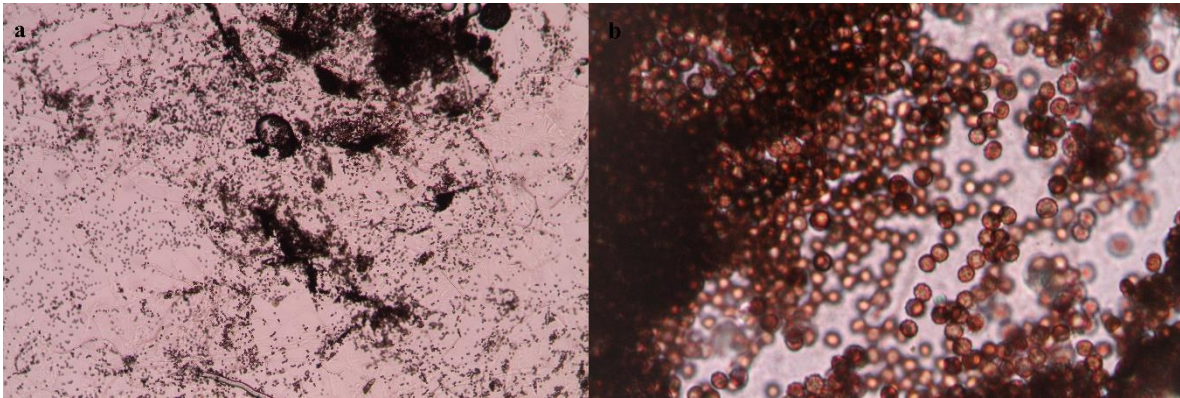
Figura 16. Hongo Cadophora sp., observado a 10x y 100x, tanto en a como en b se visualizan esporas como micelios mezclados entre sí.



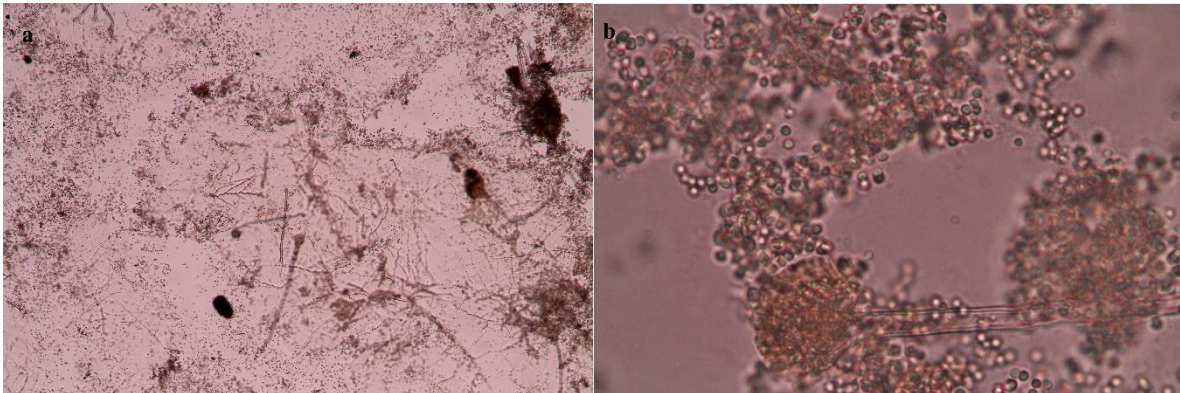
*Figura 17. Hongo No identificado (H), observado a 10x y 100x, en **a** se visualizan esporas, **b** que se visualiza micelio.*



*Figura 18. Hongo *Talaromyces flavus.*, observado a 10x y 100x, tanto en **a** como en **b** se observan esporas, de diversas tonalidades amarillas y naranjas.*



*Figura 19. Hongo No identificado (J), observado a 10x y 100x, es posible visualizar tanto en **a** como en **b** esporas, en **a** son de un color negro y **b** es posible observar un color más claro con bordes oscuros.*



*Figura 20. Hongo No identificado (K), observado a 10x y 100x, se visualiza en **a** esporas como estructuras, en **b** es posible observar en mayor detalle estructuras esporales.*

Fotografías microscopio electrónico de barrido (SCAN)

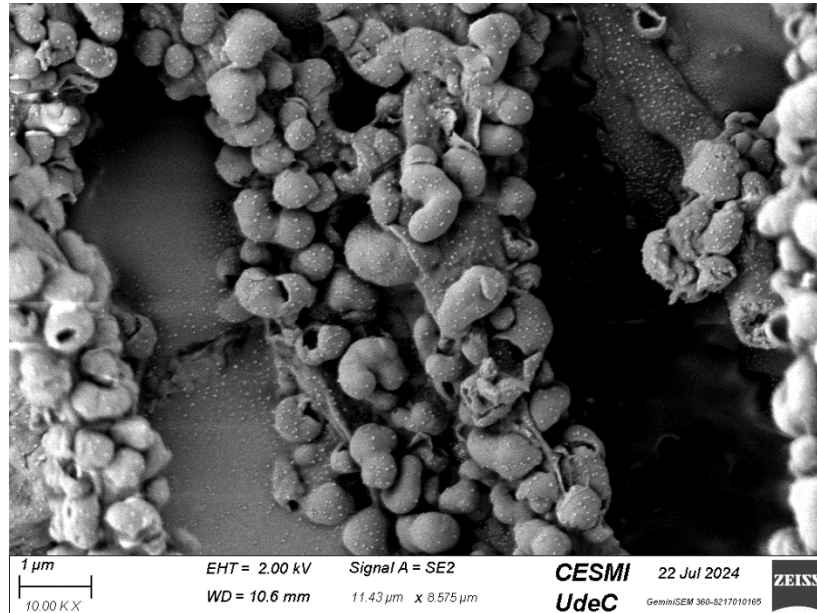


Figura 21. Hongo *Cadophora* sp. Estructuras formadoras de esporas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

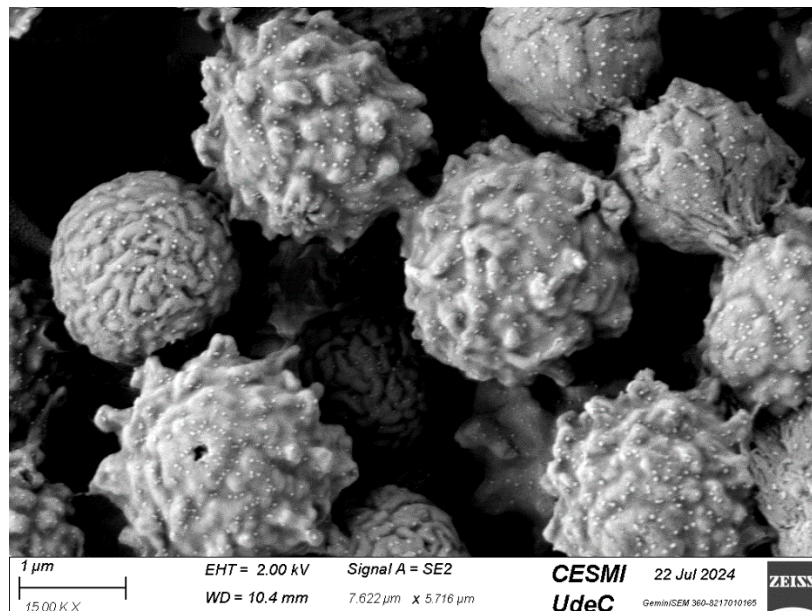


Figura 22. Hongo *Penicillium* sp. Al observar las esporas las cuales tienen una forma verrucosa (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003)

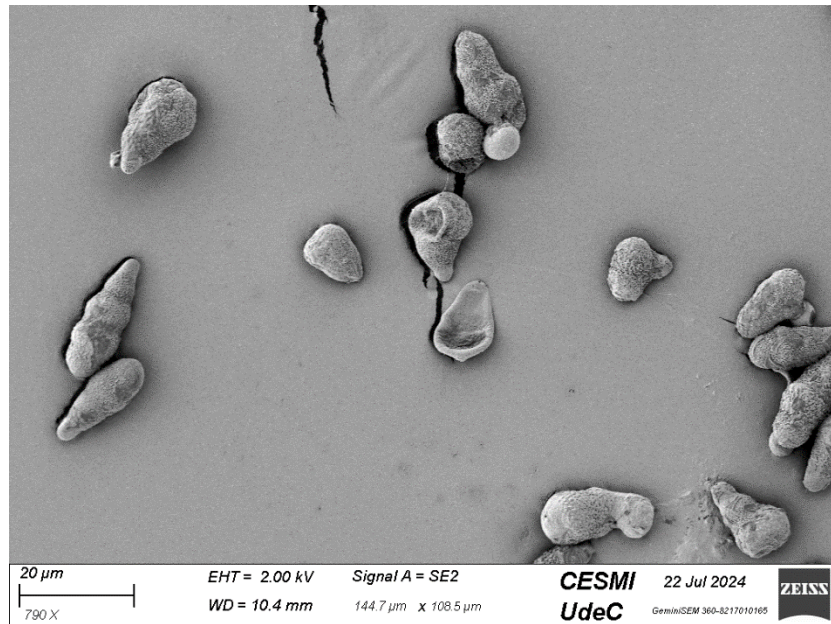


Figura 23. Hongo *Alternaria* sp. Estructura de esporas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

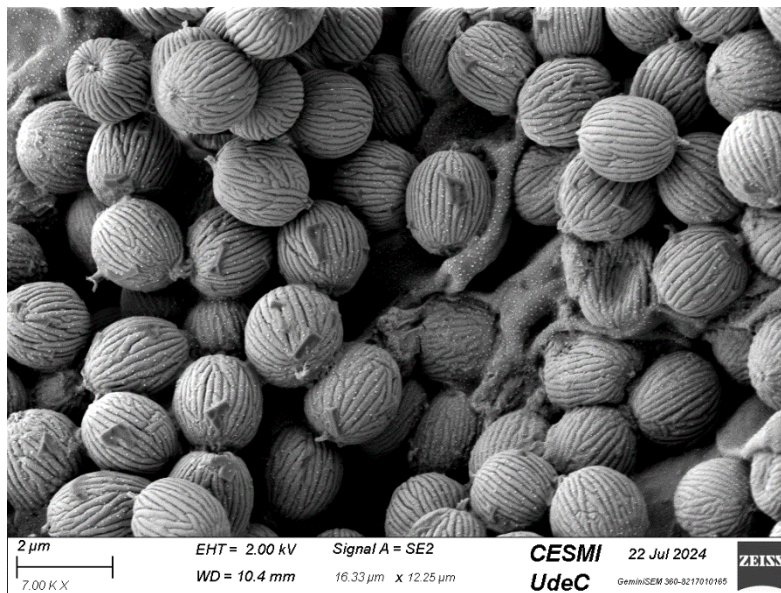


Figura 24. Hongo No identificado (E). forma de esporas listadas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

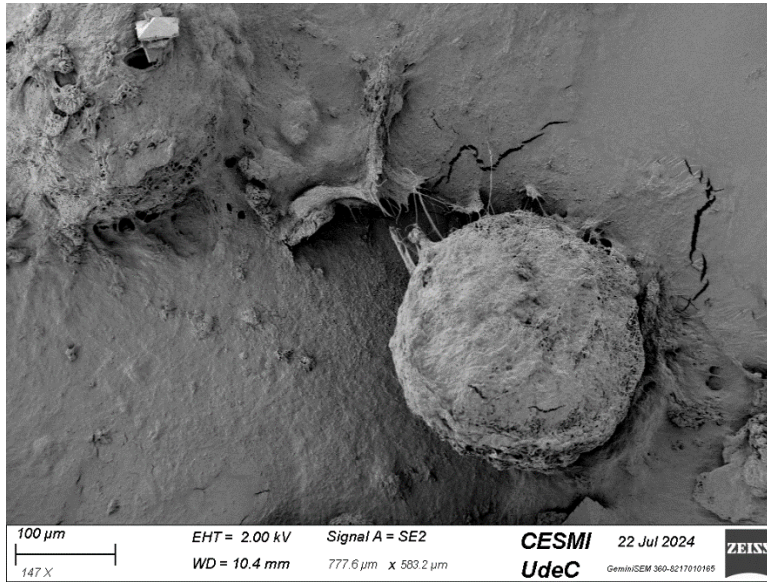


Figura 25. Hongo Talaromyces sp. Al observar la imagen no es posible distinguir el tipo de espora.

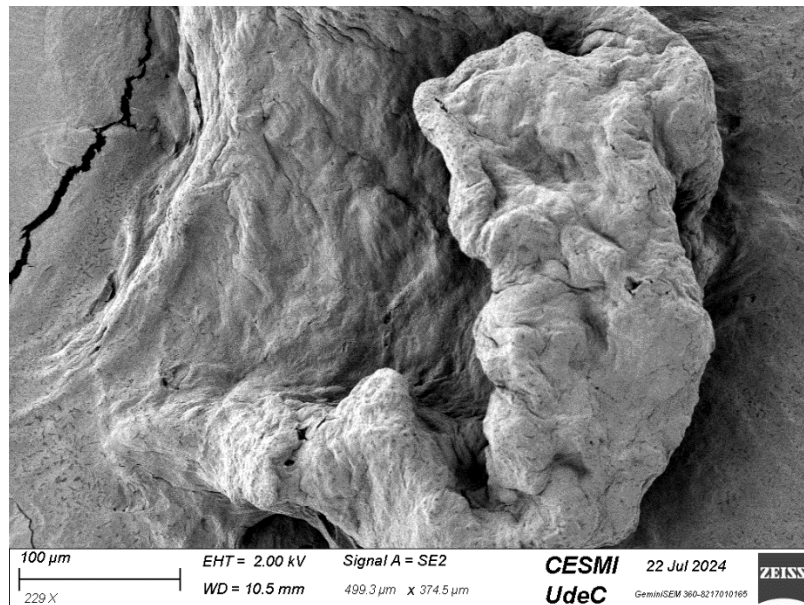


Figura 26. Hongo Cadophora sp. Al observar la imagen no es posible distinguir el tipo de espora.

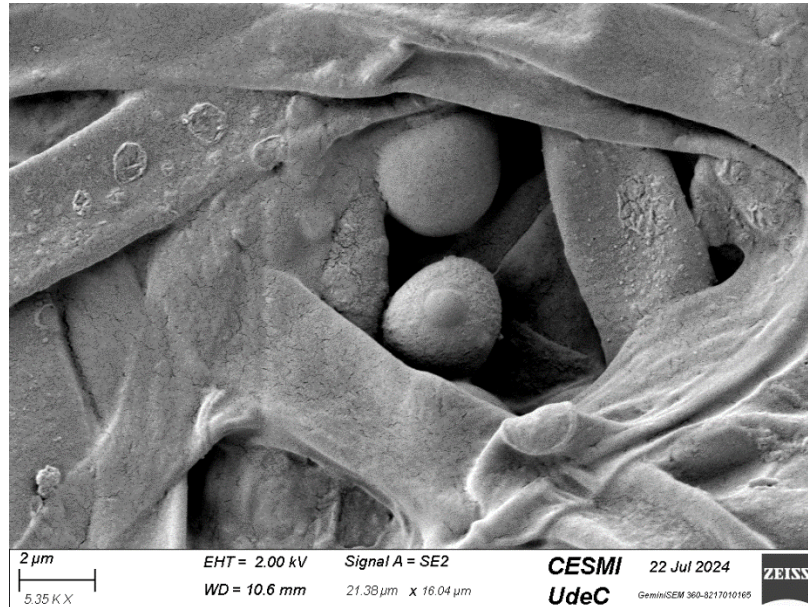


Figura 27. Hongo No identificado (H). Al observar la estructura es similar a una proliferación simpodial del conidióforo (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

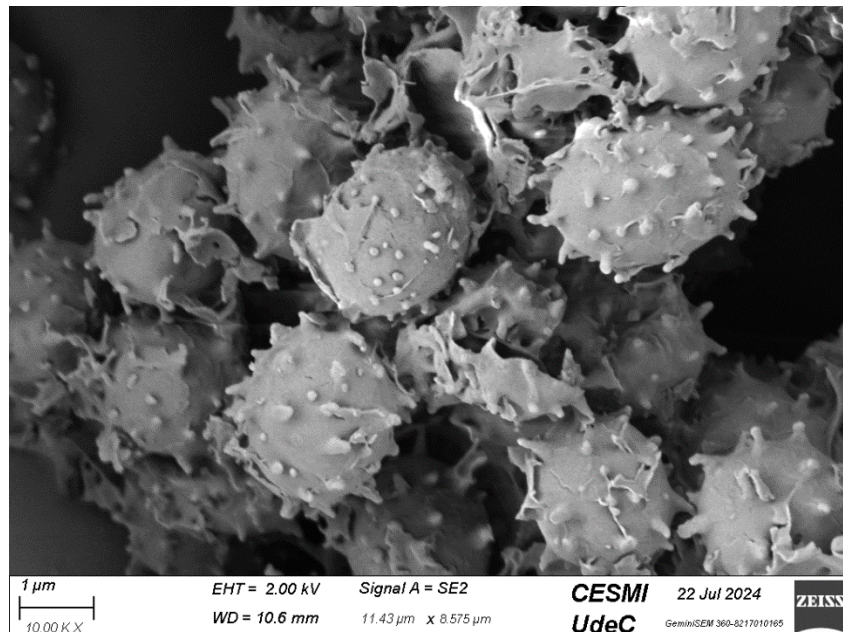


Figura 28. Hongo *Talaromyces flavus*. Esporas espinosas (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

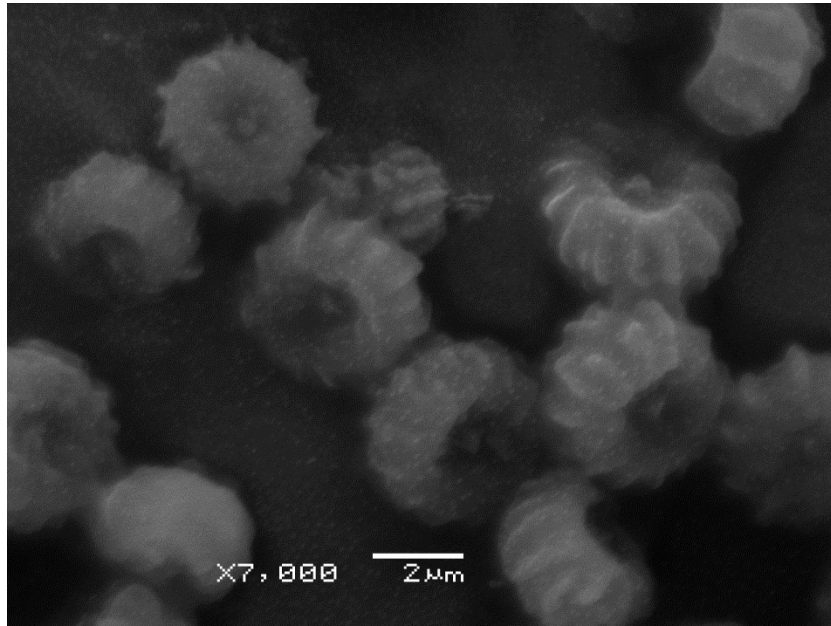


Figura 29. Hongo No identificado (J). Esporas de forma verrucosa (Garcés de Granada, Correa de Restrepo et al. 2003).

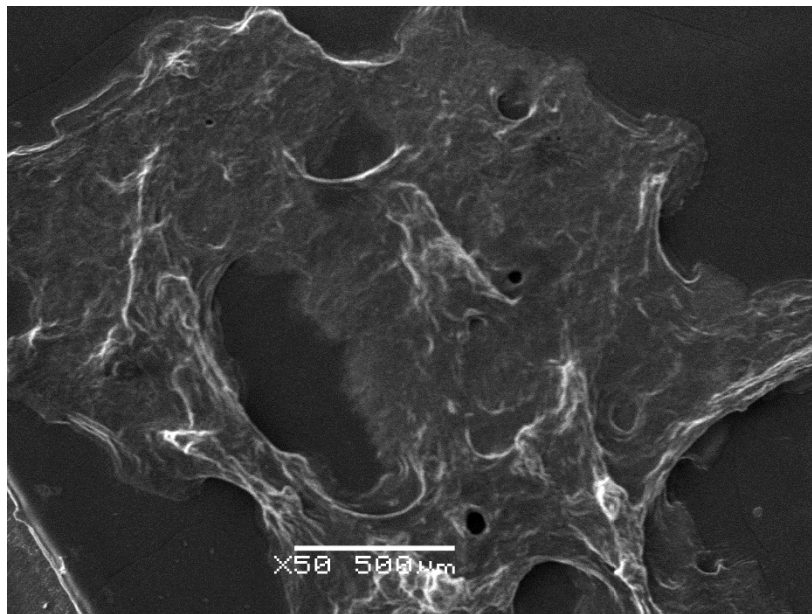


Figura 30. Hongo No identificado (K). Al observar la imagen no es posible distinguir esporas.

Tabla 14. Tamaño estimado de esporas

Hongo	Tamaño promedio en μm
<i>Cadophora sp. A</i>	1 μm
<i>Penicillium sp. B</i>	1 μm
<i>Alternaria sp. C</i>	20 μm
No identificado E	2 μm
<i>Talaromyces sp. F</i>	-
<i>Cadophora sp. G</i>	-
No identificado H	2 μm
<i>Talaromyces sp. I</i>	1 μm
No identificado J	2 μm
No identificado K	-

Prototipo biomaterial

El biomaterial realizado tuvo crecimiento entre las hojas de té, paja y astillas de madera, formando una estructura del tamaño de la placa recubriendo los materiales utilizados con micelio después de la incubación.



Figura 31. En la figura es posible observar los 6 prototipos de material con los 2 tratamientos mencionados en la metodología.



Figura 32. Prototipo biomaterial desmoldado y terminado.

Prueba de resistencia

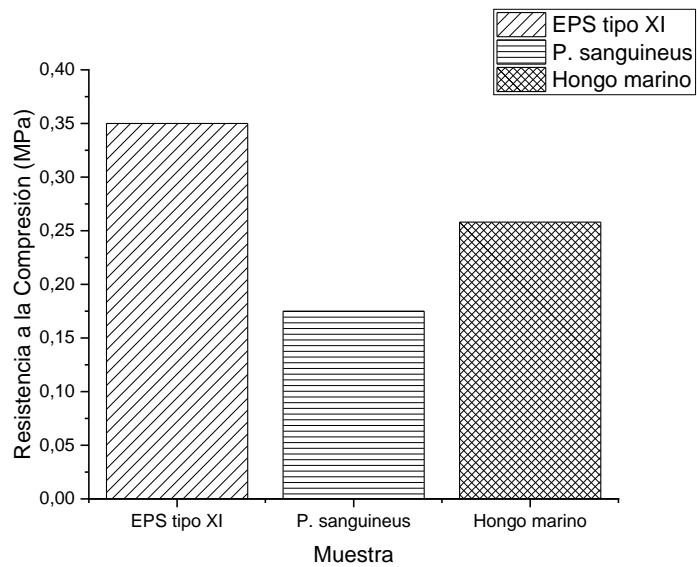


Figura 33. Comparativa de resistencia a la compresión (MPa) de muestra. EPS tipo XI, un biomaterial obtenido con el hongo *P. sanguineus* con sustrato de aserrín de pino y el biomaterial obtenido con el hongo *Alternaria sp.*

Análisis cromatográfico

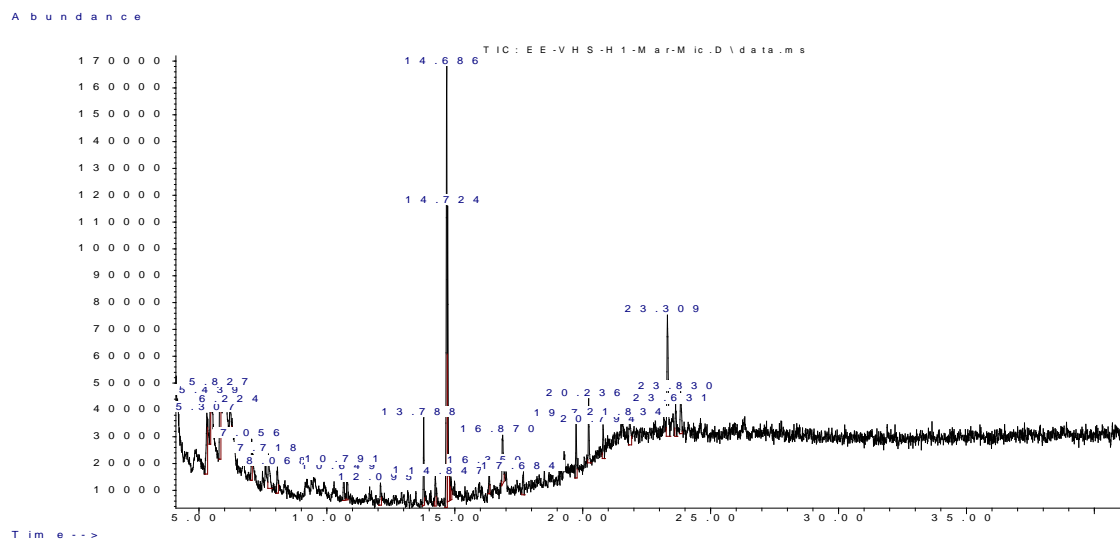


Figura 34. Mar Micelio. Abundancia por tiempo.

Tabla 15. Mar Micelio, MQ > 90%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
13.788	3.88	Acido 1,2-Bencenodicarboxilico, bis(2-metilpropil) ester	000084-69-5	90
14.686	22.60	acid n-Hexadecanoico	000057-10-3	99
16.870	3.88	4,4'-(1-metiletilidene)bis-fenol	000080-05-7	93

Tabla 16. Mar Micelio, MQ entre 60-89%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
5.439	2.31	Catecol	00010-80-9	60
5.827	5.26	5-hidroximetilfurfural	000067-47-0	76

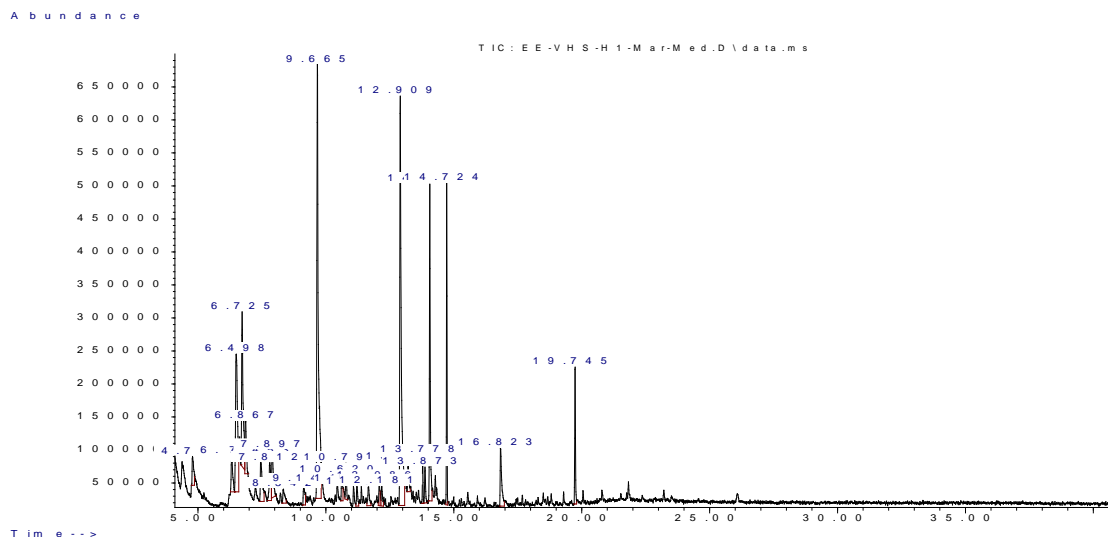


Figura 35. Mar Medio. Abundancia por tiempo.

Tabla 17. Mar Medio, MQ > 90%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
13.778	1.01	Acido 1,2-Bencenodicarboxilico, bis(2-metilpropil) ester	000084-69-5	90
14.062	8.52	4,6-dimetoxi-ftalido	058545-97-4	93
16.823	2.80	4,4'-(1-metiletililidene)bis-fenol	000080-05-7	96

Tabla 18. Mar Medio, MQ entre 70-89%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
4.786	1.44	Lactona dehidromevalonica	002381-87-5	87
8.342	0.83	3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehido	000621-59-0	70

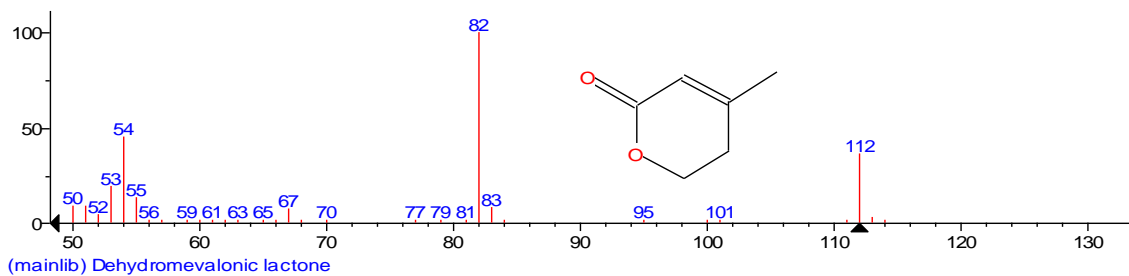


Figura 36. Metabolito Lactona dehidromevalonica en tiempo 4.786 minutos.

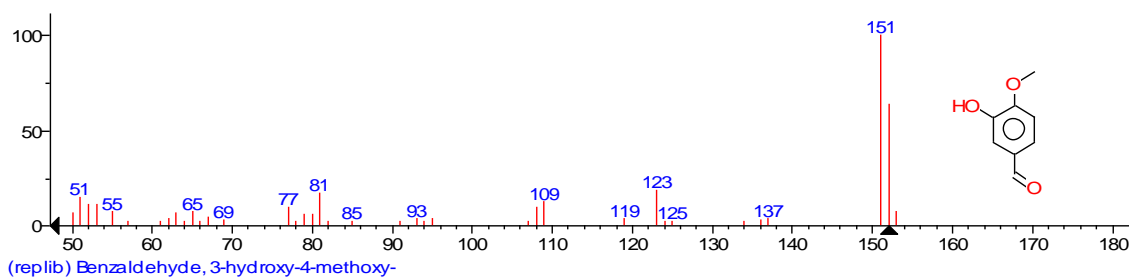


Figura 37. Metabolito 3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehido en tiempo 8.34 minutos.

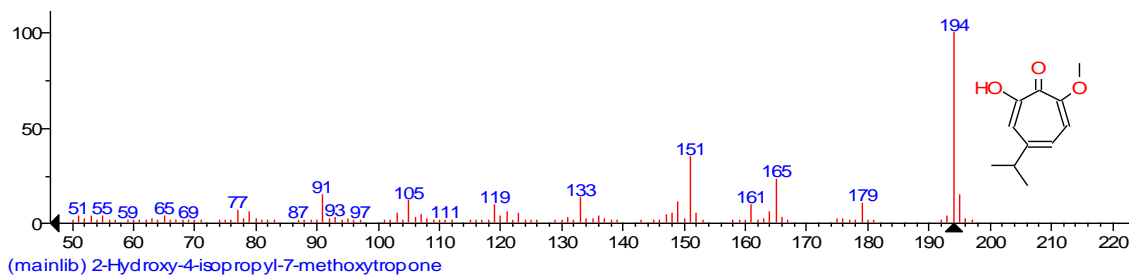


Figura 38. Metabolito 2-Hidroxi-4-isopropil-7metoxitropona en tiempo 14.062 minutos.

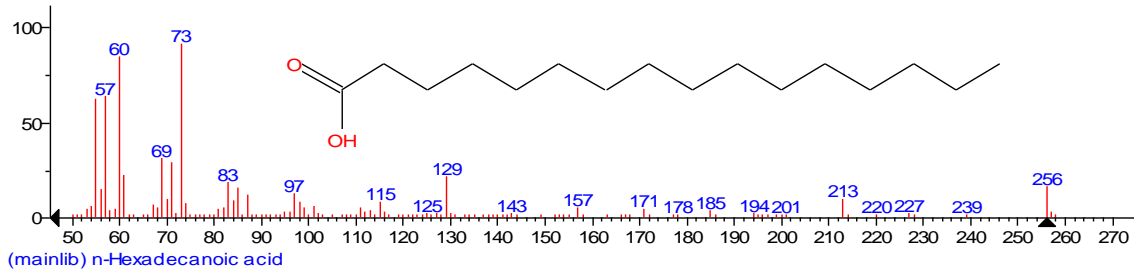


Figura 39. Metabolito Acido n-Hexadecanoico en tiempo 14.68 minutos.

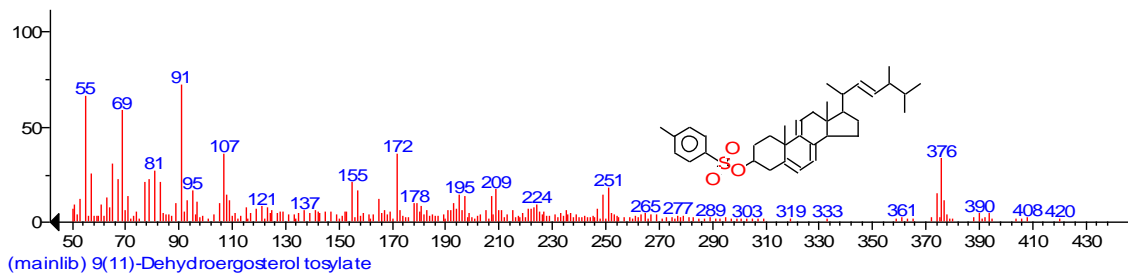


Figura 40. Metabolito 9(11)-Dehidroergosteroltosilato en tiempo 23.309 minutos.

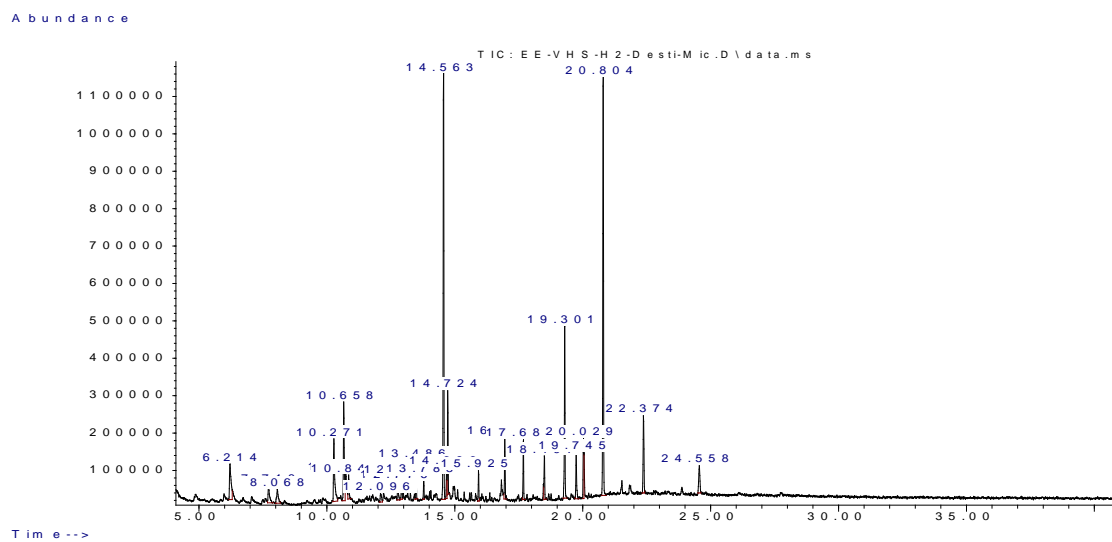


Figura 41. Destilada Micelio. Abundancia por tiempo.

Tabla 19. Destilada Micelio, MQ >90%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
7.054	4.30	2,4-Decadienal, (E,Z)-	025152-83-4	96
7.718	1.62	2-Undecenal	002463-77-6	90
8.068	1.52	Ciclododecano	000294-62-2	95
8.332	1.00	Vainillina	000121-33-5	93
10.299	49.67	3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-2-Benzopiran-1-ona,	001200-93-7	98
10.734	0.87	α -Guaiene	003691-12-1	93
10.847	1.29	1a,2,3,4,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,4,7-Tetrametil-1H-ciclopropa[e]azuleno	405112-35-8	94
12.776	1.06	Bencil Benzoato	000120-51-4	98
12.918	0.97	1-Docoseno	001599-67-3	95
13.486	1.48	6,10,14-trimetil 2-Pentadecanona	000502-69-2	95
14.563	20.38	Hibaeno	002359-73-1	99
14.686	1.50	Acido n-Hexadecanoico	000057-10-3	98
15.925	1.27	Heneicosano	000629-94-7	97
16.842	1.48	4,4'-(1-metiletilideno)bis-Fenol,	000080-05-7	97
17.684	2.52	Tricosano	000638-67-5	95
18.497	1.85	Tetracosano	000646-31-1	98
19.301	8.18	Pentacosano	000629-99-2	97

20.029	3.00	1-Tetracoseno	010192-32-2	94
20.785	0.94	Eicosano	000112-95-8	94
20.804	20.71	Hexacosano	000630-01-3	94
22.374	4.33	Eicosano	000112-95-8	95
24.558	2.10	Hexadecano	000544-76-3	95

Tabla 20. Destilada Micelio, MQ entre 70-89%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
6.214	3.71	2-Decenal, (E)-	003913-81-3	80
13.788	0.98	Acido 1,2-Benzenodicarboxolico, bis(2-metilpropil) ester	000084-69-5	86

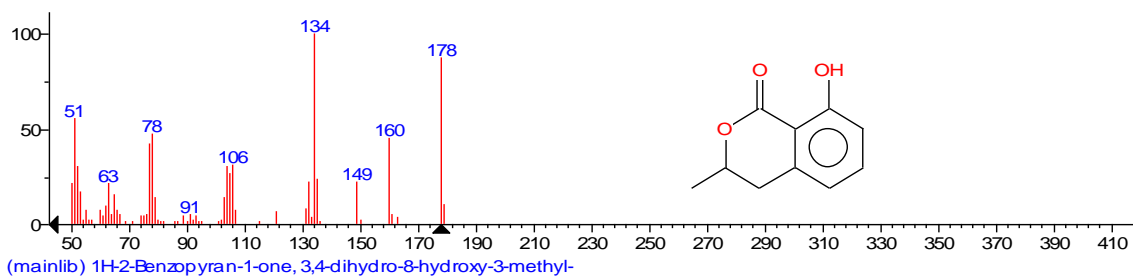


Figura 42. Metabolito 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-benzopiran-1-one en tiempo 10.27 minutos.

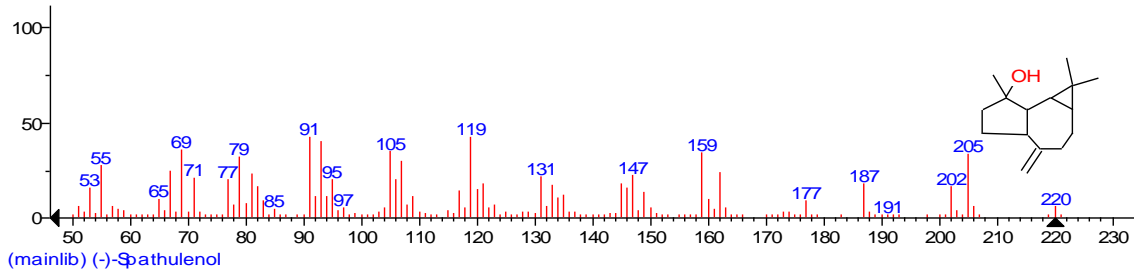


Figura 43. Metabolito (-)-Spathulenol en tiempo 10.65 minutos.

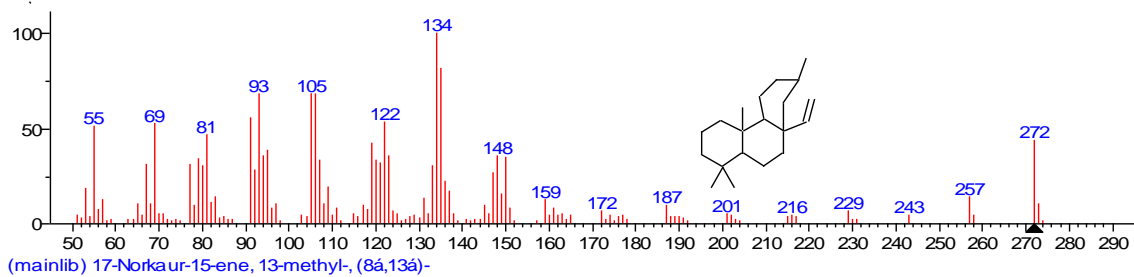


Figura 44. Metabolito 13-metil-, (8á,13á)-17-Norkaur-15-ene en tiempo 10.72 minutos.

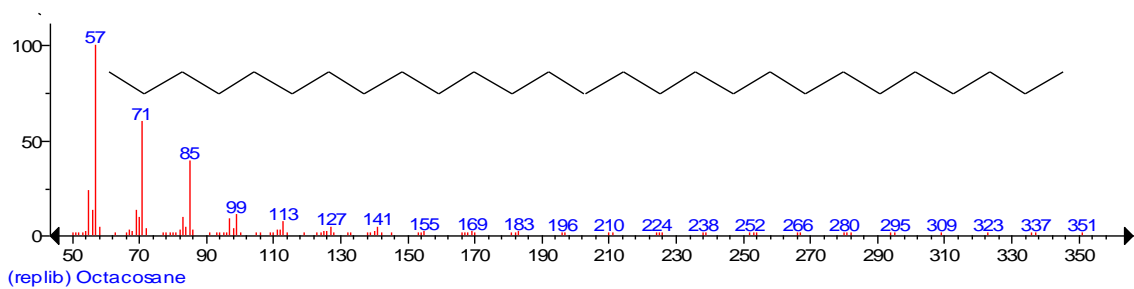


Figura 45. Metabolito Octacosano en tiempo 17.68 minutos.

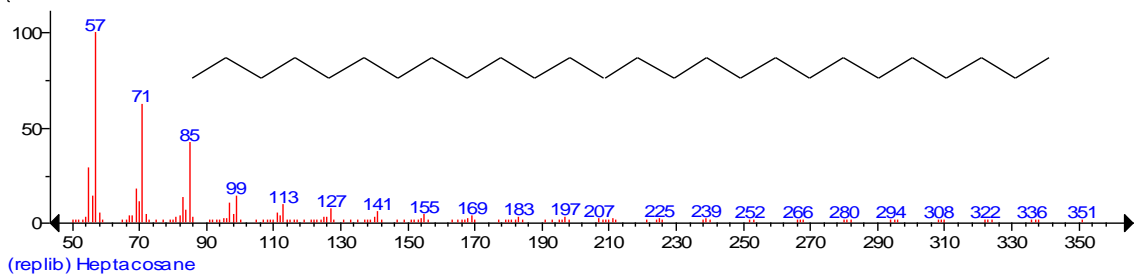


Figura 46. Metabolito Heptacosano en tiempo 18.49 minutos.



Figura 47. Metabolito Heneicosano en tiempo 19.30 minutos.

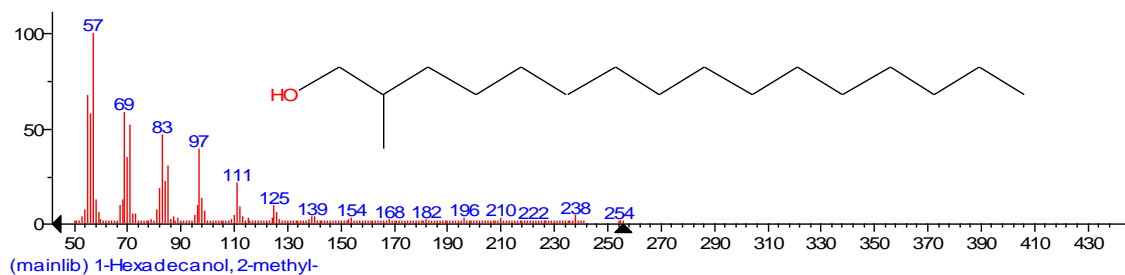


Figura 48. Metabolito 2-metil-1-hexadecanol - en tiempo 20.02 minutos.

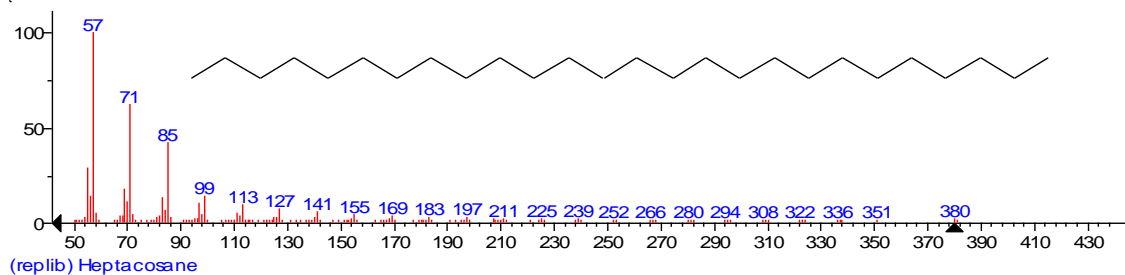


Figura 49. Metabolito Heptacosano en tiempo 20.80 minutos.

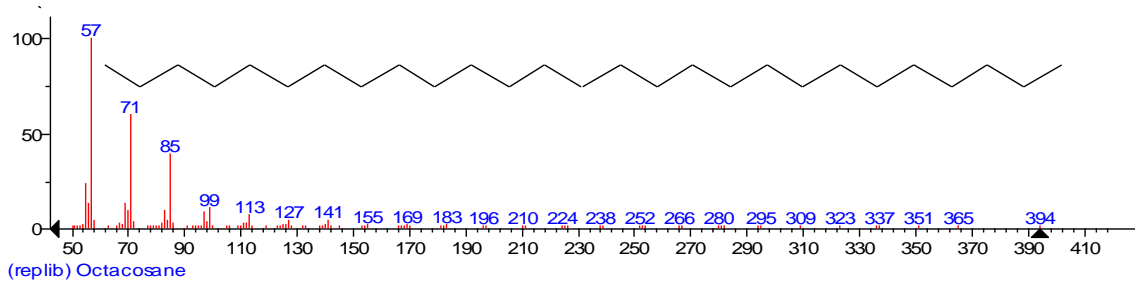


Figura 50. Metabolito Octacosano en tiempo 22.37 minutos.

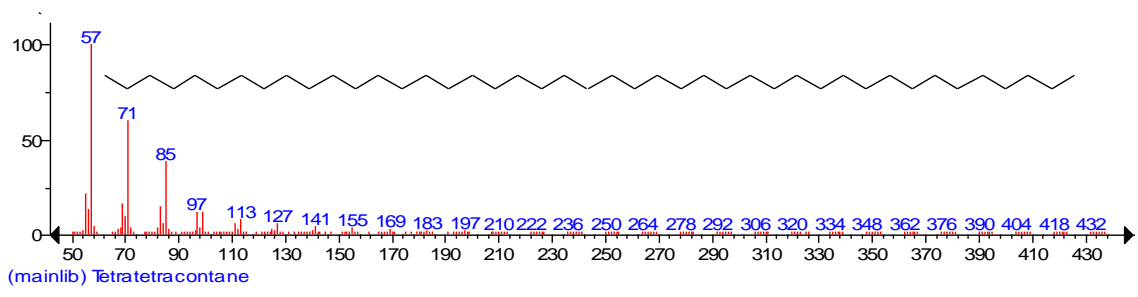


Figura 51. Metabolito Tetratetracontano en tiempo 24.55 minutos.

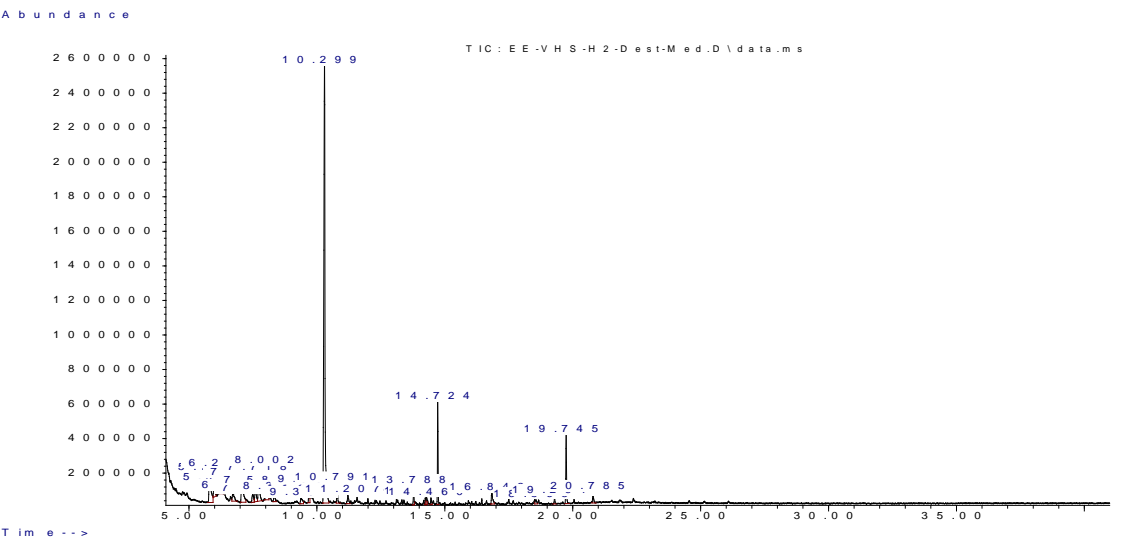


Figura 52. Destilada Medio. Abundancia por tiempo.

Tabla 21. Destilada Medio, MQ>90%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
5.798	5.51	5-Hydroximetilfurfural	000067-47-0	90
7.056	4.30	2,4-Decadienal, (E,Z)-	025152-83-4	96
7.718	1.62	2-Undecenal	002463-77-6	90
8.068	1.52	Cyclododecano	000294-62-2	95
8.332	1.00	Vainillina	000121-33-5	93
10.299	49.67	3,3-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-2-Benzopiran-1-ona,	001200-93-7	98
10.271	5.08	3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-2-Benzopiran-1-ona,	001200-93-7	96
10.734	0.87	α -Guaiene	003691-12-1	93
10.847	1.29	1a,2,3,4,6,7,7 a,7b-octahidro-1H-1,1,4,7-Tetrametil-cyclopropa[e]azuleno	405112-35-8	94
12.776	1.06	Bencil Benzoato	000120-51-4	98
12.918	0.97	1-Docoseno	001599-67-3	95
13.486	1.48	6,10,14-trimetil Pentadecanona,	000502-69-2	95
14.563	20.38	Hibaeno	002359-73-1	99
14.686	1.50	Acido n-hexadecanoic	000057-10-3	98
15.925	1.27	Heneicosano	000629-94-7	97
16.842	1.48	4,4'-(1-metiletilideno)bis-Fenol,	000080-05-7	97
17.684	2.52	Tricosano	000638-67-5	95

18.497	1.85	Tetracosano	000646-31-1	98
19.301	8.18	Pentacosano	000629-99-2	97
20.029	3.00	1-Tetracoseno	010192-32-2	94
20.785	0.94	Eicosano	000112-95-8	94
20.804	20.71	Hexacosano	000630-01-3	94
22.374	4.33	Eicosano	000112-95-8	95
24.558	2.10	Eicosano	000112-95-8	95

Tabla 22. Destilada Medio, MQ entre 70-89%

Tiempo de retención	Area %	Nombre	CAS#	MQ
6.716	1.53	2,4-Decadienal, (E,Z)-	025152-83-4	81
7.718	3.35	(E)-Tetradec-2-enal	051534-36-2	83
8.002	4.82	Orto-Hidroxiopropiofenona	000610-99-1	86
13.788	1.24	Acido 1,2- bis(2-metilpropil) ester Bencenodicarboxilico,	000084-69-5	80
14.242	0.54	1-etil-4,5-divinil-Ciclohexeno	016539-12-1	86
19.291	0.51	Acido 4-tetradecil ester Metoxiacetico,	1000282-05-0	74

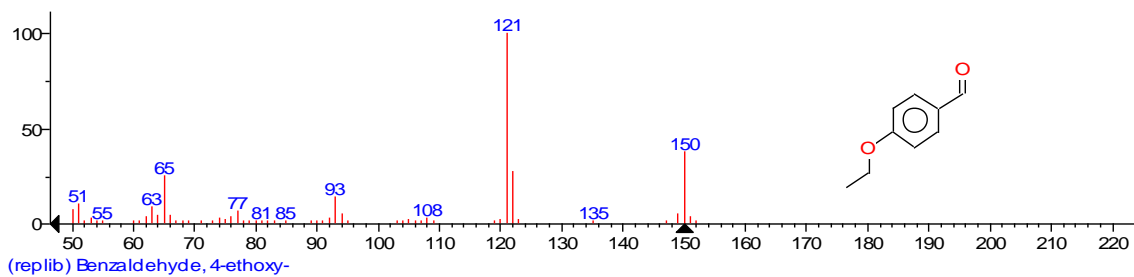


Figura 53. Metabolito 4- etoxi- Benzaldehido en tiempo 8.039 minutos.

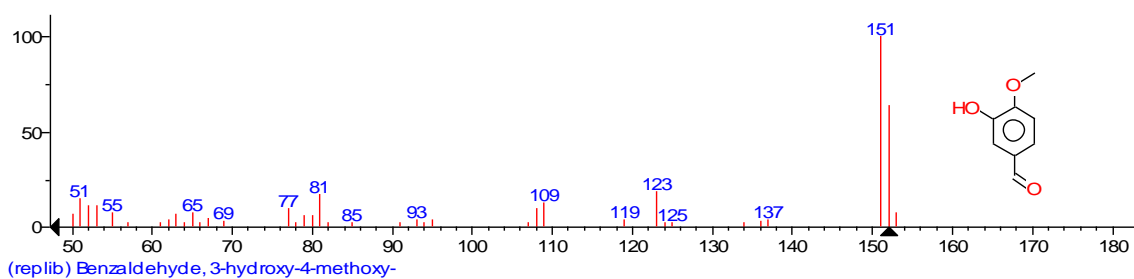


Figura 54. Metabolito 3-hidroxi-4metox-Benzaldehido en tiempo 8.33 minutos.

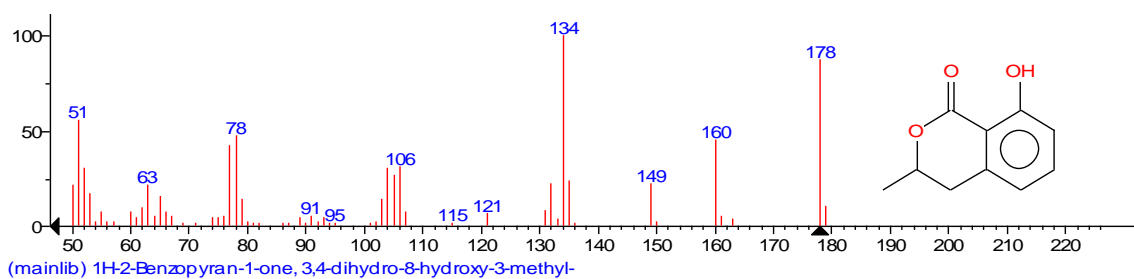


Figura 55. Metabolito 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1H-2-Benzopiran-1-ona en tiempo 10.23 minutos.

Tabla 23. Screening de concentraciones bioactivas

	Medio		Micelio	
	Mar	Agua Dest	Mar	Agua Dest
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-

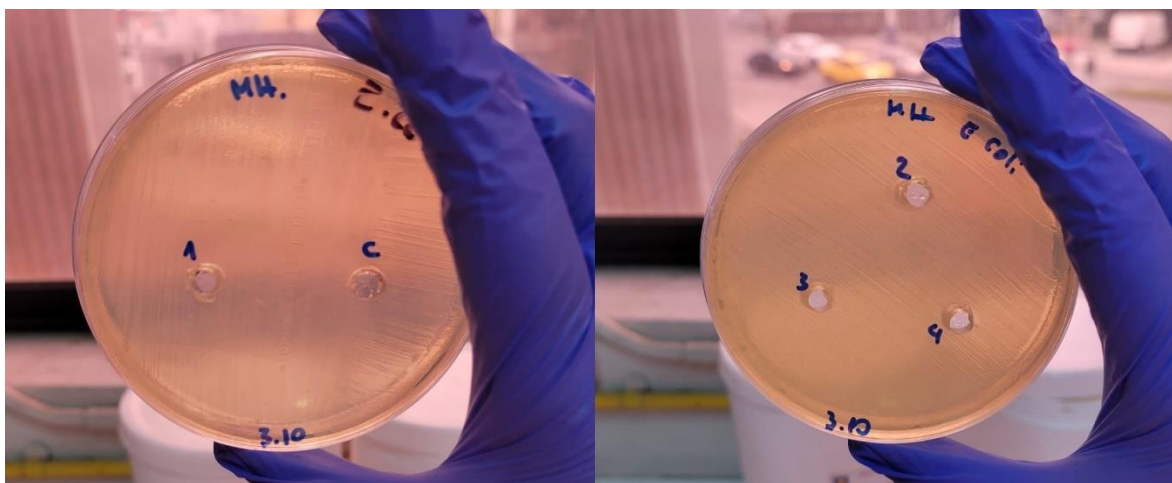


Figura 56. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa *E. coli*.

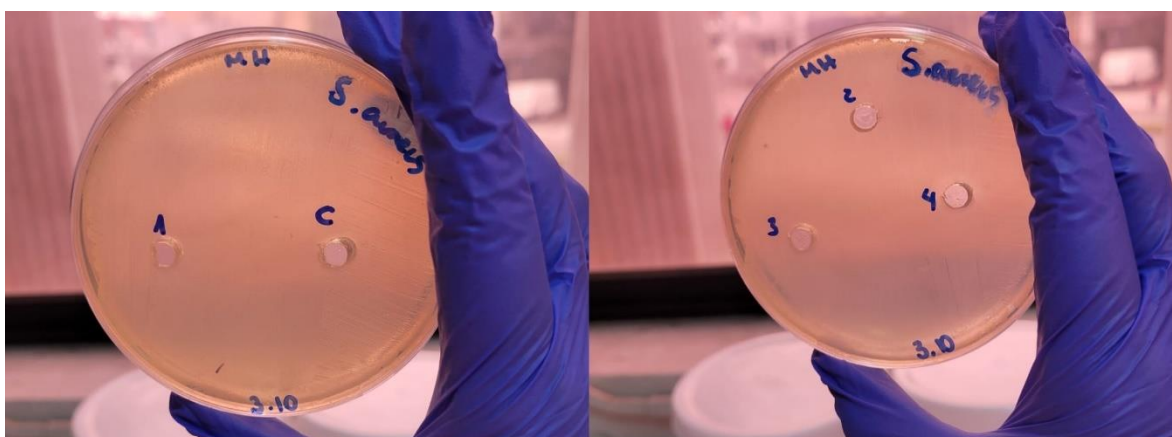


Figura 57. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa *S. aureus*.

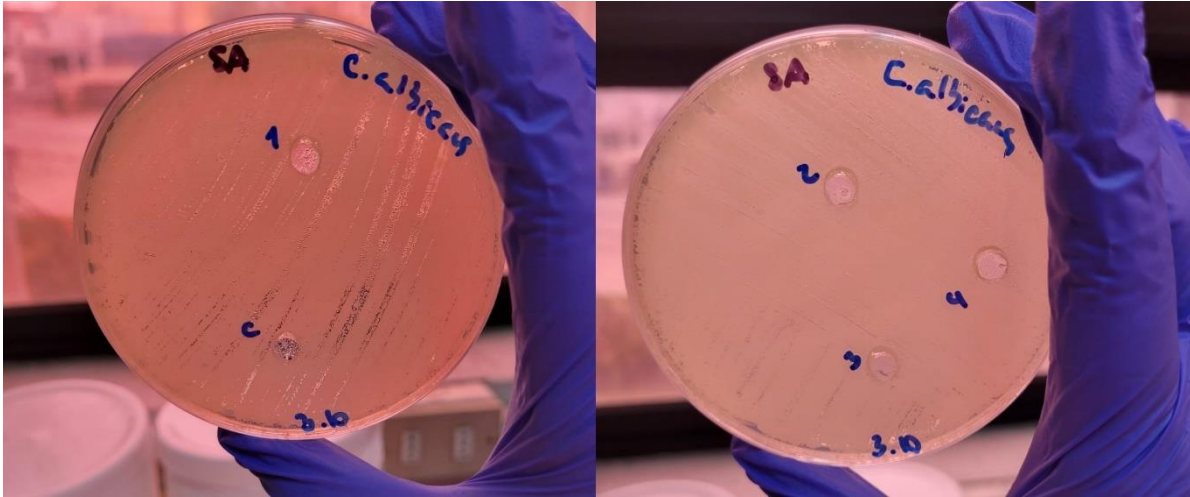


Figura 58. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa *C. albicans*.

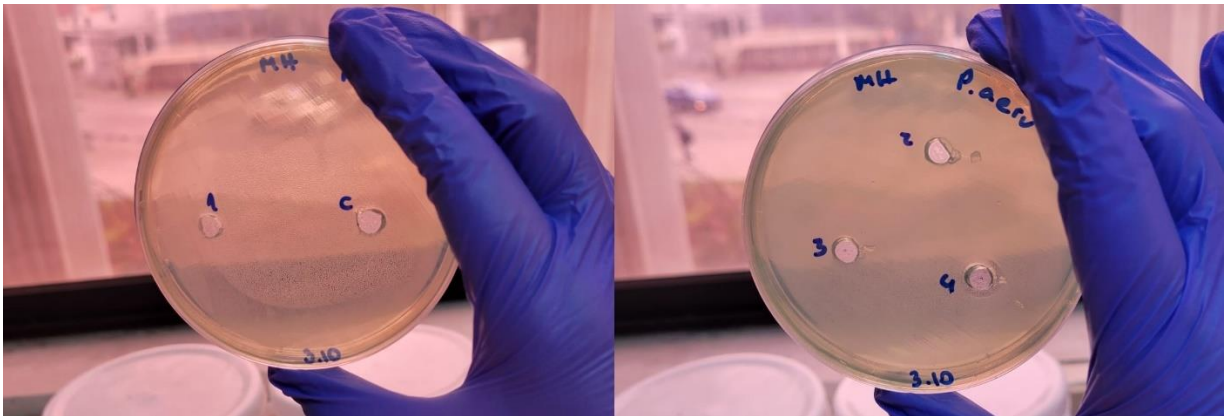


Figura 59. Screening de concentraciones bioactivas, con cepa *P. aeruginosa*.

Discusión

A medida que avanza la tecnología, el descubrimiento de la biodiversidad de hongos marinos sigue en aumento gradualmente. En las muestras de sedimentos provenientes de la Bahía de Dichato, Región del Biobío, fueron aisladas e identificadas once especies distintas de 10 muestras sedimentarias marinas entregadas en el laboratorio para su posterior análisis.

Para obtener una mayor probabilidad de aislamiento se probaron diferentes medios de cultivo sólido como los descritos en las Tablas 2, 3 y 4. El crecimiento tendió a ser mayor en las placas con Agua de mar, no así en el caso de la primera placa del Hongo I *Talaromyces flavus* el cual arrojó gran crecimiento además de coloración en medio de cultivo con agua destilada (Zhai, Li et al. 2016).

La identificación fue realizada por características morfológicas con microscopía electrónica y genéticamente por biología molecular utilizando el marcador ITS. En su gran mayoría las cepas alcanzaron sobre el 99.3 % de similitud con la especie, siendo así la especie identificada como *Penicillium sp* la con menor porcentaje de similitud (91.13%), dando la posibilidad a ser una nueva especie. Para corroborar este punto son necesarios más estudios específicos como un análisis filogenético para mejorar la identificación.

Esto explicaría la alta biodiversidad aun no identificada de hongos en ambientes marinos. Así como la baja biodiversidad de hongos marinos cultivados en medios artificiales, ya que los medios artificiales no poseen las mismas características que el ambiente marino y un mal manejo puede llevar a una alta contaminación del medio artificial (Grossart, Van den Wyngaert et al. 2019).

El biomaterial se realizó con el sustrato de chips de madera de Pino radiata D don y el hongo C, identificado como *Alternaria sp.*, el biomaterial que se logró realizar cumplió con las propiedades esperadas, un biomaterial con micelio espeso y de una coloración llamativa ya que el hongo utilizado era de coloración oscura, esto de coloración oscura podría servir para alguna aplicación como absorción de luz UV, cuya secuenciación indicó que su secuencia tenía un 99.56% de ser *Alternaria sp.*, en donde uno de los posibles

pigmentos presentes es la melanina la cual es usada contra rayos UV (Fuentes, Hernández et al. 2014).

De acuerdo con los datos en la prueba de resistencia según la metodología entregada se puede estimar que el biomaterial obtenido tiene una resistencia equivalente al poliestireno expandido tipo XI, lo que podría ser de utilidad en la producción de un biomaterial con características similares, la comparación con otro biomaterial obtenido con el hongo *Pycnoporus sanguineus* y aserrín de pino (Figura 33) muestra una mejora en la resistencia siendo un hongo utilizado en otros trabajos de producción de biomateriales (Bruscato, Malvessi et al. 2019) esta diferencia se puede obtener por la granulométrica del sustrato, ya que el material obtenido en este estudio utilizó chips de madera de pino, con un área mayor de contacto, aumentando su resistencia en conjunto con el micelio.

Lo anterior se observa de la tabla 24 que resume todas estas características.

Tabla 24. Características de los biomateriales en comparativa con el EPS.

Resistencia a la compresión	EPS tipo XI	<i>P. sanguineus</i>	<i>Alternaria sp</i>
Fuerza	0,35 MPa	0,17 MPa	0,26 MPa
Densidad	0,2 g cm ⁻³	0,32 g cm ⁻³	0,25 g cm ⁻³

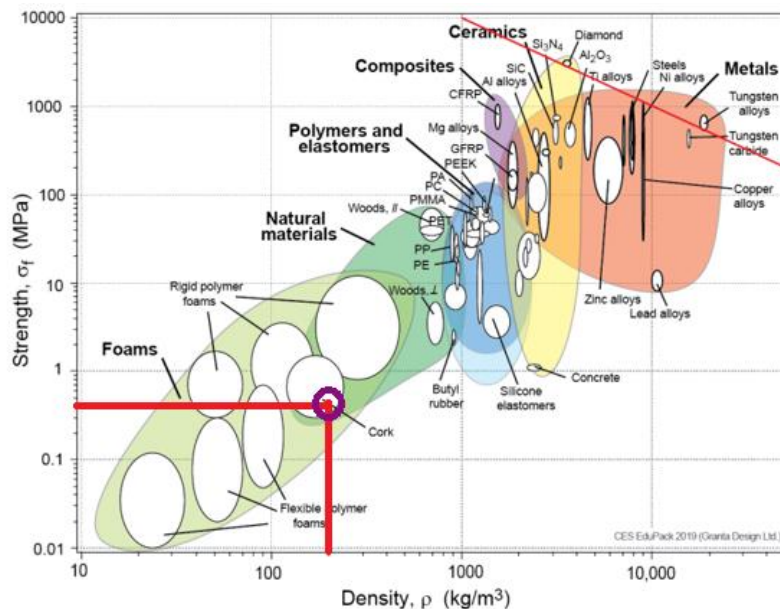


Figura 60. Gráfico de propiedades mecánicas de materiales. El círculo que encierra las líneas indica el lugar al cual quedaría el biomaterial obtenido.

A partir de este gráfico y de los datos obtenidos del ensayo de materiales, es posible observar la concordancia de este atributo a partir del crecimiento de biomasa micelial comparado con los datos obtenidos por Aislantes Modopack Limitada Fresia 2020 y Bruscato et al, 2019.

La orientación de esta investigación fue generar biomasa suficiente a partir de cultivos en un soporte sólido tales como hojas de té, desechos vegetales derivados del trigo y astillas de madera, todos materiales en general, descritos como de desecho. La naturaleza de este trabajo implica conferir valor a estos materiales y evitar con ellos su disposición como basura, concepto conocido como economía circular (Meyer, Basenko et al. 2020).

El origen natural de la cepa fúngica utilizada para evaluar su posible actividad biológica guarda relación con el color que generaría aceptación al momento de su utilización como biomaterial. Dado el color negro del hongo *Alternaria sp.*, que se usó en los ensayos de generación de biomasa, se optó por utilizar una cepa fúngica que junto con producir una adecuada cantidad de biomasa pudiese sintetizar colores más atractivos y metabolitos en general, con capacidad bioactiva. Entre los pigmentos presentes destacables y mayormente conocidos en *Alternaria sp.*, se encuentra la melanina (Fuentes, Hernández et al. 2014) y los carotenoides (Meléndez-Martínez, Vicario et al. 2007).

Para ello los cultivos en medio líquido establecidos con la cepa *Talaromyces flavus.*, así identificada de acuerdo con la secuenciación por producto por PCR (Tabla 14) hicieron posible la extracción e identificación por medios analíticos de más de 20 compuestos con distinta naturaleza química y potencial bioactivo.

Una parte relevante de estos metabolitos está constituida por la presencia de ácidos grasos, o en general compuestos con características alifáticas. Ello se advierte en la Tabla donde se observan compuestos como **ácido n-Hexadecanoico** descrito por Dileep et al, 2012 (Aparna, Dileep et al. 2012) el cual posee propiedades antiinflamatorias, **Lactona Dehidromevalonica** descrito por Li et al, 2020 (Li, Xue et al. 2017) posee eficacia antibacteriana, **Vainillina** descrito por Stoica-Guzun et al, 2015 (Stroescu, Stoica-Guzun et al. 2015) que puede ser utilizada junto a otro compuesto para ayudar a obtener respuestas antimicrobianas al ser probadas con bacterias, **2-Decenal, (E)-**

descrito por Lagaña et al, 2001 (Bisignano, Laganã et al. 2001) posee propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas de tracto respiratorio humano e infecciones intestinales, **2-Undecenal** descrito por Pacheco-Hernández et al, 2019 (Villa-Ruano, Pacheco-Hernández et al. 2019) posee actividad antibacteriana, **Bencil Benzoato** descrito por Cartel et al, 1993 (Glaziou, Cartel et al. 1993) es un compuesto que puede ser utilizado para tratamiento contra la sarna, **Heneicosano** descrito por Vijayakumar et al, 2020 (Vanitha, Vijayakumar et al. 2020) es un alcano bioactivo microbicida, **Hexacosano** descrito por Kumar and Shukla, 2015 (Kumar and Shukla 2015) posee actividad antimicrobiana, **Catecol** descrito por Weidman and Kaiser, 1996 (Weidman and Kaiser 1966) posee propiedades quelantes, y **1-Docoseno** descrito por Chang et al, 2015 (Cheng, Chang et al. 2015) posee propiedades antioxidantes.

En el extracto obtenido a partir del medio de cultivo se observa la presencia de un metabolito esteroidal, reconocible como un derivado de Ergosterol. Este compuesto es propio de fuentes naturales fúngicas, ya sea terrestres o marinas. El Ergosterol es un metabolito que se encuentra alojado en la pared celular de los hongos, así como también es utilizado para determinar la biomasa metabólicamente activa (Gessner 2020).

En la prueba de *screening* realizada con las cuatro cepas de interés biomédico se observó una reacción de antagonismo con la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, (Wu, Jin et al. 2015). Como es una bacteria patógena Gram (-), que presenta con factores de virulencia y tiene importancia en ambientes hospitalarios con bacterias resistente a antibióticos, se proyecta que los metabolitos obtenidos con el cultivo de la especie *Talaromyces sp.*, podrían ser potencialmente utilizados en la formulación de un bioproducto antimicrobiano.

Conclusión

La resistencia del prototipo de biomaterial obtenido concordó con el planteamiento de ser similar en resistencia al poliestireno expandido, pudiendo abrir paso a la posibilidad de utilizar materiales creados en base a micelio de hongos marinos en conjunto a sustratos considerados desechos.

La actividad biológica observada si bien es preliminar es concordante con la presencia de metabolitos bioactivos secretados al medio o presentes en el micelio, como el caso de algunos ácidos grasos o metabolitos de naturaleza terpénica.

Las proyecciones del trabajo futuro deben incluir la posibilidad de separación de los metabolitos secundarios en los hongos empleados, cuya presencia en el biomaterial podría conferir un valor agregado por la funcionalidad de los nuevos productos.

Anexo

Secuenciación

- Hongo A

CCTTCTTTTGAGAAGTCGGTCCTGAACTCCACCCTTGAATAAACTAC
CTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCCTCGCGCCAGCGGCTTCGGCTGTTG
AGTGCCCGCCAGAGGACCACAACCTCTTGTTTTTAGTGATGTCTGAG
TACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT
ATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATAACCACTCAAGCT
CTCGCTTGGTATTGGGGTTCGCGGTTTCGCGGCTCCTAAAATCAGTG
GCGGTGCCTGTCGGCTCTACGCGTAGTAATACTCCTCGCGTCTGGGT
CCGGTAGGTCTACTTGCCAGCAACCCCAATTTTTACAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCG
GAGGAA

- Hongo B

CTTTCGAACGAACCATTTGCCGCCCCCTGGTAATTCACGGGGGG
CATGCCTCTCCCGAGCGTCATTGCTCCCCTCAAGCCCGGTTTGTGTG
TTGGGTCTCGTCCCCCTTCCCGGGGGGAGGCCCGAAAGGCAGCGGC
GGCACCGCGTCCGGTCCTCAAGCGTATGGGGCTTTTCACCCGCTCT
GAACCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCACCAAACCTTTTTTCCGGTGA
CCTCGGATCAGGTAGGGACCCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGG
GAGGAAGA

- Hongo C

CTTGGGTCTCCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCA
ATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT

TGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTG
TACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGC
TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGG
AGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA
TTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGA

- Hongo D

AAGTGTCGCCGGGGGGACGTCGTCTCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAA
GCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTACTATGAA
AATTGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGG
GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGT
GTGTTGGGTGCGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGC
GACGCCGTCTGGTCCTCGAGCGCATGGGGCTCTGTCACTCGCTCG
GGAAGGACCTGCGGGGGTGGTACACCACTATATTTTACCACGGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAA

- Hongo F

TTTTTCTCCGGTCGCCGGGGGGGCACTGCGCCCCCGGGCCCGTGC
CCGCCAGAGCACCTATGAACCCTTCTGAAGATCGGCGGTCTGA
GTGGGATGATAATCATTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
CGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGC
CCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGGCGTGGTCCCCCGGCCCGG
GGGACCTGCCCAAAGGCAGCGGCGACGTCCCGTCTAGGTCCTC
GAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGGGAGGGGCCTGCGGGC
GTTGGTACCCCTATTTCTTATTGTACGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGAGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATT

- Hongo G

CTGCCAGAGAACCTCGGTCCTGAACTCCACCCTTGAATAAACTA
CCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCCTCGCGCCAGCGGCTTCGGCT
GTTGAGTGCCCGCCAGAGGACCACAACCTTTGTTTTAGTGATGT

CTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTAT
AACCACTCAAGCTCTCGCTTGGTATTGGGGTTCGCGGTTTCGCGG
CTCCTAAAATCAGTGGCGGTGCCTGTCGGCTCTACGCGTAGTAAT
ACTCCTCGCGTCTGGGTCCGGTAGGTCTACTTGCCAGCAACCCCC
AATTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

- Hongo H

NNNNN

- Hongo I

GGACTGTTTCGGACTCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTCTGTG
AACCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTACTATGAAAATTGTCAA
AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGG
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGT
GTTGGGTGCGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGC
GACGCCCGTCTGGTCCTCGAGCGCATGGGGCTCTGTCACTCGCT
CGGGAAGGACCTGCGGGGGTGGTCACACCACTATATTTACCAC
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAA

Bibliografía

Alemu, D., et al. (2022). "Mycelium-based composite: The future sustainable biomaterial." International journal of biomaterials **2022**.

Aly, A. H., et al. (2008). "Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*." Journal of natural products **71**(6): 972-980.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, **25**(17), 3389-3402.

Aparna, V., et al. (2012). "Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment." Chemical Biology & Drug Design **80**(3): 434-439.

Ester bond hydrolysis of membrane phospholipids by Phospholipase A2 and consequent release of fatty acids are the initiating steps of inflammation. It is proposed in this study that the inhibition of phospholipase A2 is one of the ways to control inflammation. Investigations are carried out to identify the mode of inhibition of phospholipase A2 by the n-hexadecanoic acid. It may help in designing of specific inhibitors of phospholipase A2 as anti-inflammatory agents. The enzyme kinetics study proved that n-hexadecanoic acid inhibits phospholipase A2 in a competitive manner. It was identified from the crystal structure at 2.5 Å resolution that the position of n-hexadecanoic acid is in the active site of the phospholipase A2. The binding constant and binding energy have also been calculated using Isothermal Titration Calorimetry. Also, the binding energy of n-hexadecanoic acid to phospholipase A2 was calculated by in silico method and compared with known inhibitors. It may be concluded from the structural and kinetics studies that the fatty acid, n-hexadecanoic acid, is an inhibitor of phospholipase A2, hence, an anti-inflammatory compound. The inferences from the present study validate the rigorous use of medicated oils rich in n-hexadecanoic acid for the treatment of rheumatic symptoms in the traditional medical system of India, Ayurveda.

Attias, N., et al. (2017). "Developing novel applications of mycelium based bio-composite materials for design and architecture." Proceedings of building with biobased materials: best practice and performance specification **1**(10).

Bajpai, V. K. (2016). "Antimicrobial secondary metabolites from marine fungi: A mini review."

Bisignano, G., et al. (2001). "In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L." FEMS Microbiology Letters **198**(1): 9-13.

Brian, P., et al. (1953). "Canescin, an antibiotic produced by *Penicillium canescens*." Transactions of the British Mycological Society **36**(3): 243-247.

Bruscato, C., et al. (2019). "High performance of macrofungi in the production of mycelium-based biofoams using sawdust — Sustainable technology for waste reduction." Journal of Cleaner Production **234**: 225-232.

Expanded polystyrene (EPS) is a synthetic polymer that is widely applicable in the fields of food packaging, equipment protection and civil construction. Aiming to replace EPS, biofoams were developed utilizing mycelia of the macrofungi *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus albidus* and *Lentinus velutinus* in a medium formulated with sawdust and wheat bran. Sample characterization was obtained by scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis and infrared spectroscopy with Fourier Transform; density and compression strength were analysed as mechanical properties. The main results include that the compression strengths of biofoams from *P. sanguineus*, *P. albidus* and *L. velutinus* were 1.3, 0.4, and 1.3 MPa, respectively, which exceed that of EPS (0.4 MPa). The thermal stability of the biofoams was lower than that of EPS; however, they were stable up to 350 °C. Biofoams are denser than EPS, with values of 0.3 and 0.03 g cm⁻³, respectively. The data obtained for biofoams categorize this material as sustainable substitute for EPS in some applications, while at the same time, reducing the environmental impact caused by sawdust and EPS.

Caro, Y., et al. (2017). "Pigments and colorants from filamentous fungi." Fungal metabolites: 499-568.

Cerimi, K., et al. (2019). "Fungi as source for new bio-based materials: a patent review." Fungal Biology and Biotechnology **6**(1).

Chattopadhyay, P., et al. (2008). "Biotechnological potential of natural food grade biocolorants." African Journal of biotechnology **7**(17).

Cheng, M.-C., et al. (2015). "Antioxidant Properties of Essential Oil Extracted from *Pinus morrissonicola* Hay Needles by Supercritical Fluid and Identification of Possible Active Compounds by GC/MS." Molecules **20**(10): 19051-19065.

Cruz Carrillo, A., et al. (2010). "Toxicología de las dioxinas y su impacto en la salud humana." Revista de Medicina Veterinaria(19): 73-84.

Doyle, J. J. (1990). "Isolation of plant DNA from fresh tissue." Focus **12**: 13-15.

Dufossé, L. (2006). "Microbial production of food grade pigments." Food technology and Biotechnology **44**(3): 313-321.

Edgcomb, V. P., et al. (2011). "Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority." Environmental microbiology **13**(1): 172-183.

Elkhateeb, W. A. and G. M. Daba (2019). "The amazing potential of fungi in human life." ARC J. Pharma. Sci. AJPS **5**(3): 12-16.

Elsacker, E., et al. (2019). "Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates." PLOS ONE **14**(7): e0213954.

Feng, L., et al. (2010). "The effect of regional ocean-atmosphere coupling on the long-term variability in the Pacific Ocean." Advances in Atmospheric Sciences **27**(2): 393-402.

Fouillaud, M., et al. (2017). "Biodiversity of Pigmented Fungi Isolated from Marine Environment in La Réunion Island, Indian Ocean: New Resources for Colored Metabolites." Journal of Fungi **3**(3): 36.

Frandsen, R. J., et al. (2016). "Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin." Scientific Reports **6**(1): 26206.

Fuentes, M., et al. (2014). "Actividad antifúngica de melanina en cepas clínicas de *Candida* spp." Revista chilena de infectología **31**(1): 28-33.

Furci George-Nascimento, G. M. "Guía de campo Hongos de Chile."

Garcés de Granada, E., et al. (2003). "Morfología y Clasificación de los Hongos."

Gessner, M. O. (2020). Ergosterol as a Measure of Fungal Biomass, Springer International Publishing: 247-255.

Gilbert, J. A. and B. Stephens (2018). "Microbiology of the built environment." Nature Reviews Microbiology **16**(11): 661-670.

Girometta, C., et al. (2019). "Physico-mechanical and thermodynamic properties of mycelium-based biocomposites: A review." Sustainability **11**(1): 281.

Glaziou, P., et al. (1993). "Comparison of ivermectin and benzyl benzoate for treatment of scabies." Trop Med Parasitol **44**(4): 331-332.

A randomized investigator-blinded trial of oral ivermectin 100 micrograms/kg single dose vs. benzyl benzoate 10% application in the treatment of scabies, was conducted in 1992 in French Polynesia. In total, 44 patients aged 5-56 years were included in the study: 23 in the group ivermectin (IVER) and 21 in the group benzyl benzoate (BB). At day 30 after treatment, the cumulative recovery rates were 70% (16/23) in the group IVER, and 48% (10/21) in the group BB, 95% confidence intervals

51-87% and 29-70% respectively. The rates of recovery were greater in the group IVER at day 7, 14 and 30, but the difference was not statistically significant. Our results show that oral ivermectin is a valuable alternative to benzyl benzoate local treatment.

Grossart, H.-P., et al. (2019). "Fungi in aquatic ecosystems." Nature Reviews Microbiology **17**(6): 339-354.

Fungi are phylogenetically and functionally diverse ubiquitous components of almost all ecosystems on Earth, including aquatic environments stretching from high montane lakes down to the deep ocean. Aquatic ecosystems, however, remain frequently overlooked as fungal habitats, although fungi potentially hold important roles for organic matter cycling and food web dynamics. Recent methodological improvements have facilitated a greater appreciation of the importance of fungi in many aquatic systems, yet a conceptual framework is still missing. In this Review, we conceptualize the spatiotemporal dimensions, diversity, functions and organismic interactions of fungi in structuring aquatic food webs. We focus on currently unexplored fungal diversity, highlighting poorly understood ecosystems, including emerging artificial aquatic habitats.

Kim, K., et al. (1988). "Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*." Phytopathology **78**(4): 488-492.

Kumar, P. and P. K. Shukla (2015). Antimicrobial activities of hexacosane isolated from *Sanseveria liberica* (Gerome and Labroy) plant.

Li, F., et al. (2017). "GC–MS, FTIR and Raman analysis of antioxidant components of red pigments from *Stemphylium lycopersici*." Current microbiology **74**(4): 532-539.

López, C. M. and J. R. L. Cánepa (2013). "Poliestireno expandido (EPS) y su problemática ambiental." Emerging Trends in Education **19**(36): 9.

Mani, V. M., et al. (2015). "Antioxidant and antimicrobial evaluation of bioactive pigment from *Fusarium* sp. isolated from stressed environment." Int J Curr Microbiol App Sci **4**(6): 1147-1158.

Martínez, A. C., et al. (2014). "Contaminación generada por colorantes de la industria textil." Vida Científica Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 4 **2**(3).

Meléndez-Martínez, A. J., et al. (2007). "Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas." Archivos latinoamericanos de nutrición **57**(2): 109-117.

Meyer, V., et al. (2020). "Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper." Fungal Biology and Biotechnology **7**(1): 5.

Meyer, V., et al. (2020). "Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper." Fungal Biol Biotechnol **7**: 5.

Fungi have the ability to transform organic materials into a rich and diverse set of useful products and provide distinct opportunities for tackling the urgent challenges before all humans. Fungal biotechnology can advance the transition from our petroleum-based economy into a bio-based circular economy and has the ability to sustainably produce resilient sources of food, feed, chemicals, fuels, textiles, and materials for construction, automotive and transportation industries, for furniture and beyond. Fungal biotechnology offers solutions for securing, stabilizing and enhancing the food supply for a growing human population, while simultaneously lowering greenhouse gas emissions. Fungal biotechnology has, thus, the potential to make a significant contribution to climate change mitigation and meeting the United Nation's sustainable development goals through the rational improvement of new and established fungal cell factories. The White Paper presented here is the result of the 2nd Think Tank meeting held by the EUROFUNG consortium in Berlin in October 2019. This paper highlights discussions on current opportunities and research challenges in fungal biotechnology and aims to inform scientists, educators, the general public, industrial stakeholders and policymakers about the current fungal biotech revolution.

Panzarini, Rodolfo N. (1984). "Introducción a la oceanografía general / Rodolfo N. Panzarini". 3a edición.

Poorniammal, R., et al. (2013). "Natural dye production from *Thermomyces* sp fungi for textile application."

Poorniammal, R., et al. (2019). "Subacute dermal toxicity of *Thermomyces* sp. and *Penicillium purpurogenum* pigments in wistar rats." Int. J. Chem. Stud 7(1): 630-634.

Raghukumar, C., et al. (2010). "A review on deep-sea fungi: occurrence, diversity and adaptations." Botanica Marina 53(6): 479-492.

Ramesh, C., et al. (2019). "Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications." Microorganisms 7(7): 186.

Rao, M., et al. (2017). Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. Front Microbiol 8: 1113.

Sen, T., et al. (2019). "Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward." Frontiers in nutrition 6: 7.

Senga, Y., et al. (2018). "Influence of parasitic chytrids on the quantity and quality of algal dissolved organic matter (AOM)." Water Research 145: 346-353.

Sezgin, A. C., et al. (2017). "Food additives: colorants." Science within Food: Up-to-Date Advances on Research and Educational Ideas: 87-94.

Sharma, K., et al. (2007). "A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests." Chemosphere 69(1): 48-54.

Stroescu, M., et al. (2015). "Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties." Food Hydrocolloids **48**: 62-71.

In this work there are described the obtaining and characterization of composite films containing chitosan, vanillin and Tween 60. Vanillin was used as cross-linker of chitosan. The composites were characterized by various methods like Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD) and solid state ¹³C nuclear magnetic resonance (CP/MAS ¹³C NMR), which have proved the formation of a Schiff base between chitosan and vanillin. Scanning electron microscopy (SEM) has also enlightened a strong interaction between the components. Tween 60 has influenced the value of water vapour transmission rate (WVTR), all the composites that contain Tween 60 having a low value of this parameter. Due to the fact that not all the vanillin is consumed in the Schiff base reaction, these composites could be used for vanillin delivery. After having studied the release behaviour we have concluded that most probably it is governed by crystal dissolution and Fick's diffusion law. Antimicrobial activity was highlighted using *Escherichia coli* (ATCC 8737) strain, all the composites having a good antimicrobial activity.

Sun, W., et al. (2019). "Fully Bio-Based Hybrid Composites Made of Wood, Fungal Mycelium and Cellulose Nanofibrils." Scientific Reports **9**(1).

Susel, G. D. E., et al. (2021). "Biomaterial obtenido a partir de micelio de hongo (*ganoderma lucidum*) y residuos agrícolas." South Florida Journal of Development **2**(3): 4663-4681.

Overy, D. P., et al. (2019). "The Neglected Marine Fungi, *Sensu stricto*, and Their Isolation for Natural Products' Discovery." Marine Drugs **17**(1): 42.

Tamallo Cevallos, R. (2020). "Hongos marinos lignícolas en ecosistemas de manglar." Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas **41**(2): 95-106.

Vanitha, V., et al. (2020). "Heneicosane—A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L." Industrial Crops and Products **154**: 112748.

Today the quick advancement of multi drug resistance in microorganisms is expanding worldwide and the related medical issues for the treatment of infectious diseases that researchers claim could return to the stage of the pre-antibiotic era. Medicinal plants possess a potential holistic role for the provision of drugs to cure microbial infections. The present work, has aimed to isolate and analyze the new bioactive molecule and to test their antimicrobial activities from the *Plumbago zeylanica* L leaf extracts. For analyzing the phytochemistry and microbicidal activities of the herb, extracts with various solvents have been used. The various crude leaf extracts with antimicrobial activity was treated against pathogenic microorganisms such as two Gram positive, two Gram negative, one acid fast staining bacteria and one fungus using agar well method. New bioactive molecule was isolated via GC–MS, TLC, HPLC, FTIR and NMR spectrum. Current study had used ethyl acetate leaf extract and exhibited excellent antimicrobial activity compared with other extracts and conventional drugs. The ethyl acetate extract was analyzed by GC–MS which was detected in fifteen compounds, followed by TLC analysis to elucidate the ten compounds with ten fractions. Among the active fractions, a single compound was detected using HPLC analysis. The identified bioactive molecule Heneicosane was used for measuring the antimicrobial activity. Depending on the results obtained, it was verified that heneicosane exhibited excellent antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* 31 ± 0.64 mm and *Aspergillus fumigatus* 29 ± 0.86 mm respectively at $10 \mu\text{g/ml}$ concentrations. Hence this study derives its novelty in isolating the bioactive molecule with pronounced microbicidal role from the herbal source mentioned.

Villa-Ruano, N., et al. (2019). "Volatile Composition and Biological Activities of the Leaf Essential Oil from *Zanthoxylum limoncello* Grown in Oaxaca, México." Chemistry & Biodiversity **16**(2): e1800498.

Wang, L., et al. (2019). "A metabolite of endophytic fungus *Cadophora orchidicola* from *Kalimeris indica* serves as a potential fungicide and TLR 4 agonist." Journal of Applied Microbiology **126**(5): 1383-1390.

Weidman, S. and E. Kaiser (1966). "The mechanism of the periodate oxidation of aromatic systems. III. A kinetic study of the periodate oxidation of catechol." Journal of the American Chemical Society **88**(24): 5820-5827.

White, T. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc.

Wu, W., et al. (2015). Chapter 41 - *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton and J. Schwartzman. Boston, Academic Press: 753-767.

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous environmental bacterium which causes opportunistic human infections. A large number of metabolic pathways and regulatory genes make this bacterium highly adaptive to various growth conditions. Its nutritional versatility, large number of virulence factors and high antibiotic resistance make this bacterium extremely difficult to eradicate from infected individuals, especially lung infections of cystic fibrosis patients. Key features of the bacterium related to its virulence genes and their regulation, antibiotic resistance and future trends of anti-*Pseudomonas* approaches are discussed.

Zhai, M.-M., et al. (2016). "The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species." Natural Products and Bioprospecting **6**(1): 1-24.

Noticia Diario El mostrador: "**Plumavit: ¿por qué es de los plásticos que más problemas ambientales genera?**" <https://www.elmostrador.cl/agenda-pais/2019/07/22/plumavit-por-que-es-de-los-plasticos-que-mas-problemas-ambientales-genera/>