Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial –PUIDI–

INFORME FINAL

DIVERSIDAD Y BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS ANAMORFOS EN GUATEMALA (FASE II): POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBACTERIANOS, ENZIMAS Y SOLUBILIZACIÓN DE COMPUESTOS INORGÁNICOS DE FÓSFORO

Equipo de Investigación

Licda. María del Carmen Bran González (Coordinadora)

Lic. Osberth Morales Esquivel

Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos

09 de enero de 2018

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS –IIQB–

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar

Coordinador General de Programas

Inga. Liuba María Cabrera Ovalle de Villagrán

Coordinadora de programa –PUIDI–

Licda. María del Carmen Bran González

Coordinadora de proyecto

Lic. Osberth Morales Esquivel

Investigador

Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos

Investigador

Partida Presupuestaria

4.8.63.6.10

Año de ejecución: 2018

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2018. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.6.10 durante el año 2018 en el Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial

Financiamiento aprobado por Digi: Q318,043.15 Financiamiento ejecutado: Q302,280.24

Índice

1. Resumen....1
2. Palabras clave....1
3. Abstract....2
4. Introducción....3
5. Planteamiento del problema....4
6. Preguntas de investigación....5
7. Delimitación en tiempo y espacio....5
8. Marco teórico....6
9. Estado del arte....10
10. Objetivo general....12
11. Objetivos específicos....12
12. Hipótesis....13
13. Materiales y métodos....14
14. Vinculación, difusión y divulgación....18
15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:....22
16. Análisis y discusión de resultados:....43
17. Conclusiones....48
18. Impacto esperado....49
19. Referencias....49
20. Apéndice....54

Índice de figuras

Figura 1 …… 33
Figura 2 …… 34
Figura 3 …… 35
Figura 4 …… 36
Figura 5 …… 37
Figura 6 …… 38
Figura 7 …… 39
Figura 8 …… 40
Figura 9 …… 41
Figura 10 …… 42

Índice de tablas

Tabla 1 …… 22
Tabla 2 …… 23
Tabla 3 …… 25
Tabla 4 …… 26
Tabla 5 …… 27
Tabla 6 …… 29
Tabla 7 …… 30
Tabla 8 …… 31
Tabla 9 …… 32

Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (fase II): Potencial biotecnológico para la producción de antibacterianos, enzimas y solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo.

1. Resumen

Los hongos anamorfos son gran importancia ya que producen una amplia variedad de sustancias como antibióticos, diversas enzimas y compuestos que contribuyen con la formación y la fertilidad del suelo, lo cual puede ser de gran beneficio para la humanidad. En Guatemala no se cuenta con ninguna investigación sobre el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos nativos, a pesar de que en la actualidad existe un gran interés en su estudio. Por lo anterior se estableció el potencial biotecnológico de 40 cepas de hongos anamorfos nativos, a través de la evaluación de su capacidad antibacteriana, la producción de lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y lecitinasas y la solubilización de fósforo inorgánico. Lass cepas se inocularon en medios de cultivo específicos. Se determinó que el 35% (14) de las cepas mostraron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, en tanto que contra *Pseudomonas aeruginosa* fue el 17.5% (7) y contra *Staphylococcus aureus* 22.5% (9). El 70% (28) de las cepas estudiadas produjeron lacasas, el 87.5% (35) proteasas, el 92.5% (37) amilasas, el 95.0% (38) celulasas, el 50.0% (20) lipasas y el 55.0% (22) lecitinasas. El 67.5% (27) de las cepas estudiadas mostraron capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos de fósforo. Lo hallazgos encontrados indican que existen cepas promisorias para la producción de antibióticos y enzimas industriales, así como para la solubilización de fósforo inorgánico.

2. Palabras clave

Metabolitos secundarios, hongos asexuales, conidiales.

3. Abstract

Anamorphic fungi are very important because they produce a wide variety of substances such as antibiotics, enzymes and compounds that contribute to the formation and fertility of the soil. In Guatemala there are not studies on the biotechnological potential of native anamorphic fungi, although there is currently a great interest in their study. For this, the biotechnological potential of 40 strains of native anamorphic fungi was established, through the evaluation of their antibacterial capacity, the production of laccases, proteases, amylases, cellulases, lipases and lecithinases and the solubilization of inorganic phosphorus. Strains were inoculated in specific culture media to demonstrate the production of interesting substances. It was determined that 35% (14) of the strains showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, while against *Pseudomonas aeruginosa* it was 17.5% (7) and against *Staphylococcus aureus* 22.5% (9). 70% (28) of the strains studied produced laccases, 87.5% (35) proteases, 92.5% (37) amylases, 95.0% (38) cellulases, 50.0% (20) lipases and 55.0% (22) lecithinases. 67.5% (27) of the strains studied showed the ability to solubilize inorganic phosphorus compounds. The findings indicate that there are promising strains for the production of antibiotics and industrial enzymes, as well as for the solubilization of inorganic phosphorus.

Keywords: Secondary metabolites, asexual fungi, conidial.

4. Introducción

Los hongos anamorfos o conidiales son uno de los grupos más diversos del *Phylum* Ascomycota (reino Fungi), cuya principal característica es la reproducción asexual por mitosis (Seifert, Morgan-Jones, Gams & Kendrick, 2011). El crecimiento de estos hongos se lleva a cabo por medio de hifas, las cuales se ramifican y originan conglomerados denominados micelio (Kirk, Cannon, Minter & Stalpers, 2008; Papagianni, 2004).

Los hongos anamorfos son un grupo de gran importancia ya que producen una amplia variedad de sustancias como parte de su metabolismo secundario, así como diversas enzimas, ácidos orgánicos, alcoholes y polisacáridos, entre otros, muchos de los cuales son de utilidad para la salud humana (Gamboa & García, 2008). Por otra parte, contribuyen con la formación y la fertilidad del suelo, ya que los ácidos orgánicos producidos por ellos participan en la solubilización de compuestos inorgánicos, entre ellos, los de fósforo (Dighton, 2007).

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los antibióticos, los cuales, desde el descubrimiento de la penicilina producida por el anamorfo *Penicillium notatum*, se ha avanzado en el desarrollo de los procesos industriales de muchos otros antibióticos, entre ellos las cefalosporinas, la equinocardina B y el ácido fusídico (Papagianni, 2004).

Por otra parte, muchas de las enzimas de uso industrial se originan a partir de hongos anamorfos y son de utilidad por su acción hidrolítica (carbohidrasas, proteasas y lipasas) las cuales degradan una gran cantidad de compuestos. Las proteasas por ejemplo, tienen un gran uso tanto en la industria de producción de alimentos como en la de producción de detergentes. Las carbohidrasas tales como celulasas, xianasas, amilasas y pectinasas se utilizan en la industria de producción de papel, textiles, detergentes y alcoholes, así como en la elaboración de almidón y alimentos (Gudynaite-Savitch & White, 2016).

Además, los productos de origen fúngico han trascendido más allá de sus propiedades antibióticas e industriales, puesto que también son de utilidad en la agricultura y ambiente (Adrio & Demian, 2003; Yamada et al., 2007). En este sentido, muchos hongos producen ácidos orgánicos los cuales son capaces de alterar la solubilidad de sustancias inorgánicas presentes en el suelo, entre las que puede mencionarse los compuestos de fósforo, con lo que contribuyen no solamente a la formación de la estructura del suelo, sino también en la fertilidad del mismo (Sinsabaugh, 2005).

Aunque los hongos anamorfos son reconocidos como una fuente importante de metabolitos secundarios, enzimas con actividad biológica, aplicaciones industriales y ambientales, en

Guatemala no se tiene conocimiento de ningún estudio en el que se haya evaluado el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos nativos, a pesar de que en la actualidad existe un gran interés por su estudio, debido a que son una fuente prolífica de una gran diversidad de productos naturales con diversas propiedades biológicas de gran beneficio para la humanidad (Estebanez, Heredia & Gamboa, 2008).

Por lo anterior, en este proyecto de investigación, se propuso establecer el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos a través de la evaluación de su capacidad antibacteriana, la evaluación de la producción de lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y lecitinasas y la solubilización de fósforo inorgánico, para lo cual se utilizaron 40 cepas de hongos anamorfos aislados durante la primera fase del proyecto "Diversidad y bioprospección de hongos anomorfos en Guatemala (fase I): taxonomía, ecología y aislamiento en dos localidades del centro del país" (Bran, Morales, & Figueroa, 2017). Dichas cepas se inocularon en medios de cultivo específicos para evidenciar la producción de antibióticos, enzimas y la solubilización de compuestos de fósforo inorgánico. La importancia de esta investigación radica en dar a conocer el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos nativos, a través de la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, enzimas de interés industrial y la acción en el ciclo del fósforo.

5. Planteamiento del problema

Los microorganismos se han reconocido como fuente de bienes y servicios de beneficio para la humanidad, no obstante se estima que menos del 1% de la diversidad microbiana se ha aislado y un porcentaje aún menor ha sido evaluado para la obtención de productos con interés para el ser humano. Asimismo, las zonas tropicales y subtropicales entre las que se encuentra Guatemala han sido poco exploradas no solo en cuanto a diversidad sino también en cuanto a la aplicación o el uso que esta puede tener (Gamboa & García, 2008; Shin, Lee, Park, & Kim, 2011).

Los hongos anamorfos son reconocidos como una fuente importante de metabolitos secundarios y enzimas con actividad biológica y aplicaciones industriales. En Guatemala se ha avanzado significativamente en el estudio de la actividad biocida de alrededor de 650 plantas que se desarrollan en el país (Cáceres, 2015), sin embargo no se cuenta con ningún estudio sobre el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos nativos, a pesar de que en la actualidad existe un gran interés en la investigación de antibióticos, enzimas fúngicas y otras propiedades de dichos hongos, ya que se ha demostrado que son una fuente prolífica de una gran diversidad de productos

naturales, a los cuales, como se mencionó anteriormente se les ha atribuido diversas propiedades biológicas de gran beneficio para la humanidad (Estebanez et al., 2008).

Por lo anterior, aunque Guatemala cuenta con una gran variedad de hongos anamorfos de los cuales ya se han identificado taxonómicamente y aislado varias especies (Bran et al., 2017), aún hacen falta investigaciones con las cuales se evidencie el alto potencial que pueden tener en la búsqueda de nuevos antibióticos, enzimas y compuestos de interés agronómico como solubilizadores de compuestos de fósforo inorgánico.

6. Preguntas de investigación

- ¿Las cepas de hongos anamorfos poseen potencial biotecnológico para la producción de antibacterianos, enzimas y solubilizadores de compuestos inorgánicos de fósforo?

7. Delimitación en tiempo y espacio

El estudio se realizó en un periodo de tiempo comprendido entre febrero a noviembre de 2018. Se inició con la revitalización de las cepas en el mes de febrero, luego se realizaron las pruebas de producción de enzimas y la solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo, de marzo a agosto y la evaluación de la producción de antibacterianos se realizó de septiembre a noviembre.

Este estudio no contempló muestreos de campo, las pruebas se realizaron a nivel de laboratorio.

8. Marco teórico

Hongos anamorfos o conidiales

Los hongos anamorfos o conidiales son un grupo diverso de microorganismos que se encuentran principalmente en el *Phylum* Ascomycota y cuya forma de reproducción es por vía asexual o mitótica (Seifert et al., 2011). La morfología que presentan es compleja y exhiben diferentes formas durante su ciclo de vida. La estructura vegetativa de crecimiento consiste en filamentos tubulares llamados hifas, las cuales se originan de la germinación de una sola espora. Dicha hifa continúa su proceso de crecimiento y se ramifica repetidamente para formar una masa de filamentos conocida como micelio, sobre el cual se producen las esporas asexuales (Kirk et al., 2008; Papagianni, 2004). La reproducción asexual se lleva a cabo por la formación de esporas asexuales conocidas como conidios, clamidoconidios o esclerocios (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996; Kirk et al., 2008). Los conidios son esporas que carecen de movilidad y se forman a partir de células especializadas denominadas "células conidiógenas", las cuales pueden estar sobre un conidióforo, los que a su vez pueden estar organizados en cuerpos fructíferos llamados acérvulos, picnidios, esporodoquios o sinemas (Webster & Weber, 2007).

Los hongos anamorfos, en el funcionamiento de los ecosistemas cumplen el papel de organismos saprobios ya que se nutren de materia orgánica muerta, por lo que forman parte de los microorganismos responsables de mantener los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y potasio en la naturaleza. Por lo anterior, se les considera los organismos degradadores por excelencia ya que son los principales agentes de la descomposición de la materia orgánica en la hojarasca y el suelo (Cepero, Restrepo, Franco-Molano, Cárdenas, & Vargas, 2012; Jensen, 1974). Por otra parte, son ampliamente reconocidos por ser una fuente prolífica de una gran diversidad de metabolitos secundarios y enzimas, a los cuales se les han atribuido diversas propiedades biológicas de gran beneficio para la humanidad (Estebanez et al., 2008).

Potencial biotecnológico de los hongos anamorfos

Hoy en día los hongos anamorfos son un grupo de microorganismos que se utilizan a escala mundial, ya que se usan en muchos procesos industriales tales como la producción de metabolitos secundarios (como antibióticos, toxinas, alcaloides y pigmentos) y enzimas, algunos de los cuales se producen comercialmente y tienen un potencial muy valioso en biotecnología (Adrio & Demain, 2003).

Los metabolitos secundarios fúngicos son moléculas estructuralmente heterogéneas y de bajo peso molecular, los cuales no son requeridos directamente para el crecimiento de los hongos. La producción de dichos metabolitos y su gran diversidad es el resultado evolutivo de la interacción de los hongos con otros microorganismos de los ecosistemas (bacterias, protozoos y metazoos), con los cuales se comunican mediante señales químicas para defender su hábitat o para competir o inhibir el crecimiento (Brakhage, 2012).

Por otra parte, los hongos anamórficos se caracterizan por su extraordinaria capacidad de producir una gran cantidad de proteínas, entre ellas muchas enzimas, las cuales son secretadas o son liberadas por lisis de las células. De cualquier forma, dichas enzimas son liberadas directamente al ambiente en el cual actúan como agentes funcionalmente autónomos y cuya actividad está determinada por las condiciones ambientales y por una gran cantidad de reacciones biogeoquímicas (Sinsabaugh, 2005). Las enzimas fúngicas contribuyen con la degradación de los restos de plantas y animales muertos, lo cual resulta en la degradación de moléculas orgánicas complejas, lo que a su vez contribuye con la fertilidad y formación del suelo (Dighton, 2007).

En este sentido, la estructura del suelo está directamente relacionada con el balance entre la descomposición y la solubilización de las rocas presentes en el mismo. Al respecto, muchos hongos producen por ejemplo ácidos orgánicos los cuales son capaces de solubilizar las rocas. Por ejemplo, diversos hongos son capaces de solubilizar compuestos como fosfato de calcio, fluoroapatita y biotita, entre otros, por lo que juegan un importante papel en la biogénesis de los suelos (Dighton, 2007).

En conclusión, en la actualidad estos hongos se consideran como fábricas celulares debido a la gran cantidad de compuestos que producen y se utilizan ampliamente para producir ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, entre otros (Papagianni, 2004). Algunos géneros como *Aspergillus, Penicillium, Talaromyces, Acremonium, Fusarium* y *Rhizopus*, producen compuestos que en la actualidad se comercializan a nivel global, por lo que el impacto de estos organismos en el mundo es muy significativo (Sinsabaugh, 2005).

Producción de enzimas

Las enzimas producidas por los hongos anamorfos juegan un papel central en la producción industrial de las mismas, las cuales tienen múltiples aplicaciones que van desde la manufactura de productos alimenticios hasta el blanqueamiento de pulpa en la industria de producción de papel. En este sentido, el mercado mundial de dichas enzimas en la década pasada superó los $ 2 billones de dólares y en la actualidad dicha industria crece entre 5-10% anualmente. Actualmente la producción de enzimas fúngicas está dirigido a tres principales aplicaciones: 1) enzimas para la producción de pulpa en la industria de papel, textiles y detergentes industriales; 2) enzimas para el procesamiento de alimentos tales como almidón, producción de cerveza y fabricación de quesos; y 3) enzimas para la producción de alimentos para animales (Nevalainen & Te'o, 2003).

Por otra parte, la mayoría de enzimas de uso industrial se utilizan por su acción hidrolítica y se dividen en carbohidrasas, proteasas y lipasas, las cuales degradan una gran cantidad de compuestos. Las proteasas por ejemplo, tienen un gran uso tanto en la industria de producción de alimentos como en la de producción de detergentes. Las carbohidrasas (enzimas que degradan carbohidratos), tales como celulasas, xianasas, amilasas y pectinasas se utilizan en la industria de producción de papel, textiles, detergentes y alcoholes, así como en la elaboración de almidón y alimentos (Gudynaite-Savitch & White, 2016).

Algunos ejemplos de hongos que se utilizan en producción industrial, son diversas especies de *Aspergillus* (*A. oryzae* y *A. niger*) que producen α-amilasa, lipasas, pectinasas y proteasas, entre otras, las cuales se generan en su mayoría por fermentación en cultivo sumergido (Papagianni, 2004). Asimismo, una glucoamilasa producida por *A. niger* se utiliza para la conversión de almidón y otros edulcorantes a etanol. *Trichoderma reesei* produce varias celulasas las cuales degradan la celulosa a azúcares simples (Quintanilla, Hagemann, Hansen, & Gernaey, 2015).

Aunque las ventajas de reemplazar tratamientos químicos convencionales por el de enzimas suelen ser principalmente desde el punto de vista ambiental, las enzimas fúngicas deben competir económicamente con procesos químicos y mecánicos tradicionales a menudo baratos, por lo que la competitividad comercial de enzimas en un determinado proceso de reacción enzimática industrial dependerá en gran medida de: 1) las propiedades enzimáticas, como la especificidad enzimática al sustrato, actividad catalítica y la eficacia en las condiciones del proceso industrial; y 2) El costo de la producción enzimática que depende directamente de los rendimientos de la enzima obtenida del proceso de fermentación de microorganismos (Gudynaite-Savitch & White, 2016).

Producción de antibióticos

En el año 1928, Alexander Fleming comenzó la era de los antimicrobianos a través del estudio de un hongo capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el cual fue identificado como *Penicillium notatum*, un hongo anamorfo a partir del cual fue aislada la penicilina que tuvo un papel fundamental durante la segunda guerra mundial. Así pues, los hongos anamórficos han sido de utilidad en la salud y el bienestar de las personas debido principalmente a la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Estos compuestos han sido ampliamente utilizados por farmaceúticas y en la actualidad constituyen una industria de gran importancia económica alrededor del mundo (Demain & Sanchez, 2009; Trigos, Onorio, Espinoza, & Morales, 2006).

En las últimas décadas muchos otros compuestos han sido aislados de hongos anamorfos entre los que puede mencionarse las cefalosporinas a partir de *Acremonium chrysogenum*, *A. kiliense, Fusarium solani* y *Nectria lucida;* griseofulvina proveniente de *P. griseofulvum*, *P. aurantiumgriseum* y *P. italicum;* la equinocardina B producida por *A. nidulans* y *A. rugulosus;* y el ácido fusídico obtenido de *Calcarisporium arbuscula, F. coccophilum* y *Mortiella rumannianua* (Papagianni, 2004). En la actualidad, el papel de los hongos en la producción de antibióticos se basa en la búsqueda de nuevas sustancias activas que reemplacen aquellas para las que varios microorganismos han desarrollado resistencia (Demain & Sánchez, 2009).

Solubilización de compuestos inorgánicos del fósforo

El fósforo se encuentra en el suelo, plantas y microorganismos en cierto número de compuestos orgánicos e inorgánicos. Después del nitrógeno, es el segundo de los nutrientes inorgánicos requeridos tanto por plantas como por microorganismos, su principal función fisiológica radica en algunos pasos esenciales en la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular. Este elemento puede ser incorporado como hojarasca, residuos vegetales o restos animales y además existe de forma inorgánica como compuestos de apatita. Así pues, El fósforo existe en la naturaleza en una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, no obstante mayoritariamente en formas insolubles o muy poco solubles (Alexander, 1980).

Los hongos anamorfos llevan a cabo cierto número de transformaciones del fósforo. Entre estas puede mencionarse la alteración de la solubilidad de compuestos inorgánicos del fósforo, la mineralización de compuestos orgánicos con la liberación de fosfato inorgánico, la conversión del

anión inorgánico aprovechable en componentes celulares, procesos de inmovilización y oxidaciones y reducciones. Cabe mencionar que la disponibilidad del fósforo para las plantas está determinada por la continua relación de estos procesos (Alexander, 1980). Lo anterior indica que las actividades solubilizadoras de compuestos inorgánicos por parte de los hongos contribuye no solamente a la formación de la estructura del suelo, sino también en la fertilidad del mismo (Sinsabaugh, 2005).

9. Estado del arte

Los compuestos obtenidos a partir de microorganismos tales como los hongos anamorfos en la actualidad proveen un campo fascinante y de recursos inagotables donde se combina la diversidad fúngica con la riqueza de productos naturales (Manoharachary et al., 2005).

En esta misma línea, en la actualidad existe un gran interés en la investigación de las enzimas fúngicas, principalmente aquellas que se usan en la industria de la producción de biocombustibles, así como en la sacarificación de materiales lignocelulósicos los cuales podrían posteriormente convertirse en bioetanol (Quintanilla et al., 2015).

Lo anterior ha sido demostrado en muchas investigaciones básicas, las cuales, han generado información de los procesos de producción actualmente utilizados en la obtención de compuestos de hongos anamorfos, por ejemplo, la fermentación en cultivo sumergido y la fermentación en estado sólido, las cuales pueden aplicarse para la producción de varias enzimas fúngicas secretadas y antibióticos (Punt et al., 2002).

Investigaciones recientes se han enfocado hacia la búsqueda de nuevos antibióticos que sean activos contra bacterias resistentes, ya que en la actualidad algunas han desarrollado mecanismos contra la mayoría de agentes antimicrobianos. Lo anterior, se ha dado como consecuencia de que en el año 2004 se estimó que el 70% de las bacterias patógenas eran resistentes por lo menos a uno de los antibióticos utilizados en la actualidad, además, las llamadas superbacterias han estado emergiendo a un ritmo acelerado y que actualmente, son resistentes a la mayoría de los antibióticos conocidos (Demain & Sanchez, 2009). Cabe mencionar que, la solución al problema de la resistencia bacteriana ha dependido principalmente del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, el número de nuevas clases de agentes antimicrobianos que se están desarrollando ha disminuido drásticamente en los últimos años (Levin & Bonten, 2004).

Finalmente, tomando en cuenta que el papel que estos hongos juegan en los ecosistemas está siendo modificado por la contaminación ambiental y el calentamiento global, se debe

investigar ampliamente sobre la función que tienen en el reciclaje de los nutrientes, con la finalidad de establecer su importancia en los ecosistemas (Dighton, 2007).

10. Objetivo general

- Establecer el potencial biotecnológico de cepas de hongos anamorfos, a través de la evaluación de la producción de antibacterianos, enzimas y solubilizadores de compuestos de fósforo inorgánico.

11. Objetivos específicos

- Determinar la actividad antibacteriana de las cepas de hongos anamorfos a través del método de difusión en agar Kirby-Bauer contra cepas ATCC de *E. coli, P. aeruginosa* y *S. aureus.*
- Determinar la producción de lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y lecitinasas de las cepas de hongos anamorfos, a través de su cultivo en medios específicos.
- Establecer la capacidad de las cepas de hongos anamorfos para solubilizar compuestos inorgánicos de fosforo, a través de su cultivo en el medio de Ramos-Callao.

12. Hipótesis

- Al menos una cepa de los hongos anamorfos posee actividad antibacteriana contra cepas ATCC de *E. coli, P. aeruginosa* y *S. aureus.*

- Al menos una cepa de los hongos anamorfos produce una de las siguientes enzimas lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o lecitinasas.

- Al menos una cepa de los hongos anamorfos es capaz de solubilizar compuestos inorgánicos de fósforo.

13. Materiales y métodos

Enfoque y tipo de investigación:

Este estudio posee un enfoque cuantitativo y tiene un alcance exploratorio y descriptivo.

Recolección de la información

Universo: todas las cepas de hongos anamofos aisladas en Guatemala. Muestra: 40 cepas de hongos anamorfos que se encuentran en cultivo axénico y están almacenadas en el cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala aisladas en la primera fase del proyecto "Diversidad y bioprospección de hongos anomorfos en Guatemala (fase I): taxonomía, ecología y aislamiento en dos localidades del centro del país", en el año 2017.

Variables semi-cuantitativas:

Las variables para las pruebas semi-cuantitativas se midieron en términos de diámetros de halos de actividad antimicrobiana y actividad enzimática, los cuales fueron medidos en milímetros (mm). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizaron cinco repeticiones por cada cepa fúngica y microorganismo en un medio de cultivo, se trabajaron cinco cepas al día. Para la producción de lacasas, proteasas, celulasas y solubilizadores de fosforo inorgánico se realizaron cinco repeticiones por cepa y por medio específico, se trabajaron cinco cepas al día. Las réplicas se establecieron por conveniencia del estudio.

Variables cuantitativas:

Los datos para la prueba cuantitativa de producción de amilasas se midieron en términos Unidades amilolíticas por decilitro (UA/dL). Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa fúngica en el medio específico. Las réplicas se establecieron por conveniencia del estudio.

Variables cualitativas:

Los datos para las pruebas cualitativas, en el caso de la prueba de lipasa se observaron por la presencia o ausencia de zonas opalescentes y precipitado, mientras que para la prueba de lecitinasa se observó la presencia o ausencia de un brillo iridiscente. Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa fúngica en el medio específico. Las réplicas se establecieron por conveniencia del estudio.

Técnicas

Revitalización de cepas y extracción: Se realizaron cultivos de cepas fúngicas en agar papa dextrosa (PDA), estos fueron incubados durante 7 días a 25°C. Posteriormente se tomaron círculos de 1.0 cm de diámetro de cada una de las cepas fúngicas y se transfirieron asépticamente a Erlenmeyer de 250.0 ml con 50.0 ml de caldo PDA, donde se incubaron a 25 ± 2°C por 15 días manteniéndose en agitación constante a 150 rpm. Una vez concluido el periodo de incubación, se filtraron al vacío los extractos acuosos producidos por cada cepa fúngica y se almacenó en refrigeración hasta su utilización (Lagunes et al., 2015).

Actividad antibacteriana de los extractos fúngicos: La actividad antibacteriana se evaluó de conformidad con el método semi-cuantitativo de difusión de disco propuesto por Kirby-Bauer. Las pruebas se llevaron a cabo en cajas de Petri con agar Müller-Hinton en donde se inocularon cada una de las cepas bacterianas ATCC en estudio (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27863 y *S. aureus* ATCC 25923*)*, con una suspensión celular equivalente a 0.5 de la escala de McFarland ($1.5x10^8$ UFC/mL) (Lagunes et al., 2015). Posteriormente, sobre las cajas de Petri se colocaron discos de papel filtro (6 mm de diámetro) impregnados con 20.0 µL de cada uno de los extractos fúngicos. Se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo. Las cajas de Petri se incubaron a 35 ± 2°C durante 24 horas. El diámetro de los halos de inibición se midieron en milímetros (Trigos, Mendoza, Luna, Heredia, & Arias, 2005).

Determinación de la actividad productora de lacasas: la actividad de las lacasas fue evaluada por el método semi-cuantitativo en medio extracto de salvado de trigo modificado utilizando como indicador enzimático ABTS. La temperatura de incubación fue de 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días, evaluándose la actividad enzimática por la relación diámetro del halo de degradación/diámetro de la colonia (RHC) (Chaparro & Rosas, 2006).

Determinación de la actividad productora de proteasas: La actividad de las proteasas fue evaluada por medio del método semi-cuantitativo de medición de halos de hidrolisis, a través de la siembra de las cepas en placas de agar leche. La temperatura de incubación fue de 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días. Las cepas proteolíticas producen alrededor de la colonia, un halo de hidrólisis transparente que se distingue sobre el medio turbio. La actividad enzimática fue evaluada por la RHC (Virginia, 1999).

Determinación de la actividad celulolítica: Las cepas fúngicas fueron inoculadas en placas de agar mineral con carboximetilcelulosa 0.1g/L como fuente de carbono, e incubadas durante 8 días a 25°C. Posteriormente se agregó aproximadamente 10.0 mL de la solución colorante rojo congo a una concentración de 0.5 g/L, se dejó reposar por 10 minutos para la visualización y medición de halos de aclaramiento (método semi-cuantitativo), se hicieron tres lavados repetidos con solución NaCl 40.0 g/L para la visualización (Hendricks, Doyle, & Hugley, 1995).

Determinación de la actividad productora de amilasas: las cepas fúngicas fueron inoculadas sobre agar almidón al 1.0%. La temperatura de incubación fue 25°C, las cepas productoras de enzimas hidrólíticas de almidón se detectaron a los 18 días mediante revelador lugol. Posteriormente las esporas fúngicas se suspendieron en Tween 80 al 0.01% y se llevaron a cultivo sobre salvado de trigo esteril en fermentación en fase sólida a 28°C durante 7 días. Las enzimas extracelulares luego de la fermentación en fase sólida se extrajeron con solución al 1.0% de NaCl, en una relación 50.0 mL/100.0 g de salvado, mediante agitación durante 30 minutos y posterior filtración. La actividad enzimática fue medida espectrofotométricamente en términos de absorbancia (Abs) y se expresó en Unidades Amilolíticas (UA/dL), utilizando la siguiente fórmula $\frac{\text{UA}}{\text{dL}} = \frac{Abs\ Basal - Abs\ Muestra}{\text{Abs Basal}} * 1000$ (Sarmiento, Vargas, Pedroza, Matiz, & Poutou, 2003).

Determinación de la actividad lipolítica y determinación de lecitinasas: Las cepas fueron inoculadas en placas con agar yema de huevo, se incubaron durante 10 días a 25°C. La aparición de zonas opalescentes alrededor de las colonias y precipitado confirmó la presencia de la lecitinasa, la presencia de un brillo iridiscente indicó la presencia de lipasas (método cualitativo). La actividad enzimática fue evaluada por la RHC (MacFaddin, 2000).

Solubilización de fósforo: Las cepas fúngicas fueron inoculadas en placas de un medio con fosforo inorgánico según la metodología de Ramos y Callao (1967), la reacción positiva se

observó como un halo de solubilización alrededor del hongo (método semi-cuantitativo). La actividad solubilizadora fue evaluada por la RHC

Instrumentos:

Aparatos y procedimientos técnicos.

Operacionalización de las variables o unidades de análisis:

Tabla 1
Operacionalización de variables

Objetivo específicos	Variables	Técnicas	Instrumentos	Medición o cualificación
Determinar la actividad antibacteriana de las cepas de hongos anamorfos a través del método de difusión en agar Kirby-Bauer contra cepas ATCC de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus.*	Inhibición del crecimiento de cepas de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27863 y *S. aureus* ATCC 25923.	Fermentación en fase líquida y difusión en disco de Kirby-Bauer	Incubadora a 35°C Incubadora a 25°C Incubadora con agitación Refrigeradora Mecheros Cabinas de seguridad Bomba de vacío Asas en argolla, espátula y en L Medios de cultivo Cristalería	Diámetro del halo de inhibición (mm)
Determinar la producción de lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y lecitinasas de las cepas de hongos anamorfos, a través de su cultivo en	Producción de lacasas, proteasas, celulasas	Siembra por disco de agar en medios específicos	Incubadoras a 25°C Refrigeradora Cabina de seguridad Mechero Medios de cultivo Cristalería Asas en argolla, espátula y en L Reglas milimetradas Espectrofotómetro	Diámetro del halo de actividad enzimática (mm)
	Producción de amilasas	Fermentación en fase sólida y espectrofotometría		Unidades amilolíticas por decilitro (UA/dL).
	Producción de lipasas y lecitinasas	Siembra por disco de agar en medios específicos		Presencia o ausencia

medios específicos.				
Establecer la capacidad de las cepas de hongos anamorfos para solubilizar compuestos inorgánicos de fosforo, a través de su cultivo en el medio de Ramos-Callao.	Solubilización del fósforo insoluble	Siembra por disco de agar en medios específicos.	Incubadoras a 25°C Refrigeradora Cabina de seguridad Mechero Medios de cultivo Cristalería Asas en argolla, espátula y en L Reglas milimetradas	Diámetro del halo de solubilización (mm)

Procesamiento y análisis de la información:

En esta investigación la variable independiente está constituida por las cepas de hongos anamorfos, mientras que las variables dependientes son, en la prueba cuantitativa la producción de amilasas y en las pruebas semi-cuantitativas la producción de lacasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas y lecitinasas (Gutiérrez-Pulido & De la Vara, 2008). Por cada enzima evaluada, se realizará un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba posterior de Duncan para evidenciar las diferencias entre las cepas (Martínez, 2004). Los resultados fueron procesados en Excel 2013 y el programa R®.

14. Vinculación, difusión y divulgación

Actividades de vinculación:

Gestión de Presentación del proyecto de investigación a la Dra. Concepción Toriello, Jefa del Laboratorio de Micología Básica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en visita académica en el Departamento de Microbiología. Se contó con

asesoría técnica de parte de la Dra. Toriello, en el marco de la actividad de CONCYT, de encuentro de científicos guatemaltecos en julio del 2018.

Con el Dr. Rafael Castañeda Ruiz, David W. Minter y la International Society for Fungal Conservation para la revisión de manuscritos y asesoría técnica.

Con la Unidad de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala para el préstamo de equipo para el análisis de amilasas.

Con la Sociedad Méxicana de Micología, la Universidad Veracruzana y la Universidad Nacional Autónoma de México para aceptación de resumen.

Con el Laboratorio Microbiológico de Referencia de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia el cuál dono reactivos para la detección de lipasas a través de la técnica de degradación de la tributirina.

Presentación de los resultados de la fase I y la fase II del presente proyecto en la conferencia "Impacto económico, social, académico, tecnológico o cultural de investigaciones desarrolladas por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia." Como parte del programa de Pasantía de la Subcomisión de Indicadores de la Investigación Interuniversitaria Estatal del Consejo Nacional de Rectores (CONARE) de la Universidad de Costa Rica.

Actividades de difusión y divulgación:

Publicación del artículo científico "Figueroa, R., Bran, M. D. C., Morales, O., Morataya, E., Minter, D. W., & Castañeda-Ruiz, R. F. (2018). *Craspedodidymum guatemalense* sp. nov. from Guatemala. Mycotaxon, 133(2), 315-322."

Se presentó ante la comunidad internacional el hallazgo de la nueva especie *Craspedodidymum guatemalense* y se hizo énfasis en la importancia de los hongos anamorfos en Guatemala desde el punto de vista taxonómico, ecológico y biotecnológico en el XII Congreso Nacional de Micología, Xalapa, Veracruz del 15 al 19 de octubre del 2018.

Gestión de pasaje de avión la presentación de resultados del proyecto en el XII Congreso Nacional de Micología, Xalapa, Veracruz del 15 al 19 de octubre del 2018.

Se implementó el simposio multidisciplinario "Diversidad, Bioprospección y Tecnología de Hongos en Guatemala" el 19 de noviembre del 2018, en el cual se presentaron los resultados de investigación de la fase I del proyecto "Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (fase I): taxonomía, ecología y aislamiento en dos localidades del centro del país" y los resultados preliminares de la fase II del presente proyecto.

Entrega de informe final de la fase I del proyecto "Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en guatemala (fase I): taxonomía, ecología y aislamiento en dos localidades del centro del país" y los resultados preliminares de la fase II del presente proyecto" a las alcaldías de Tecpán y San Lucas y a CONAP central y CONAP Sololá.

Actividades de gestión:

Gestiones ante la Junta Directiva de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para el nombramiento de la coordinación del proyecto y de investigador titular no asalariado: Licda María del Carmen Bran y Lic. Osberth Morales, respectivamente.

Gestión ante la Dirección General de Investigación (DIGI) para el reconocimiento del Coordinador del Proyecto.

Gestiones ante la DIGI para el nombramiento del Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos.

Redacción, presentación y aprobación de una propuesta de evaluación terminal en la modalidad de proyecto de investigación relacionada con cinética de crecimiento de hongos anamorfos en cultivo puro, para incluir a un estudiante de la carrera de Química Biológica.

Licencias de Muestreos en áreas protegidas:

Gestiones de solicitudes de permiso para muestreos en áreas protegidas de acuerdo a instrucciones de Conap:

Trámite en el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (Conap), para la obtención de las Licencias de muestreo:

Autorización de Muestreos en áreas Protegidas:

Se obtuvo el permiso de colecta por parte del Consejo Nacional de Áreas Protegidas, sección Altiplano Central ubicada en el departamento de Sololá, así como de las licencias correspondientes para "El Astillero Municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango".

Visita académica:

Se contó con la participación de los conferencistas Dr. Giampaolo Simonini, Dr. Andrea Rinaldi para el montaje de las conferencias "New xerocomoid genera in Europe: molecular evidences and focus in the genus Hortiboletus" y "Péptidos antimicrobianos: mecanismos de acción de una nueva clase de antibióticos". Además con la Licda. Ruth de León, Dra. Maura Quezada e Ing. Julio Peralta para el montaje del simposio "Diversidad, Bioprospección y Tecnología de Hongos en Guatemala".

15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:

Actividad antibacteriana

El 35% (14) de las cepas de hongos anamorfos evaluadas mostraron un halo de inhibición contra *E. coli*, en tanto que contra *P. aeruginosa* fue el 17.5% (7) y contra *S. aureus* 22.5% (9). De las cepas que presentaron actividad inhibitoria contra *E. coli*, el mayor diámetro de halo de inhibición lo obtuvo *Paecilomyces* sp 3 (20.40±1.52) el cual fue estadísticamente significativo con respecto a las demás cepas de hongos evaluadas ($p<0.05$). Contra *P. aeruginosa* el mayor diámetro de halo de inhibición lo obtuvo *Stachybotrina* sp 1 (23.80±2.39) el cual fue estadísticamente diferente con respecto a las demás cepas ($p<0.05$). Contra *S. auerus*, el mayor diámetro de halo de inhibición lo obtuvo la Morfoespecie 2 (22.80±2.28), el cual fue estadísticamente diferente con respecto a las demás cepas (Tabla 1).

Tabla 1

Diámetros de halos de inhibición bacteriana a partir de extractos fúngicos

	Diámetro del halo de inhibición (mm) [1, 2, 3, 4]					
Cepas	***E. coli***		***P. aeruginosa***		***S. aureus***	
A. niger	18.80±2.39	b[4]	15.00±1.87	d[4]	16.20±2.77	d[4]
Aspergillus sp 1	17.00±2.00	c	17.80±3.56	c	18.20±2.39	c
Aspergillus sp *4*	14.80±2.17	d, e	13.40±2.70	e	08.80±2.28	g
Brachysporiella sp	09.60±1.34	f	SAI		SAI	
C. splendida	10.60±0.89	f	14.60±1.14	d, e	SAI	
Chloridium sp 2	10.20±3.19	f	SAI		15.00±1.58	d
Morfoespecie 2	15.80±1.30	c, d	14.40±1.67	d, e	**22.80±2.28**	a
Morfoespecie 3	19.40±1.95	a, b	SAI		SAI	
Morfoespecie 4	SAI		SAI		19.60±1.14	b
Paecilomyces sp 3	20.40±1.52	a	SAI		SAI	
Penicillium sp 3	SAI[3]		SAI		12.00±1.00	e, f
Penicillium sp 6	13.40±1.82	e	SAI		SAI	
Penicillium sp 7	SAI		SAI		11.80±1.92	f
Penicillium sp 9	SAI		SAI		13.20±3.27	c
P. humicola 1	14.00±3.08	e	SAI		SAI	
P. humicola 2	13.60±1.67	e	SAI		SAI	
Stachybotrina sp 1	**19.60±1.14**	a, b	**23.80±2.39**	a	SAI	
Stachybotrina sp 2	18.60±1.34	b	21.80±1.92	b	SAI	

[1] Halo ± desviación estándar (mm), [2]*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27863 y *S. aureus* ATCC 25923, [3]SAI: Sin actividad inhibitoria; [4]Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0-05).

Producción de lacasas

El 70% (28) de las cepas estudiadas produjeron lacasas. Se observó que *T. nivea* cepa 1 obtuvo el mayor valor de RHC (783.33 ± 62.76), el cual fue estadísticamente significativo ($p<0.05$) con respecto a los demás hongos evaluados. El siguiente valor más alto lo obtuvo *Stachybotrina* sp 1 (656.67 ± 57.25) seguido de *T. nivea* 2 (642.50±103.68) aunque estas dos cepas no mostraron diferencia significativa entre ellas ($p>0.05$). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue *Brachysporiella* sp (75.38±18.73) el cual fue estadísticamente diferente a los demás ($p<0.05$) (Tabla 2).

Tabla 2

Producción de lacasas de las cepas de hongos anamorfos después de 8 días de incubación

	Diámetro (mm)			
Cepas	**Colonia[1]**	**Halo[1]**	**RHC[1, 2]**	
T. nivea 1	05.60±0.55	43.60±1.34	783.33±62.76	a[3]
Stachybotrina sp 1	05.60±0.55	36.60±2.88	656.67±57.25	b
T. nivea 2	06.80±1.10	42.80±1.30	642.50±103.68	b, c
Stachybotrina sp 2	05.60±0.55	33.60±2.07	606.00±83.08	c
Paecilomyces sp 3	10.40±1.67	39.60±1.14	388.97±64.24	d
Penicillium sp 8	09.20±1.30	30.00±1.58	330.40±42.27	e
Penicillium sp 2	11.00±1.00	31.40±0.89	287.21±25.73	f
M. elegans	17.40±2.07	44.80±2.49	261.37±42.17	f, g
T. cubensis	10.40±1.14	25.00±0.71	243.01±30.18	g
Morfoespecie 2	18.00±1.22	41.00±1.22	228.69±17.89	g, h
Helicosporium sp	13.20±2.05	24.80±1.48	191.85±34.49	h, i
Morfoespecie 4	11.00±0.71	20.80±2.59	189.55±24.88	h, i
Penicillium sp 9	10.00±0.71	18.40±1.14	185.13±21.70	h, i, j
A. niger	53.80±3.96	88.20±8.01	164.17±13.03	i, j, k
Penicillium sp 1	12.20±0.45	20.60±0.55	168.97±5.89	i, j, k
Penicillium sp 5	13.00±1.22	20.00±0.71	154.74±12.85	i, j, k
Cladosporium sp	31.00±2.65	43.20±2.05	140.54±17.55	j, k, l
C. splendida	08.60±1.14	11.40±2.88	137.09±48.63	k, l
P. humicola 1	20.00±0.71	27.20±1.30	136.19±9.18	k, l
Penicillium sp 4	15.40±1.52	20.80±1.10	135.98±13.91	k, l
Paecilomyces sp 1	21.00±1.00	28.40±2.19	135.63±14.34	k, l
P. humicola 2	20.00±1.41	26.20±4.09	131.90±26.09	k, l, m
B. querna 1	21.60±1.14	28.40±1.14	131.82±9.43	k, l, m
B. querna 2	23.60±2.41	28.60±0.89	122.07±1.20	k, l, m
Penicillium sp 6	18.20±1.92	16.60±2.51	93.30±26.20	l, m, n
Penicillium sp 7	12.20±1.92	11.20±0.84	93.13±11.56	l, m, n
Penicillium sp 10	09.20±0.84	08.00±0.71	88.06±15.73	m, n
Brachysporiella sp	30.20±3.70	22.40±4.22	75.38±18.73	n

[1] Media ± desviación estándar, [2] RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0-05).

Producción de proteasas

El 87.5% (35) de las cepas estudiadas produjeron proteasas. Se observó que la cepa de *V. nigra* obtuvo el mayor valor de RHC (204.56±18.03) seguido de *Penicillium* sp 7 (186.14±13.00) los cuales fueron estadísticamente significativos entre ellos y con respecto a las demás cepas ($p<0.05$). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue *Chloridium* sp 2 (100.81±04.49) el cual fue estadísticamente diferente a los demás ($p<0.05$) (Tabla 3).

Producción de amilasas

El 92.5% (37) de las cepas produjeron amilasas, de estas el 50% (20) mostró una RHC mayor a 100. Se observó que la cepa *B. rhombica* obtuvo el mayor valor (199.06 ± 5.20) el cual fue estadísticamente significativo ($p<0.05$) con respecto a los demás hongos evaluados. El siguiente valor más alto lo obtuvo *V. nigra* (166.67±3.82) seguido de *Penicillium* sp 7 (131.55±0.39) los cuales también fueron estadísticamente significativos ($p<0.05$) entre ellos y con respecto a los demás hongos evaluados (Tabla 4).

El extracto obtenido de *V. nigra* mostró la mayor actividad enzimática (628.34±13.68 UA/dl) seguido por el de *A. niger* (621.30±23.32 UA/dl), sin existir diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$). El siguiente valor más alto fue el de *Aspergillus* sp 4 (556.91±11.50 UA/dl) el cual también fue estadísticamente significativo ($p<0.05$) con respecto a los demás (Tabla 5).

Tabla 3

Producción de proteasas de las cepas de hongos anamorfos después de 8 días de incubación

	Diámetro (mm) [1]			
Cepas	**Colonia**	**Halo**	**RHC[2]**	
V. nigra	17.60±1.52	35.80±1.30	204.56±18.03	a[3]
Penicillium sp 7	27.40±2.30	50.80±2.39	186.14±13.00	b
Penicillium sp 10	36.20±1.30	53.40±3.58	147.61±10.37	c
Morfoespecie 1	28.80±1.30	42.40±2.79	147.26±08.21	c
T. nivea 2	35.20±1.92	49.60±1.52	141.11±05.26	c, d
Penicillium sp 8	36.80±3.03	51.40±1.52	140.39±11.71	c, d
Penicillium sp 6	45.00±2.12	62.40±3.36	138.68±04.04	c, d
Stachybotrina sp 1	16.40±2.07	22.60±2.07	138.67±13.70	c, d
Morfoespecie 3	39.60±1.95	54.40±2.61	137.42±03.96	c, d
T. nivea 1	46.40±1.67	61.40±0.89	132.47±05.25	d, e
A. niger	46.60±2.07	61.20±2.17	131.47±05.81	d, e, f
Penicillium sp 1	35.60±1.67	46.60±2.30	131.13±08.73	d, e, f
B. rhombica	49.60±2.88	64.20±1.92	129.66±05.77	d, e, f, g
P. humicola 2	32.80±2.49	41.00±2.12	125.47±10.22	e, f, g, h
Cladosporium sp.	50.80±3.56	63.40±1.82	125.20±07.74	e, f, g, h
P. humicola 1	35.40±1.95	43.00±2.35	121.62±06.41	e, f, g, h, i
B. querna 1	48.80±1.79	59.00±1.22	120.99±03.87	f, g, h, i
Morfoespecie 2	39.80±1.64	47.40±2.51	119.30±08.73	g, h, i, j
Penicillium sp 4	43.60±2.30	51.60±1.52	118.56±05.90	g, h, i, j, k
Paecilomyces sp 3	54.40±2.30	64.20±1.92	118.10±03.52	h, i, j, k, l
Aspergillus sp 4	45.80±2.49	53.60±3.29	117.10±05.82	h, i, j, k, l, m
Stachybotrina sp 2	20.00±1.58	22.80±2.05	114.33±10.98	h, i, j, k, l, m
Brachysporiella sp	54.20±2.68	60.80±2.28	112.24±02.08	i, j, k, l, m, n
Chloridium sp 1	34.80±1.30	38.80±1.10	111.67±06.35	i, j, k, l, m, n
Penicillium sp 2	48.40±1.67	54.00±2.74	111.60±05.14	i, j, k, l, m, n
T. cubensis	58.20±2.95	64.80±2.39	111.52±05.99	i, j, k, l, m, n
M. elegans	40.20±1.64	43.80±2.17	109.08±06.80	j, k, l, m, n
Penicillium sp 3	40.80±1.92	44.20±1.92	108.50±06.34	j, k, l, m, n
Aspergillus sp 3	64.40±1.82	69.60±1.82	108.11±02.90	j, k, l, m, n
Paecilomyces sp 2	32.20±1.48	34.60±2.41	107.51±06.85	j, k, l, m, n
Aspergillus sp 2	56.80±2.49	60.80±2.17	107.13±04.25	k, l, m, n
Paecilomyces sp 1	29.00±2.12	30.80±1.48	106.68±09.78	l, m, n
Aspergillus sp 1	71.20±1.64	75.60±1.52	106.24±03.84	l, m, n
B. querna 2	46.00±1.87	48.80±2.59	106.11±04.48	m, n
Chloridium sp 2	33.60±2.19	33.80±1.10	100.81±04.49	n

[1] Media ± desviación estándar, [2] RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, , [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0-05).

Tabla 4

Producción de amilasas de las cepas de hongos anamorfos después de 18 días de incubación

Hongo anamorfo	Diámetro (mm) [1]		RHC[2]	
	Colonia	Halo		
B. rhombica	21.2±0.84	42.2±1.10	199.06±4.65	a[3]
V. nigra	21.6±0.89	36.0±1.00	166.67±3.42	b
Penicillium sp *7*	63.4±0.89	83.4±0.89	131.55±0.39	c
A. niger	35.6±0.89	45.6±0.89	128.09±4.02	c
Aspergillus sp 4	19.2±1.10	24.2±1.10	126.04±7.64	c
Penicillium sp 9	29.8±1.10	35.6±0.89	119.46±1.77	d
Aspergillus sp 2	42.0±0.71	50.0±1.00	119.05±3.63	d
Penicillium sp 1	28.8±1.10	34.2±0.45	118.75±3.32	d
Aspergillus sp 3	42.0±0.71	49.8±2.05	118.57±5.76	d
Penicillium sp 6	23.4±0.89	26.8±0.45	114.53±3.72	d, e
Penicillium sp 10	50.4±0.89	57.4±0.89	113.89±0.22	d, e
Morfoespecie 1	59.2±1.10	66.4±0.89	112.16±0.82	e, f
Brachysporiella sp	64.8±1.30	72.6±0.89	112.04±1.97	e, f
Penicillium sp 3	27.4±0.89	30.4±0.55	110.95±2.50	e, f, g
Morfoespecie 2	17.8±0.45	19.4±0.89	108.99±4.52	e, f, g
P. humícola 1	14.4±0.89	15.4±0.89	106.94±0.41	f, g
Paecilomyces sp 2	36.6±0.89	39.0±0.71	106.56±1.44	f, g
Penicillium sp 2	25.8±1.10	27.4±0.89	106.20±3.15	f, g
C. splendida	16.2±1.10	17.2±0.45	106.17±5.97	f, g
P. humicola 2	16.6±0.89	17.6±0.89	106.02±0.28	g

[1] Media ± desviación estándar, [2] RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0.05).

Tabla 5
Actividad enzimática en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl) de los extractos de las cepas de hongos anamorfos que presentaron una RHC mayor a 100

Cepas	**Actividad enzimática (UA/dl)**	
V. nigra	628.34±13.68	a[1]
A. niger	621.30±23.32	a
Aspergillus sp 4	556.91±11.50	b
B. rhombica	446.55±21.53	c
Penicillium sp 7	418.53±15.19	d
Penicillium sp *9*	343.29±32.07	e
Penicillium sp 6	317.19±28.55	f
Penicillium sp *1*	255.11±09.19	g
Penicillium sp 10	241.42±07.55	g
Aspergillus sp 2	183.70±06.63	h
Penicillium sp 3	183.68±16.80	h
Morfoespecie 1	175.75±16.39	h
Aspergillus sp 3	144.60±07.42	i
Brachysporiella sp	131.25±15.43	i
P. humicola 2	127.17±15.23	i
P. humicola 1	100.90±06.48	j
Penicillium sp 2	95.66±07.88	j, k
Paecilomyces sp 2	75.57±18.60	k, l
C. splendida	68.42±14.08	l
Morfoespecie 2	60.79±60.34	l

[1]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0.05).

Producción de celulasas

El 95.0% (38) de las cepas estudiadas produjeron celulasas. Se observó que la cepa de *V. nigra* obtuvo el mayor valor de RHC (245.89±13.16), seguido de *B. rhombica* (244.32±18.02) sin mostrar diferencia significativa entre ellas ($p>0.05$), sin embargo ambas mostraron diferencia significativa con respecto a las demás ($p<0.05$). Los siguientes valores más altos correspondieron a *Penicillium* sp 1 (223.83±27.32), *Chloridium* sp 2 (222.48±14.21) y *Penicillium* sp 10 (204.63±24.41) sin existir diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue la Morfoespecie 3 (91.73±20.75) el cual fue estadísticamente diferente a los demás ($p<0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6

Producción de celulasas de las cepas de hongos anamorfos después de 8 días de incubación

Cepas	Diámetro (mm)[1]		RHC[2]	
	Colonia	Halo		
V. nigra	23.60±1.34	58.00±4.06	245.89±13.16	a[3]
B. rhombica	15.20±1.10	37.00±1.22	244.32±18.02	a
Penicillium sp 1	31.60±2.61	70.20±3.70	223.83±27.32	b
Chloridium sp 2	17.20±1.30	38.20±2.86	222.48±14.21	b
Penicillium sp 10	33.20±1.10	67.80±6.94	204.63±24.41	b, c
Stachybotrina sp 1	22.20±1.64	44.00±0.71	199.01±14.12	c
Paecilomyces sp 3	34.60±2.07	67.60±2.07	196.03±14.48	c
Paecilomyces sp 1	45.20±0.84	85.20±1.48	188.56±05.34	c, d
Paecilomyces sp 2	37.20±1.10	65.60±1.82	176.55±09.39	d, e
T. nivea 2	23.60±2.88	40.80±1.48	174.65±18.62	d, e, f
Stachybotrina sp 2	25.00±1.22	43.20±1.79	173.21±12.34	d, e, f, g
Cladosporium sp	27.40±2.41	45.20±3.27	166.13±19.76	e, f, g, h
Penicillium sp 7	49.00±3.74	80.40±2.97	164.61±09.62	e, f, g, h
Penicillium sp 2	40.60±3.05	65.60±5.13	162.00±13.35	e, f, g, h, i
Penicillium sp 9	32.80±3.03	51.60±2.30	158.68±19.06	e, f, g, h, i, j
C. splendida	22.20±2.59	33.80±1.30	153.73±16.82	f, g, h, i, j, k
T. cubensis	28.20±2.59	43.00±2.35	153.46±15.53	f, g, h, i, j, k
P. humicola 2	17.60±1.67	26.80±3.56	152.88±20.61	g, h, i, j, k
Penicillium sp 4	47.80±0.45	71.20±6.38	149.01±13.99	h, i, j, k, l
B. querna 2	21.80±2.05	31.40±3.78	144.69±18.15	h, i, j, k, l
T. nivea 1	32.20±3.11	45.40±2.30	141.73±10.86	i, j, k, l
Penicillium sp 3	55.40±7.57	76.40±1.14	139.95±18.83	j, k, l, m
Brachysporiella sp	52.40±1.14	72.20±3.27	137.91±08.52	j, k, l, m
Aspergillus sp 4	48.20±3.56	64.80±1.48	134.99±09.75	k, l, m, n
Morfoespecie 1	52.40±5.77	69.80±2.95	134.06±09.71	k, l, m, n
Aspergillus sp 1	62.20±2.39	82.80±2.59	133.23±05.44	k, l, m, n
Penicillium sp 5	31.60±2.07	41.60±2.41	132.50±16.80	k, l, m, n
M. elegans	40.60±2.30	53.00±2.55	131.01±11.78	l, m, n, o
Penicillium sp *6*	49.60±3.78	63.80±0.84	129.33±11.51	l, m, n, o, p
Aspergillus sp 2	72.20±2.77	85.60±2.88	118.59±02.09	m, n, o, p, q
P. humicola 1	18.60±1.52	21.00±1.58	113.92±16.31	n, o, p, q
Helicosporium sp	24.00±0.00	26.60±2.88	110.83±12.00	o, p, q, r
A. niger	23.60±2.61	25.60±1.52	109.98±17.81	p, q, r
B. querna 1	22.40±1.52	24.00±2.65	108.08±07.91	q, r
Morfoespecie 4	50.40±3.65	51.60±4.16	102.76±10.43	q, r
Aspergillus sp 3	80.80±4.21	84.80±1.64	105.15±05.15	q, r
Morfoespecie 2	24.00±2.45	25.00±2.35	104.44±07.88	q, r
Morfoespecie 3	27.00±2.65	24.80±6.57	91.73±20.75	r

[1] Media ± desviación estándar, [2] RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0.05).

Producción de lipasas

El 50.0% (20) de las cepas estudiadas produjeron lipasas. Se observó que la cepa de *Penicillium* sp 1 obtuvo el mayor valor de RHC (112.31±87.26) seguido de *Penicillium* sp *2* (106.67±29.99) y Morfoespecie 1 (106.09±22.07) sin mostrar diferencia significativa entre ellas (p>0.05). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue la *V. nigra* (100.00±35.37) el cual no presentó diferencia respecto a las demás cepas (p>0.05) (Tabla 7).

Tabla 7
Producción de lipasas de las cepas de hongos anamorfos después de 10 días de incubación

	Diámetro (mm)[1]			
Cepas	**Colonia**	**Halo**	**RHC[2]**	
Penicillium sp 1	13.00±4.47	14.60±0.55	112.31±87.26	a, b[3]
Penicillium sp 2	15.00±3.42	16.00±1.00	106.67±29.99	b
Morfoespecie 1	23.00±5.02	24.40±0.55	106.09±22.07	b
Paecilomyces sp 1	12.00±4.92	12.60±0.55	105.00±60.20	a, b
B. querna 1	18.00±3.08	18.80±0.84	104.44±26.63	b
M. elegans	24.00±3.56	25.00±0.71	104.17±14.76	b
Paecilomyces sp 3	15.00±4.55	15.60±0.55	104.00±45.98	b
P. humicola 2	15.00±3.83	15.60±0.89	104.00±42.65	a, b
Penicillium sp 3	21.00±6.95	21.80±0.84	103.81±46.24	a, b
T. cubensis	11.00±4.30	11.40±0.55	103.64±61.95	b
P. humicola 1	17.00±4.47	17.60±0.55	103.53±90.68	a
Cladosporium sp	17.00±4.67	17.60±0.55	103.53±24.80	b
Aspergillus sp 3	32.00±2.07	33.00±1.22	103.13±08.49	b
T. nivea 2	14.00±4.72	14.40±0.55	102.86±51.63	b
B. querna 2	21.00±4.55	21.60±0.55	102.86±23.96	b
T. nivea 1	15.00±3.42	15.40±0.55	102.67±38.31	a, b
Morfoespecie 4	18.00±5.15	18.40±0.55	102.22±42.74	a, b
Penicillium sp 9	27.00±4.09	27.60±0.55	102.22±17.40	b
Brachysporiella sp	19.00±2.55	19.40±0.55	102.11±12.90	b
V. nigra	13.00±5.54	13.00±0.00	100.00±35.37	b

[1] Media ± desviación estándar, [2]RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (α=0.05).

Producción de lecitinasas

El 55.0% (22) de las cepas estudiadas produjeron lecitinasas. Se observó que la cepa de *Aspergillus* sp 2 obtuvo el mayor valor de RHC (168.59±10.22) seguido de *Penicillium* sp *2* (159.31±22.90), sin mostrar diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$). El siguiente valor más alto lo mostró la cepa de *Paecilomyces* sp *3* (153.68±09.78) el cual no mostró diferencia respecto a *Penicillium* sp 2 ($p>0.05$). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue *Paecilomyces* sp *2* (13.27±13.91) el cual presentó diferencia respecto a las demás cepas ($p<0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8
Producción de lecitinasas de las cepas de hongos anamorfos después de 10 días de incubación

	Diámetro (mm)[1]			
Cepa	**Colonia**	**Halo**	**RHC[2]**	
Aspergillus sp 2	19.60±0.89	33.00±1.58	168.59±10.22	a[3]
Penicillium sp *2*	20.60±3.78	32.60±6.35	159.31±22.90	a, b
Paecilomyces sp 3	22.80±1.79	35.00±2.92	153.68±09.78	b, c
Chloridium sp 2	9.00±0.71	13.60±0.55	152.11±16.54	b, c
T. nivea 1	23.00±1.87	32.80±1.30	143.62±16.30	c, d
Penicillium sp 6	33.80±2.17	48.40±1.67	143.57±08.59	c, d
T. nivea 2	26.20±0.84	35.40±2.30	135.18±08.91	d, e
Penicillium sp 10	29.00±2.24	38.40±1.67	133.28±14.73	d, e, f
C. splendida	25.00±2.35	32.80±1.48	131.80±08.88	d, e, f
Aspergillus sp 1	37.60±1.52	48.20±3.90	128.29±10.45	e, f, g
M. elegans	23.20±1.92	29.40±1.52	127.31±10.85	e, f, g, h
Brachysporiella sp	36.00±0.71	45.60±3.78	126.61±09.36	e, f, g, h
Aspergillus niger	30.40±0.55	37.20±1.92	122.43±07.35	f, g, h, i
B. querna 2	44.60±1.82	53.00±4.12	118.86±08.61	g, h, i, j
Penicillium sp 3	40.60±0.55	46.80±5.26	115.39±14.25	h, i, j, k
T. cubensis	23.60±3.44	26.00±1.58	111.78±15.63	i, j, k, l
Aspergillus sp 4	33.80±1.30	37.40±1.14	110.72±03.55	i, j, k, l
Morfoespecie 3	23.60±1.14	25.20±1.92	107.04±10.53	j, k, l
B. querna 1	47.60±1.67	50.00±0.71	105.11±02.61	k, l
Aspergillus sp 3	31.80±1.64	33.00±1.58	104.08±08.64	k, l
Paecilomyces sp 1	37.20±3.03	38.40±7.02	102.81±14.31	l
Paecilomyces sp *2*	25.60±4.28	3.60±3.78	13.27±13.91	m

[1] Media ± desviación estánda, [2]RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha=0.05$).

Solubilización de compuestos de fósforo inorgánico

El 67.5% (27) de las cepas estudiadas mostraron capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos de fósforo. Se observó que la cepa de *Aspergillus* sp *4* obtuvo el mayor valor de RHC (214.97±24.11) el cual mostró diferencia significativa respecto a las demás cepas fúngicas ($p<0.05$). El siguiente valor más alto lo mostro la cepa Morfoespecie 3 (156.41±11.03) seguido de *Stachybotrina* sp 1 sin mostrar diferencia significativa entre ellas ($p>0.05$). La cepa que mostró el menor valor de RHC fue *T. nívea* 2 (91.11±04.77) el cual presentó diferencia respecto a las demás cepas ($p<0.05$) (Tabla 9).

Tabla 9

Cepas de hongos anamorfos solubilizadoras de compuestos inorgánicos de fósforo después de 10 días de incubación

	Diámetro[1]			
Cepa	**Colonia**	**Halo**	**RHC[2]**	
Aspergillus sp 4	17.40±0.55	37.40±4.22	214.97±24.11	a[3]
Morfoespecie 3	12.80±0.45	20.00±1.22	156.41±11.03	b
Stachybotrina sp 1	13.60±1.82	20.80±2.59	155.09±26.61	b
Penicillium sp *9*	14.60±0.55	22.60±2.07	154.86±13.62	b
Stachybotrina sp 2	13.40±1.52	18.80±3.11	143.51±36.88	b, c
M. elegans	14.00±1.58	20.00±1.41	143.48±07.97	b, c
Aspergillus sp 1	42.80±3.49	56.40±0.55	132.39±09.43	c, d
Penicillium sp *6*	16.40±1.14	21.40±0.89	131.04±11.23	c, d, e
Penicillium sp 3	28.20±2.39	36.80±2.17	130.96±09.11	c, d, e
Paecilomyces sp 2	15.00±0.00	19.60±1.52	130.67±10.11	c, d, e
T. cubensis	16.00±2.12	19.40±2.61	124.57±32.65	c, d, e, f
Penicillium sp 1	30.40±2.30	39.00±1.87	128.69±08.56	c, d, e
A. niger	36.40±1.52	44.20±1.64	121.58±06.28	d, e, f, g
B. rhombica	63.40±1.82	75.00±3.16	118.40±06.76	d, e, f, g
V. nigra	14.00±1.87	15.80±1.48	115.58±27.56	d, e, f, g
Brachysporiella sp.	36.40±0.89	41.40±0.89	113.82±04.69	d, e, f, g
Aspergillus sp 3	60.60±1.52	67.80±3.42	111.88±04.85	d, e, f, g, h
Penicillium sp 4	24.40±0.89	27.00±1.73	110.88±09.78	e, f, g, h
Aspergillus sp 2	41.40±1.14	44.40±2.61	107.38±08.23	f, g, h
Paecilomyces sp 1	15.60±2.30	16.40±0.55	106.89±15.40	f, g, h
Penicillium sp 10	10.00±1.73	10.20±2.59	105.88±35.18	f, g, h
Morfoespecie 2	38.60±2.19	40.20±0.84	104.41±06.26	f, g, h
Penicillium sp 2	18.80±2.68	18.60±2.41	101.05±21.68	g, h
P. humicola 1	24.80±1.92	25.00±2.00	101.03±08.11	g, h
P. humicola 2	27.80±1.10	25.60±2.19	92.38±10.89	h
T. nivea 1	22.60±1.82	20.60±2.07	92.20±17.07	h
T. nivea 2	28.80±1.30	26.20±0.84	91.11±04.77	h

[1] Media ± desviación estándar, [2] RHC = relación diámetro del halo/diámetro de colonia, [3]Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha=0.05$),

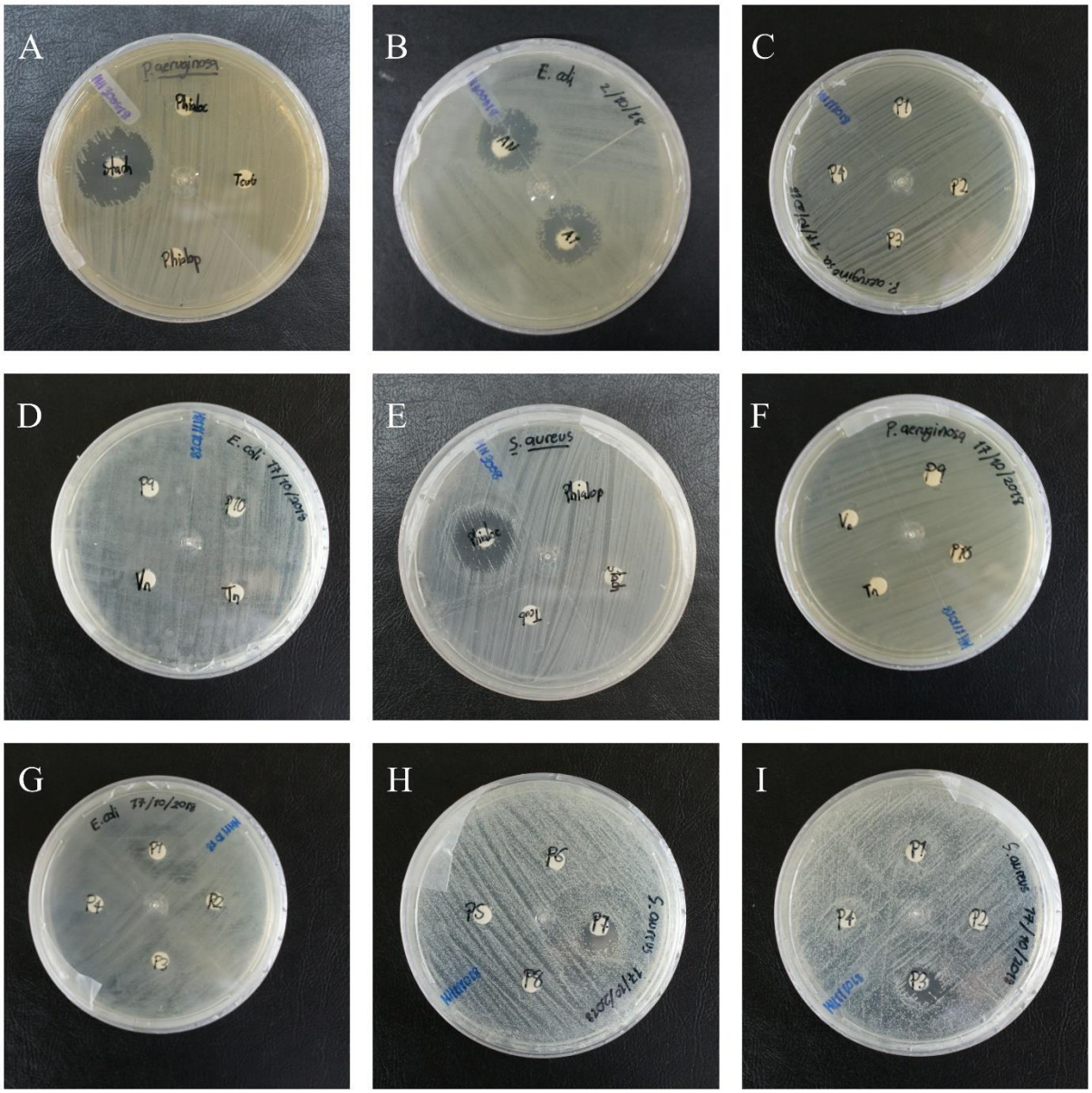

Figura 1. Susceptibilidad antibiótica de bacterias frente a cepas de hongos anamorfos (el halo donde no hay crecimiento indica inhibición de la bacteria). A. *P. aeruginosa* contra *P. humicola* (Phialoc), *Stachybotryna* sp (Stach), *T. cubensis* (Tcub), *Phialophora* sp (Phialop). B. *E. coli* contra *A. niger* (AN), *Aspergillus* sp 1 (A1). C. *P. aeruginosa* contra *Penicillium* sp 1, 2, 3 y 4 (P1, P2, P3 y P4). D. *E. coli* conra *Penicillium* sp 9 y 10 (P9 y P10), *V. nigra* (Vn), *T. nivea* (Tn). E. *S. aureus* contra *P. humicola* (Phialoc), *Phialophora* sp (Phialop), *Stachybotrina* sp (Stach) *y T. cubensis* (Tcub). F. *P. aeruginosa* contra *Penicillium* sp 9 y 5 (P9, P5), *V. nigra* (Vn), *T. nivea* (Tn). G. *E. coli* contra *Penicillium* sp 1, 2, 3 y 4 (P1, P2, P3 y P4). H. *S. aureus* contra *Penicillium* sp 5, 6, 7 y 8 (P5, P6, P7, P8). I. *S. aureus* contra *Penicillium* sp 1, 2, 3 y 4 (P1, P2, P3 y P4).

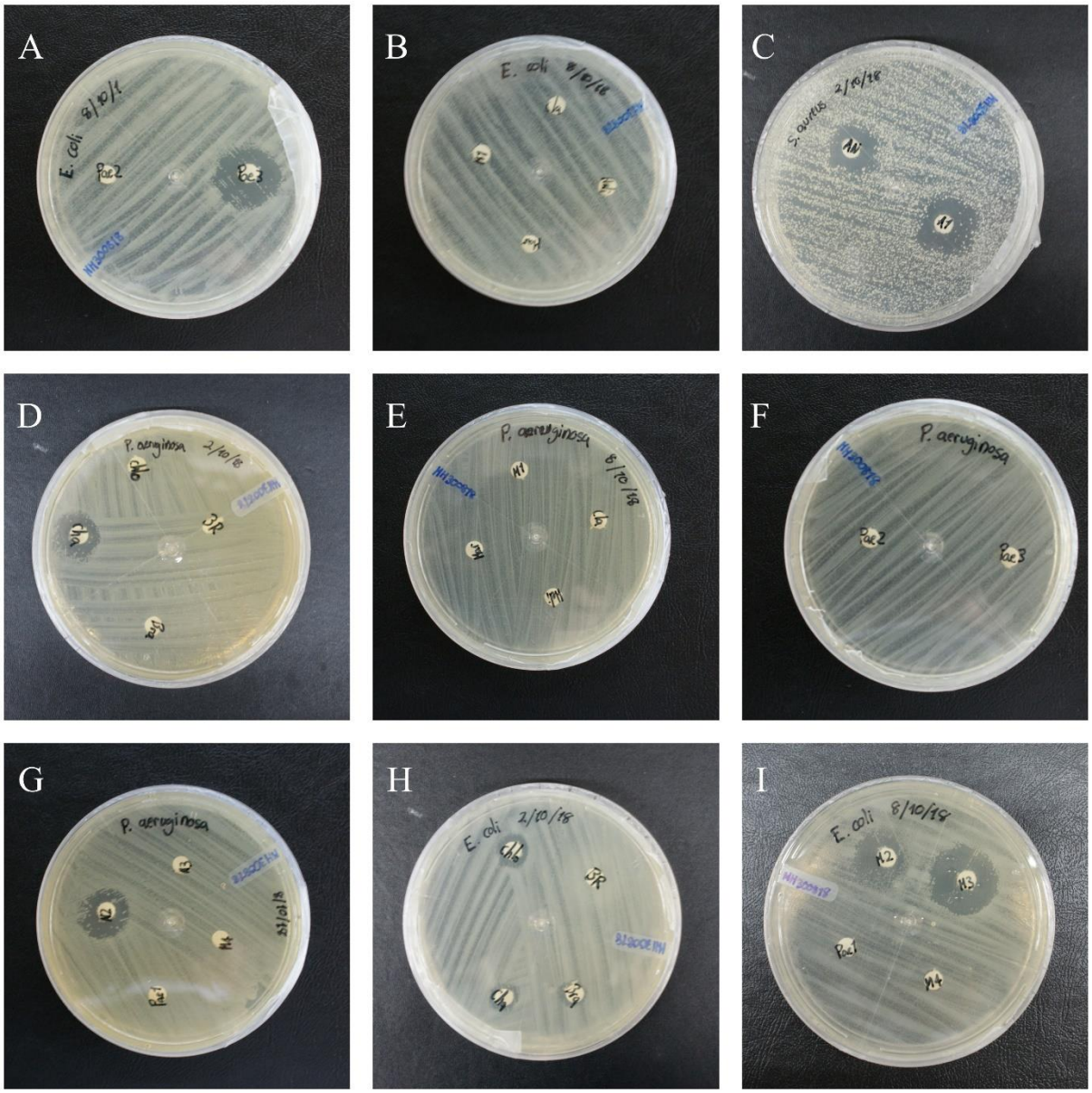

Figura 2. Susceptibilidad antibiótica de bacterias frente a cepas de hongos anamorfos (el halo donde no hay crecimiento indica inhibición de la bacteria). A. *E. coli* contra *Paecilomyces* sp 2 y 3 (Pae2 y Pae3). B. *E. coli* contra *Cladosporium* sp (Cla), *Helicosporium* sp (Hel), *M. elegans* (Mae), Morfoespecie 1 (M1). C. *S. aureus* contra *A. niger* (AN) y *Aspergillus* sp 1 (A1). D. *P. aeruginosa* contra *Chloridium* sp (Chlo), *B. rhombica* (BR), *Brachysporiella* sp (Bra), *C. splendida* (Cha). E. *P. aeruginosa* contra Morfoespecie 1 (M1), *Cladosporium* sp (Cla), *Helicosporium* sp (Heli), *M. elegans* (Mar). F. *P. aeruginosa* contra *Paecilomyces* sp 2 y 3 (Pae2 y Pae3). G. *P. aeruginosa* contra Morfoespecie 2 y 4 (M2 y M4), *Aspergillus* sp 3 (A3) y *Paecilomyces* sp 1 (Pae1). H. *E. coli* contra *Chloridium* sp. (Chlo), *B. rombica* (Br), *C. splendida* (Cha) y *Brachysporiella* sp. (Bra). I. *E. coli* contra Morfoespecie 2, 3 y 4 (M2, M3 y M4) y *Paecilomyces* sp 1 (Pae1).

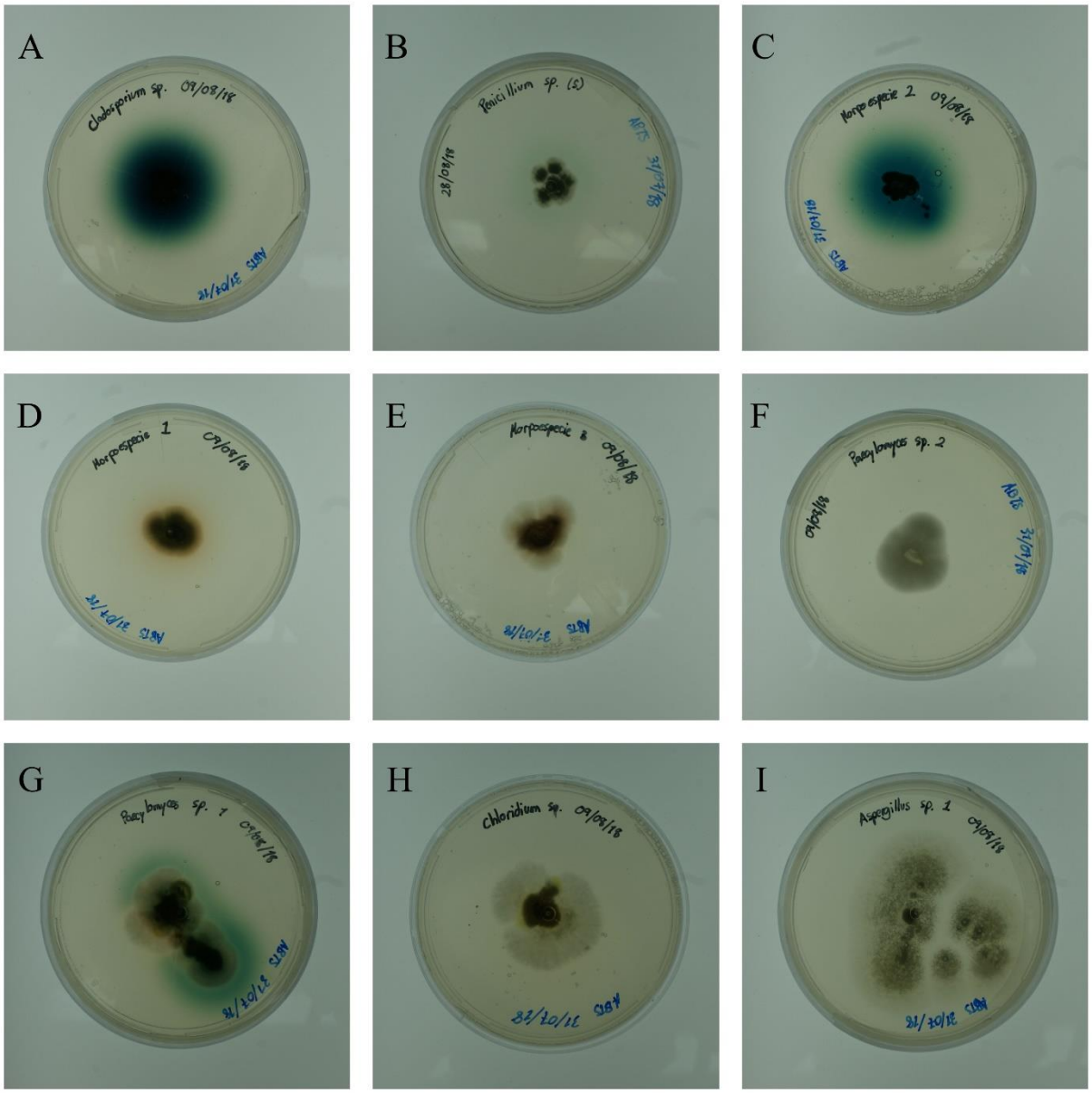

Figura 3. Producción de lacasas por cepas de hongos anamorfos (el halo de color verde indica una reacción positiva). A. *Cladosporium* sp. B. *Penicillium* sp 5. C. Morfoespecie 2. D. Morfoespecie 1. E. Morfoespecie 3. F. *Paecilomyces* sp 2. G. *Paecilomyces* sp 1. H. *Chloridium* sp. I. *Aspergillus* sp 1.

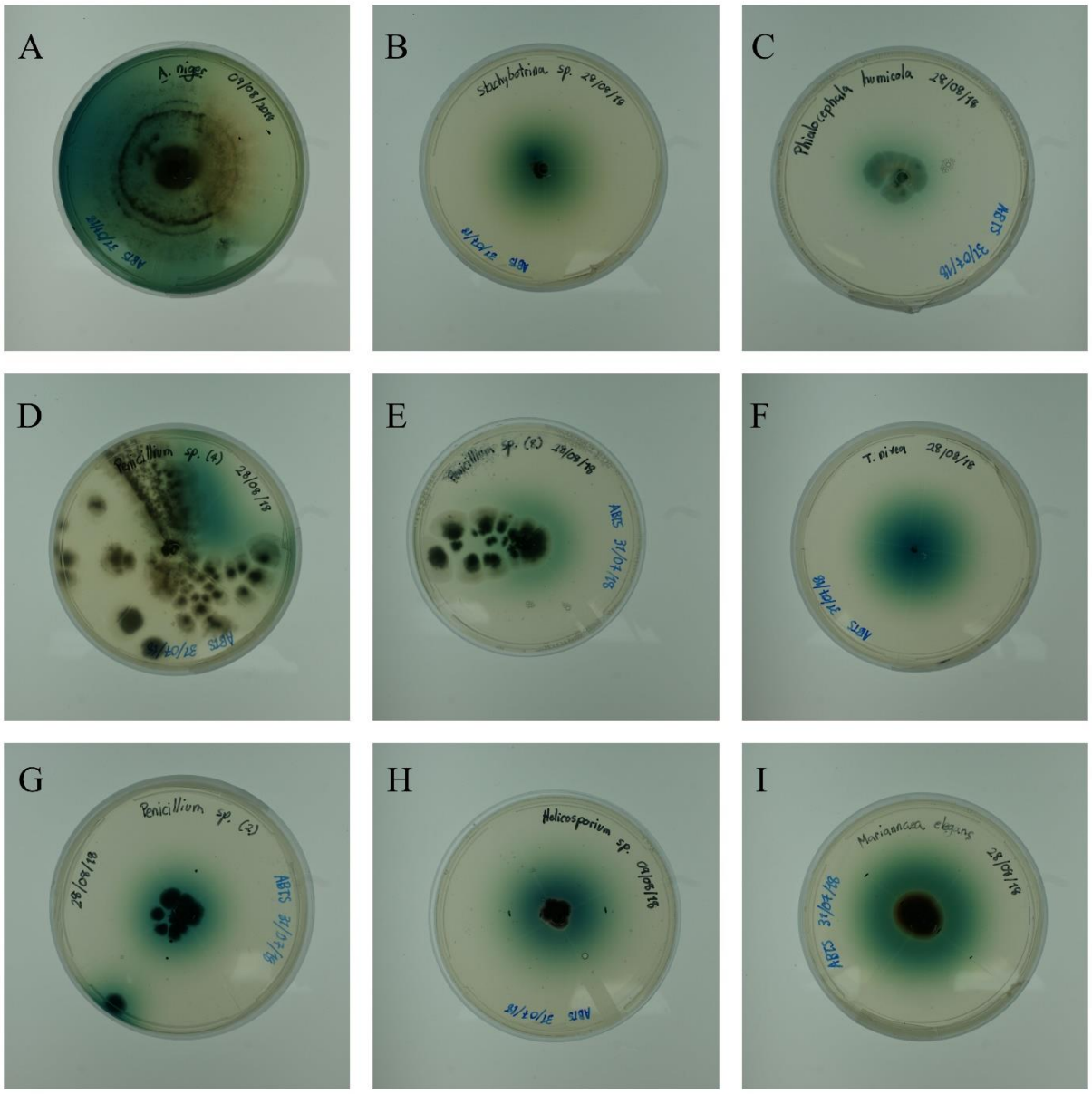

Figura 4. Producción de lacasas por cepas de hongos anamorfos (el halo de color verde indica una reacción positiva). A. *A. niger*. B. *Stachybotryna* sp. C. *P. humícola*. D. *Penicillium* sp 4. E. *Penicillium* sp 8. F. *T. nivea*. G. *Penicillium* sp 2. H. *Helicosporium* sp. I. *M. elegans.*

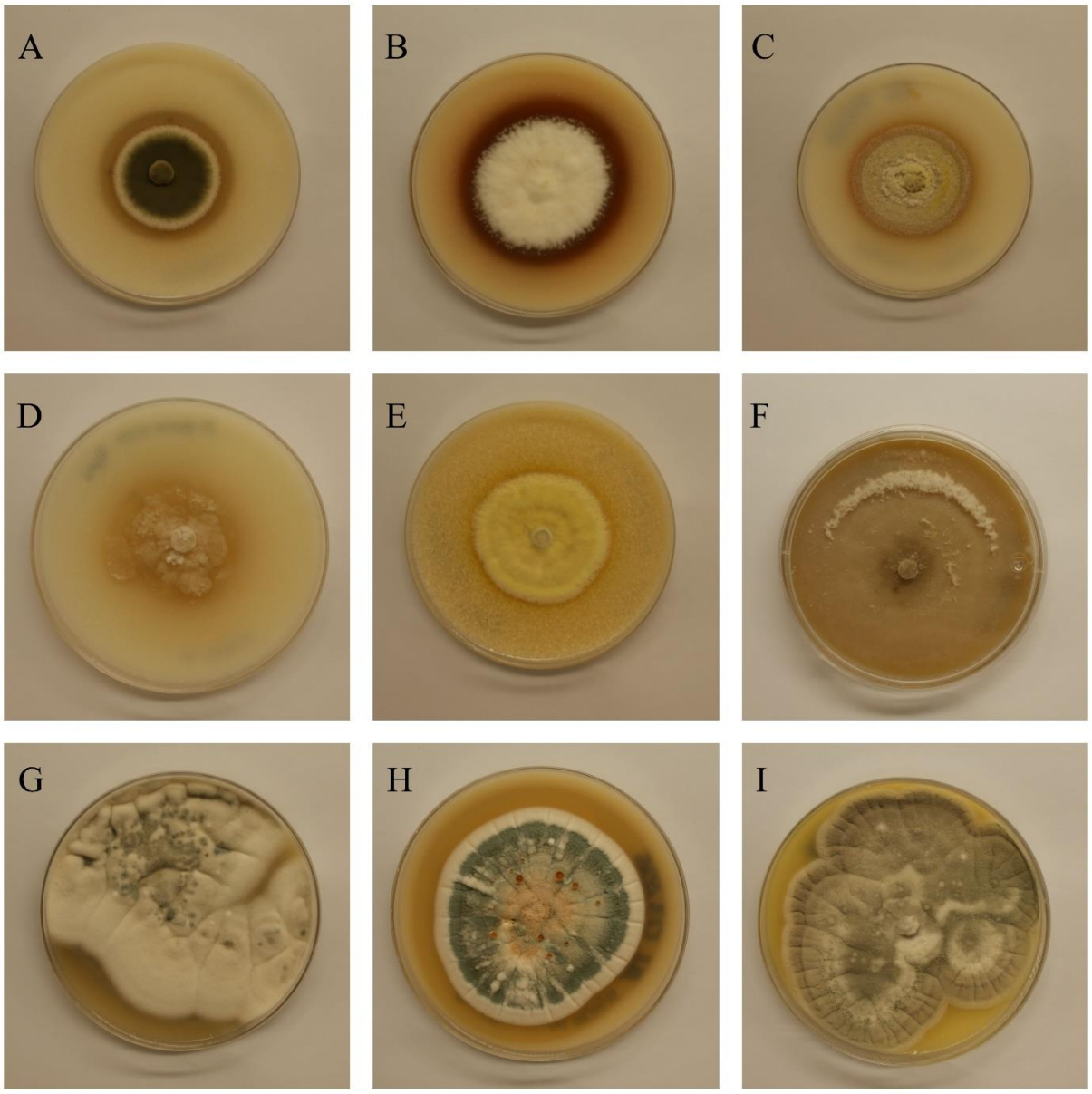

Figura 5. Producción de proteasas por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indica una reacción positiva). A. *Penicillium* sp 1. B. Morfoespecie 3. C. Morfoespecie 1. D. *B. querna*. E. *Brachysporiella* sp. F. *B. rhombica.* G. *Penicillium* sp 6. H. *Penicillium* sp 8. I. *Penicillium* sp 3.

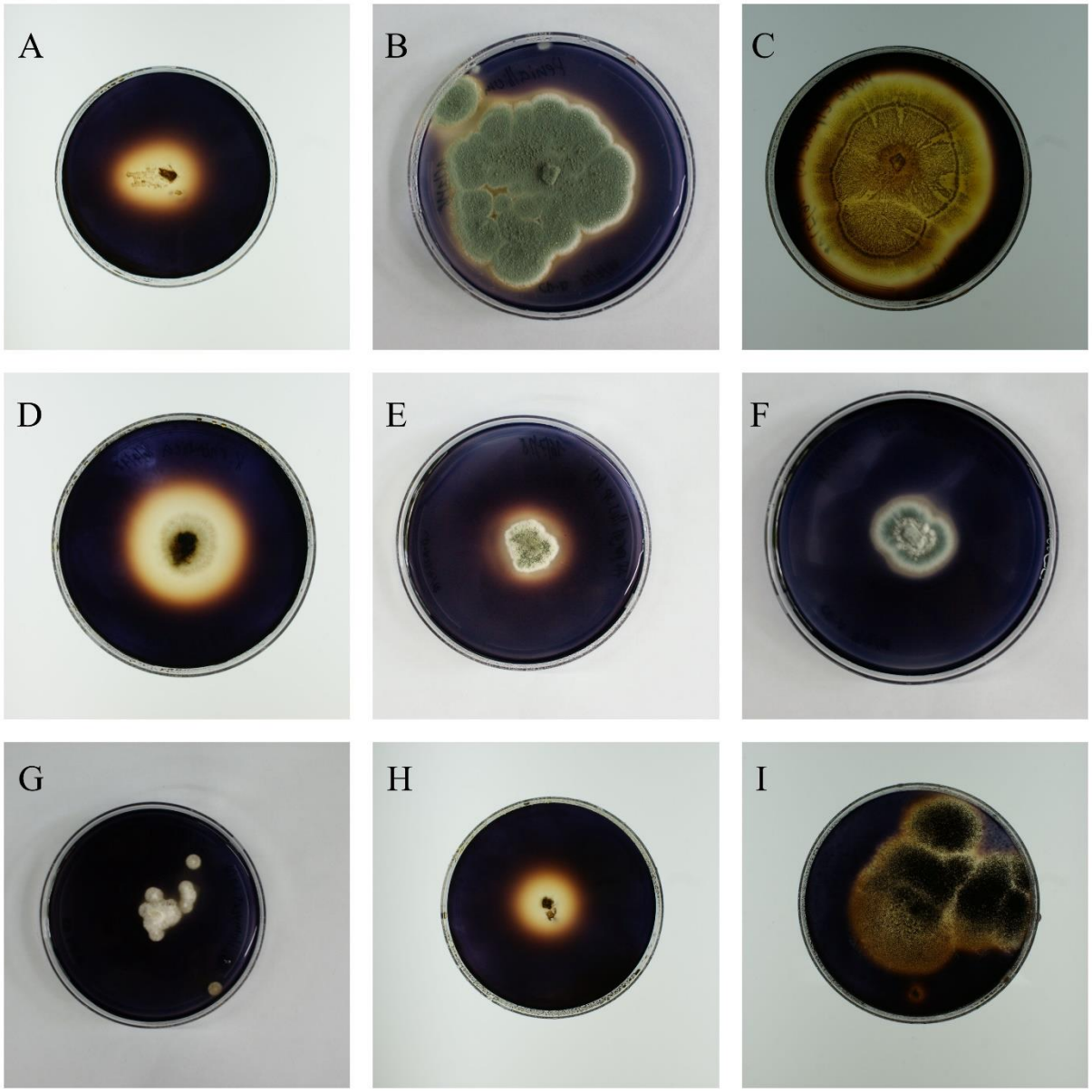

Figura 6. Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un halo transparente indica la producción de amilasas). A. *C. splendida.* B. *Penicillium* sp 7. C. Morfoespecie 1. D. *B. rhombica.* E. *Aspergillus* sp 4. F. *Penicillium* sp 6. G. *Paecilomyces* sp 2. H. *P. humícola.* I. *A. niger.*

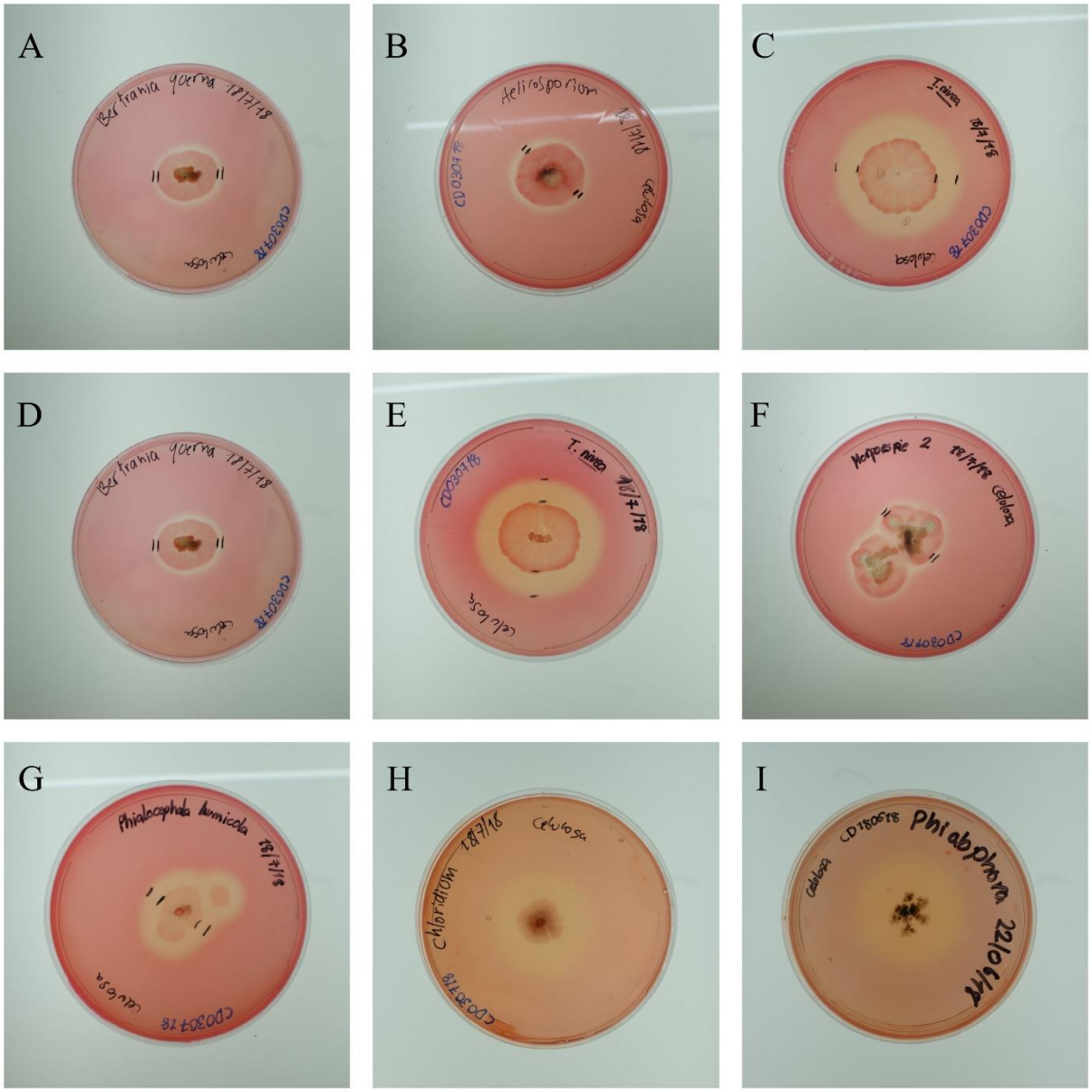

Figura 7. Producción de celulasas por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un halo incoloro alrededor de la colonia índica la producción de celulasas). A. *B. querna*. B. *Helicosporium* sp. C. *T. nivea*. D. *B. querna*, E. *T. nivea*. F. Morfoespecie 2. G. *P. humícola*. H. *Chloridium* sp. I. *Phialophora* sp.

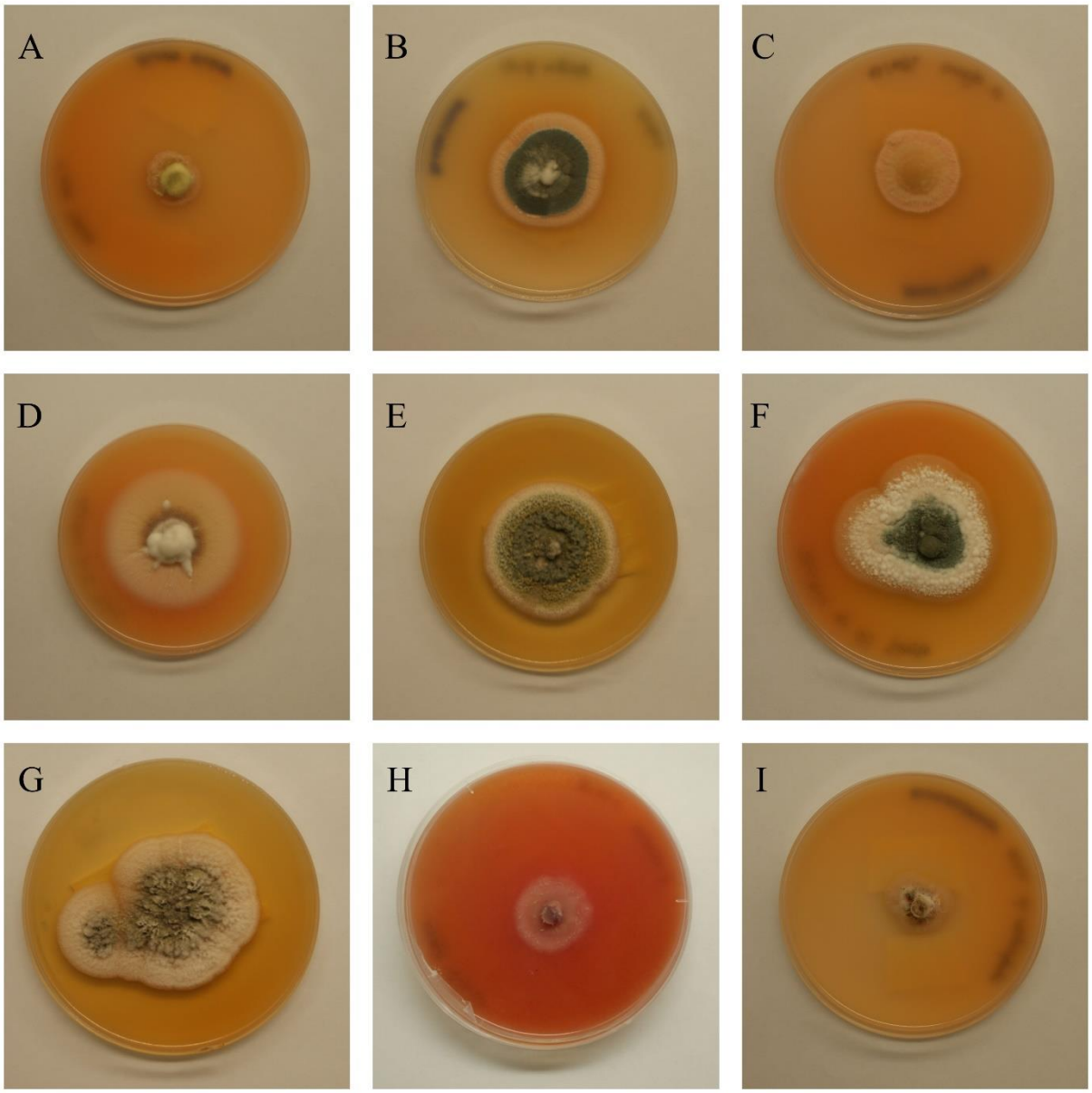

Figura 8. Producción de lecitinasas por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un precipitado alrededor de las colonias índica la producción de lecitinasas). A. *T. nivea.* B. *Penicillium* sp 6. C. *M. elegans.* D. *Penicillium* sp 3. E. *Aspergillus* sp 4. F. *Penicillium* sp 8. G. *Aspergillus* sp 3. H. *B. rhombica.* I. *Stachybotryna* sp.

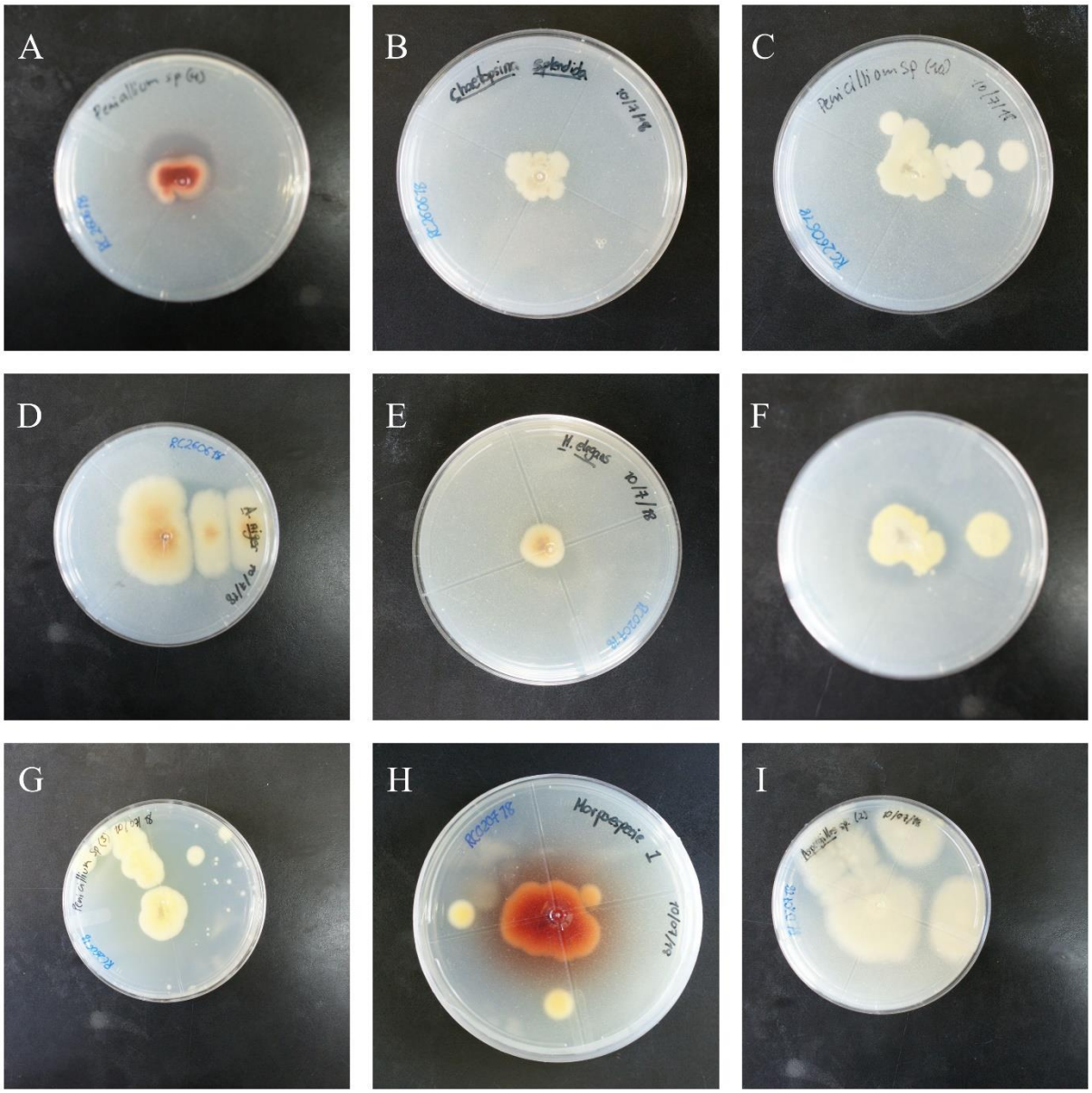

Figura 9. Solubilización de fósforo por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un halo transparente indica la producción de agentes solubilizadores de fósforo). A. *Penicillium* sp 4. B. *C. splendida.* C. *Penicillium* sp 10. D. *A. niger.* E. *M. elegans.* F. *Chloridium* sp. G. *Penicillium* sp 3. H. Morfoespecie 1. I. *Aspergillus* sp 1.

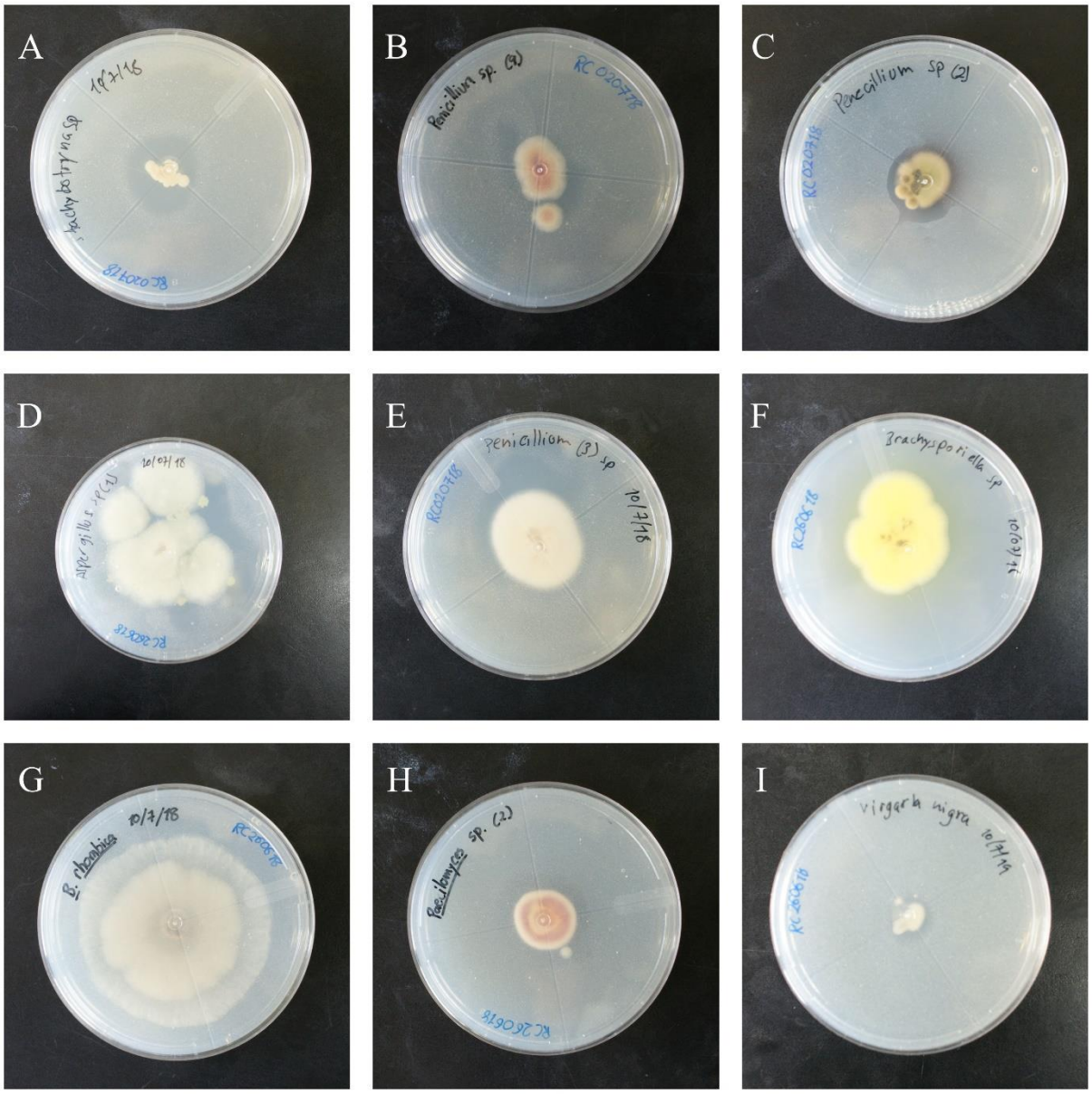

Figura 10. Solubilización de fósforo por cepas de hongos anamorfos (la presencia de un halo transparente indica la producción de agentes solubilizadores de fósforo). A. *Stachybotryna* sp. B. *Penicillium* sp 9. C. *Penicillium* sp 2. D. *Aspergillus* sp 1. E. *Penicillium* sp 3. F. *Bracysporiella* sp. G. *B. rhombica.* H. *Paecilomyces* sp 2. I. *V. nigra.*

16. Análisis y discusión de resultados:

Actividad antibacteriana

Se ha informado que una amplia gama de componentes derivados de hongos poseen propiedades antibacterianas. Por ejemplo, Hateet, Muhsin y Humadi (2014) evaluaron extractos de *Fusarium* sp y encontraron que los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos de dichos extractos son los que ocasionan inhibición contra *E. coli* y *S. aureus*.

En este trabajo, los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de los 40 hongos anamorfos mostraron que el 45% presentó actividad antibacteriana contra al menos una de las bacterias y el 10% (4) mostraron actividad contra todas las bacterias evaluadas. El 22% de los extractos acuosos mostró actividad contra *S. aureus* lo cual es similar a los resultados encontrados por Reyes-Estebanez y colaboradores (2011) en donde encontraron que el 27% de 47 cepas recuperadas de hojarasca mostraron actividad antibacteriana contra el microorganismo antes indicado. Otro estudio con resultados similares fue el realizado por Gamboa-Angulo, De la Rosa-García, Heredia-Abarca y Medina-Baizabal (2012) donde se evaluaron 67 extractos de hongos anamorfos endófitos de *Quercus* sp y se encontró 25% con actividad contra *E. coli* y 31% contra *P. fluorescens.* En el presente trabajo la actividad más notable contra *E. coli* fue la del extracto de *Stachybotrina* sp 1 y de Morfoespecie 3. Infortunadamente, no se encontraron estudios sobre la actividad antibacteriana de *Stachybotrina* con los cuales establecer comparación.

En este estudio la bacteria menos inhibida por los extractos de los hongos anamorfos probados fue *P. aeruginosa* ya que solamente el 17.5% mostró actividad inhibitoria. Esto es comprensible debido a que se ha informado que esta bacteria transporta plásmidos y además desarrolla mutaciones que la hacen resistente a varios antibióticos lo que la hace difícil de tratar a nivel de infecciones nosocomiales (Livermore, 2012). Sin embargo, ambas cepas de *Stachybotrina* sp 1 y 2 produjeron extractos que fueron más efectivos contra *P. aeruginosa,* aunado a que estos hongos inhibieron también a *E. coli,* lo cual indica que los compuestos presentes en dicho extracto tienen potencial contra bacterias gram negativo, no así contra *S. aureus.*

Por otra parte, el haber encontrado que el 45% de los extractos muestran actividad inhibitoria es promisorio tomando en consideración la búsqueda constante de nuevos antibióticos por lo que se recomienda determinar cuáles son los principios activos presentes en los extractos, ya que se los hongos anamorfos son un grupo de microorganismos que se pueden aislar fácilmente y actúan como reservorios de nuevos metabolitos secundarios, como alcaloides, ácidos fenólicos,

quinonas, esteroides, saponinas, taninos y terpenoides que pueden tener potencial como antimicrobianos, por lo que constituyen un arsenal alternativo para contrarestar el aumento de la resistencia a los medicamentos por los agentes patógenos (Joshi, Spieth, & Patel, 2018).

Producción de lacasas

Las lacasas son enzimas que se distribuyen en varios grupos de hongos como los Ascomicetes, Deuteromicetes y Basidiomicetes y son particularmente abundantes en muchos hongos de podredumbre blanca que están involucrados en el metabolismo de la lignina (Brujwani, Rigdon, & Vadlani, 2010)

En el presente estudio se encontró que el 70% de los aislamientos produjeron lacasas, lo cual concuerda con lo reportado por Hatakka (2001) quien mostró que los hongos saprobios en general son las principales especies productoras de lacasas, las cuales producen cantidades variables de dicha enzima según el entorno en el que se encuentren. Esto se debe a que las especies de hongos anamorfos son degradadoras de materiales con altos contenidos de lignina y compuestos difenolicos (Brujwani et al., 2010).

En cuanto a la producción de lacasas las cepas *T. nivea* 1, 2 y *Stachybotryna* sp 1 mostraron las mayores RHC, los cuales son comparables a los obtenidos por Kumar, Kaur, Jain y Kumar (2016) para *Aspergillus flavus.* Lo anterior hace que dichas cepas sean promisorias para producción industrial de dicha enzima, como por ejemplo en la estabilización de bebidas (jugo de fruta, vino y cerveza) y producción de papel, entre otros (Brujwani et al., 2010; Viswanath, Rajesh, Janardhan, Praveen, & Narasimha, 2014).

Producción de proteasas

Los hongos filamentosos pueden secretar efectivamente varias enzimas hidrolíticas y, uno de los principales grupos de enzimas secretadas son las proteasas (ácidas, neutras, alcalinas y metaloproteasas). Su producción se ha demostrado en muchas especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Humicola, Mucor, Penicillium* y *Rhizopus,* entre muchos otros (Nirmal, Shankar, & Laxman, 2011). Con fines industriales, los géneros *Aspergillus, Candida, Penicillium* y *Cephalosporium* son empleadas a gran escala para la producción de estas enzimas (Peña-Montes, González, Castro-Ochoa, & Farrés, 2008).

En este estudio, las cepas con mayor RHC para la producción de proteasas fueron *V. nigra, Penicillium* sp 7 y 10, sin embargo casi la totalidad de cepas evaluadas las produjeron, por lo que

se suman a la ya basta lista de hongos productores de dichas enzimas ya que son importantes desde el punto de vista fisiológico, debido a que están implicadas en muchos procesos celulares (Nirmal et al., 2011).

Aunque los microorganismos son una fuente importante de proteasas, las producidas por los hongos anamorfos son más prometedoras para estos fines ya que las proteasas fúngicas son más resistentes a diferentes condiciones físicas y químicas del entorno de producción (Srilakshmi, Madhavi, Lavanya, & Ammani, 2014). El uso primario de las proteasas es en la industria de los detergentes, alimentos, productos farmacéuticos, tratamiento de cuero, entre otros (Nirmal et al., 2011).

Producción de amilasas

Las amilasas son enzimas que degradan el almidón a azúcar, por lo que se ha utilizado con múltiples usos industriales, como la sacarificación del almidón para la producción de glucosa, fructosa y maltosa, lo cual tiene aplicación en la producción de bebidas alcohólicas, panificación. Además se han usado en la industria textil y del papel, así como en la producción de alimentos y aditivos en detergentes (Saranraj & Stella, 2013).

Las actividades amilolíticas encontradas en las cepas evaluadas coincidieron con las reportadas para especies de uso industrial como *Aspergillus* y *Penicillium* cuya producción de amilasas se ha documentado (Dar et al., 2015; Prasad, Singh, & Joshi, 2007). De las cepas evaluadas *V. nigra* presentó la actividad amilolítica más elevada (625 UA/dl) es decir aproximadamente 1.7 veces mayor a la de la levadura *Candida krusei* (353 UA/dl) que es empleada a nivel industrial para la producción de amilasas en la industria de las bebidas alcohólicas y de sacarificación del almidón. Además, la actividad enzimática de *V. nigra* fue comparable a la de especies como *A. niger* que es empleado para obtener azúcares reductores a partir de la degradación de almidón de yuca (Villalba, Bula, Juan, & Avila, 2008), lo que demuestra el potencial de dicho hongo para la producción de amilasas fúngicas aunque se trate de una cepa silvestre.

De modo similar, *A. niger* presentó la segunda actividad más alta (621.63 UA/dl) que es comparable con la misma especie reportada por Tester, Oi y Karkalas (2006) para la degradación de residuos agroindustriales, en donde demostraron su efectividad en la degradación de almidones crudos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. La capacidad para degradar almidón de otras especies de *Aspergillus* se ha demostrado mediante la inducción de sustratos como el salvado de trigo y el salvado de maíz (Alva et al., 2007).

Por otra parte, *Aspergillus* sp 2 y 3, *B. rhombica*, *Brachysporiella* sp., *C. splendida*, las morfoespecies 1 y 2, *Paecilomyces* sp 2 y *Penicillium* sp 1, 2, 3, 6, 9 y 10 mostraron actividades enzimáticas de entre 100 y 400 UA/dl, valores que son similares a los reportados por Castro y colaboradores (2011), acerca de la capacidad de los géneros *Penicillium, Rhizopus* y *Aspergillus* como productores de enzimas amilasas, celulasas y xilanasas para aplicaciones industriales. Por otro lado, se observó una baja actividad enzimática con *C. splendida* y *Phialocephala humícola* 1 y 2.

Producción de celulasas

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β-1, 4-D-glucano de la celulosa y producen glucosa, celobiosa y oligosacáridos. Las celulasas son producidas por varios microorganismos sin embargo, los principales agentes productores son los hongos, por lo que han sido estudiados para la producción de este grupo de enzimas (Sukumaran, Singhania, Mathew, & Pandey, 2009).

En el presente estudio se encontró que el 95% (38) de las cepas produjeron celulasas. Melo, Araujo, Chogi e Iolanda (2017) encontraron 25 de 28 (89%) cepas aisladas de hojarasca y suelo productoras de celulasas, por lo que enfatizaron la importancia que tienen estos hongos, tanto para fines ecológicos como biotecnológicos.

Las celulasas se utilizan para la producción de biocombustibles, a partir de celulosa, la cual es el biopolímero más abundante y ubicuo en la Tierra y es una materia prima casi inagotable y también se considera como un recurso renovable para la producción de energía (Sukumaran et al., 2009).

Producción de lipasas

Las lipasas microbianas han ganado especial atención debido a sus aplicaciones industriales lo que ha motivado el interés en su aislamiento a partir de nuevas fuentes microbianas. Los hongos constituyen una fuente de producción de lipasas, entre los que se incluyen *Aspergillus, Geotrichum, Mucor, Penicillum* y *Rhizopus* (Mehta, Bodh, & Gupta, 2017).

En este estudio el 50% de las cepas produjeron lipasas. En contraste, en un trabajo efectuado por Melo y colaboradores (2017) encontraron que todas las cepas aisladas de hojarasca y suelo producían lipasas. Las razones del enorme potencial biotecnológico de las lipasas microbianas son:

su estabilidad en disolventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato y exhiben una alta enantio-selectividad. La gran versatilidad de las lipasas permite su aplicación en diferentes industrias como alimentos, productos lácteos, detergentes y productos farmacéuticos.

Por otra parte, desde el punto de vista ecológico e industrial la combinación de la actividad de las celulasas, lacasas y lipasas son importantes en el proceso de degradación y aprovechamiento de la de los desechos vegetales (Balat, 2011; Melo et al., 2017).

Producción de lecitinasas

Los hongos posean una amplia gama de enzimas hidrolíticas (lecitinasas o fosfolipasas) que degradan los fosfolípidos, especialmente aquellos que causan infección en algún hospedero. Así las lecitinasas liberadas por los hongos anamorfos podrían desempeñar funciones importantes no solo para la adquisición de nutrientes y también en los procesos de infección (Tsitsigiannis, Kowieski, Zarnowski, & Keller, 2004). Las fosfolipasas son ubicuas y un grupo heterogéneo de enzimas que juegan un papel crítico en múltiples procesos fisiológicos, y regulan muchos eventos celulares críticos, incluida la dinámica del citoesqueleto, la interacción con las células huésped, la homeostasis de la membrana, la adquisición de nutrientes, la secreción, la transducción de señales y el tráfico vesicular. Las fosfolipasas también desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de una serie de hongos de importancia industrial (Barman, Gohain, Bora, & Tamuli, 2018).

En este estudio, el 55% de las cepas de hongos anamorfos evaluados produjeron lecitinasas. Aunque hay muy poca información respecto a la producción de lecitinasas por hongos anamorfos, se ha encontrado que dichas enzimas están relacionadas con la adquisición de nutrientes a partir de materia orgánica muerta o a partir de las células o reservas energéticas de organismos vivos (Köhler, Brenot, Hass-Stapleton, Agabian, Deva y Nigam, 2006).

Además, en diversos hongos patógenos, incluidas las especies de *Aspergillus* y *Candida*, las fosfolipasas actúan como posibles factores de virulencia y también son responsables de causar diversos efectos fisiopatológicos. Por lo tanto, las fosfolipasas son objetivos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos y como posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas (Barman et al., 2018).

Solubilización del fósforo

El fósforo es el principal elemento limitante en la producción agrícola, por lo que los hongos solubilizadores de este elemento desempeñan un papel muy importante en el incremento de su biodisponibilidad para las plantas (Sharma, Vijay, & Tripathi, 2011).

En este trabajo se encontró un total de 67.5% (27) hongos capaces de solubilizar el fósforo inorgánico. Aunque no se han encontrado estudios previos en hojarasca, si hay reportes de investigaciones en la rizosfera, en el cual encontraron 15 hongos entre anamorfos y levaduras solubilizadores de compuestos inorgánicos de fósforo (Gizaw, Tsegay, Tefera, Aynalem, Misganaw y Abatneh, 2017).

Finalmente, aunque los hongos anamorfos muestran una elevada capacidad para la producción de enzimas con potencial de aplicación a nivel industrial y para la degradación de sustratos ricos en almidón (Rengasamy & Thangaprakasam, 2018), hacen falta estudios para explorar no solo la diversidad fúngica de las cepas de hongos anamorfos, sino también su utilidad y aplicaciones en Guatemala. Asimismo se recomienda la optimización de las condiciones de cultivo para lograr la producción de mayores cantidades de enzimas y de sustancias antibióticas. Finalmente se recomienda que los compuestos sean purificados y caracterizados para conocer su estructura y comprender su mecanismo de acción para lograr su aplicación.

17. Conclusiones

- El 35% (14) de las cepas de hongos anamorfos evaluadas mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli*, en tanto que contra *P. aeruginosa* fue el 17.5% (7) y contra *S. aureus* 22.5% (9).
- El 70% (28) de las cepas estudiadas produjeron lacasas, el 87.5% (35) proteasas, el 92.5% (37) amilasas, el 95.0% (38) celulasas, el 50.0% (20) lipasas y el 55.0% (22) lecitinasas.
- El 67.5% (27) de las cepas estudiadas mostraron capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos de fósforo.

18. Impacto esperado

Guatemala cuenta con hongos anamorfos que constituyen parte de la diversidad biológica y pueden producir bienes y servicios, como por ejemplo:

- Dos cepas de *Stachybotrina* produjeron extractos que tienen potencial contra bacterias gram negativo.
- Dos cepas de *T. nivea* y una *Stachybotryna* son promisorias para producción industrial de lacasas.
- La mayoría de cepas produjeron proteasas, destacándose *V. nigra* y dos cepas de *Penicillium.*
- La actividad amilolítica de *V. nigra* es comparable a la de cepas de uso industrial, por lo que es promisoria.
- La mayoría de cepas produjeron celulasas, por lo que pueden usarse para la producción de biocombustibles, a partir de desechos agrícolas.
- La mitad de las cepas evaluadas produjeron lipasas, por lo que se deben estudiar para lograr su aplicación en diferentes industrias como alimentos, productos lácteos, detergentes y productos farmacéuticos.
- Poco más de la mitad de las cepas produjeron lecitinasas, por lo que son prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos y como posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas.
- Más de la mitad de las cepas evaluadas capaces de solubilizar el fósforo inorgánico, por lo que pueden utilizarse como biofertilizantes en la agricultura.

Los resultados de investigación pueden ser aprovechados desde el punto de vista docente sobre los recursos tecnológicos con los que cuenta Guatemala y su aplicación a nivel de laboratorio. Más trabajos de evaluación terminal.

19. Referencias

Adrio, J., & Demian, A. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology, 6*, 191-199.

Alexander, M. (1980). *Introduction to Soil Microbiology*. (2nd Ed.). New Jersey: John Wiley and Sons.

Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. (4th Ed.). New Jersey: John Wiley and Sons.

Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y., Vyshali, P., Shruti, M., & Ruchi, K. (2007). Production and characterization of fungual amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. African Journal of Biotechnology, *6*(5), 576-581.

Barman, A., Gohain, D., Bora, U., & Tamuli, R. (2018). Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiological Research, 209*, 55-69. Doi: 10.1016/j.micres.2017.12.012

Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion Management, 52*, 858-875.

Brakhage, A. (2012). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology, 11*, 21-32.

Bran, M., Morales, O., & Figueroa, R. (2017). [Diversidad y bioprospección de hongos anomorfos en Guatemala (fase I): taxonomía, ecología y aislamiento en dos localidades del centro del país. Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial, Proyecto 4.8.63.6.03. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación, Guatemala.].

Brujwani, K. Rigdon, A., & Vadlani, P. (2010). Fungal Laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research, 2010*(5), 1 - 10.

Cáceres, A. (2015). From traditional uses of Mesoamerican medicinal plants to modern phytotherapy in Guatemala. *Planta Medica, 81*(16), PL_08.

Castro, A., Andréa, T., Carvalho, D., Teixeira, M., Reis-Castilho, L., & Freire, D. (2011). Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. Waste and Biomass Valorization, *2*(3), 291-302. Doi: 10.1007/s12649-011-9075-5

Cepero, M., Restrepo, S., Franco-Molano, A., Cárdenas, M., & Vargas, N. (2012). *Biología de hongos.* Bogotá: Ediciones Uniandes.

Chaparro, D., & Rosas, D. (2006). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la Reserva Natural la Montaña del Cosao, Quimbaya-Quindío (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

Dar, G., Kamili, A., Nazir, R., Bandh, S., Jan T., & Chishti, M. (2015). Enhanced production of α-amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis, 88*, 10-15.

Demain, A., & Sánchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics, 62*, 5-16.

Dighton, J. (2007). Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. In C. Kubicek & I. Druzhinina (Eds.), *The Mycota IV, environmental and microbial relationships* (pp. 287-300). Berlin: Springer-Verlag.

Estebanez, M., Heredia, G., & Gamboa, M. (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología, 28*, 49-56.

Gamboa, M., & García, S. (2008). Potencial biológico y creatividad química de hongos microscópicos del trópico americano. En G. Heredia. *Tópicos sobre diversidad, ecología y biotecnología de los hongos microscópicos* (pp. 253-272). Veracruz: Prograf.

Gamboa-Angulo, M., De la Rosa-García, G., Heredia-Abarca, G., & Medina-Baizal, I. (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatán peninsula, México. *African Journal of Microbiology Research, 6*, 2305-2312.

Gizaw, B., Tsegay, Z., Tefera, G., Aynalem, E., Misganaw, W., & Abatneh, E. (2017). Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa and Gojam, Ethiopia. *Journal of Fertilizers & Pesticides, 8*(2), 2471-2728.

Gudynaine-Savitch, L., & White, T.C. (2016). Fungal biotechnology for industrial enzyme production: focus on (Hemi)cellulase production strategies, advances and challenges. In M. Schmoll & C. Dattenböck (Eds.). *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 395-439). Cham: Springer International Publishing.

Gutiérrez-Pulido, H. & De la Vara, R. (2008). *Diseño y análisis de experimentos*. (2da Ed.). México: McGraw-Hill.

Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In Hofricher M., Steinbüchel, A. (eds) *Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications* (pp 129-180). Lignin humic substances and coal. Weinheim: Wiley VCH.

Hateet, R., Muhsin, T., & Humadi, K. (2014). Antibacterial activities secondary metabolites from endophytic fungus *Fusarium solani*. *Journal of Basrah Researches (Sciences), 40*, 94-101.

Hendricks, C., Doyle, J., & Hugley, B. (1995). A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied 28and Environmental Microbiology, 61*(5), 2016-2019.

Jensen, V. (1974). Decomposition of angiosperm tree leaf litter. In Dickinson, C. & Pugh, G. *Biology of plant litter descomposition I* (pp. 69-104). London: Academic Press.

Joshi, J., Spieth, P., & Patel, A. (2018). Cell cultures and endophytes from Indian plants as sources for antimicrobials. *Chemie Ingenieur Technik 90*(9), 1284-1284.

Köhler, G., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., & Nigam, S. (2006). Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta, 1761*(11), 1391-1399.

Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., & Stalpers, J. (Eds.) (2008). *Dictionary of the Fungi*. (10th Ed.). London: Centre for Agriculture and Biosciences International.

Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., & Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 14*(1), 125-131.

Lagunes, M., López, A., Ramos, A., Trigos, A., Salinas, A., & Espinoza, C. (2015). Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología, 33*(1), 87-94.

Levin, B., & Bonten, M. (2004). Cycling antibiotics may not be good for your health. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*, 13101-13102.

Livermore, D. (2012). Fourteen years in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents, 39*, 283-294. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012

MacFaddin, J. (2000). *Biochemical test for identification of medical bacteria*. (3th Ed.). Philadelphia: Lippincott William & Wikins.

Manoharachary, C., Sridhar, K., Singh, R., Adholeya, A., Suryanarayanan, T., Rawat, S., & Johri, B. (2005). Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science, 89*(1), 58-71.

Martínez, J. (2004). Análisis de varianza por un factor. México. Recuperado de http://www.docstoc.com/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-DE-LA-VARIANZA-POR-UN-FACTOR-JUAN

Melo, M., Araujo, A., Chogi, M., & Iolanda, D. (2017). Cellulolytic and lipolytic fungi isolated from soil and leaf litter samples from the Cerrado (Brazilian Savanna). *Revista de Biología Tropical, 66*(1), 237-245.

Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases: a review. *Journal of Biotech Research, 8*, 58-77.

Nevalainen, H. & Te'o, V. (2003). Enzyme production in industrial fungi-molecular genetic strategies for integrated strain improvement. *Applied Mycology and Biotechnology, 3*, 241-259.

Nirmal, N., Shankar, S., & Laxman, R. (2011). Fungal proteases: An overview. International *Journal of Biotechnology and Biosciences, 1*(1), 1-40.

Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, *22*, 189–259.

Prasad, S., Singh, A., & Joshi, H. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, *50*(1), 1-39. doi: 10.1016/j.resconrec.2006.05.007

Punt, P., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Magnus, J., & van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology, 25*(5), 200-206.

Quintanilla, D., Hagemann, T., Hansen, K., & Gernaey, K. (2015). Fungal morphology in industrial enzyme production –modelling and monitoring. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 149,* 29-54.

Peña-Montes, C., González, A., Castro-Ochoa, D., & Farrés, A. (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 78*, 603-612.

Ramos, A. & Callao, V. (1967). El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. *Microbiología Española, 20*, 1-12.

Reyes-Estebanez, M., Herrera-Parra, J., Cristóbal-Alejos, G., Heredia-Abarca, B., Canto-Canché, I., Medina-Baizal, M., & Gamboa-Angulo, M. (2011). Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in México. *African Journal of Microbiology Research, 5*, 1083-1089.

Rengasamy, S. & Thangaprakasam, U. (2018). Isolation, screening and determination of A-amylase activity from marine *Streptomyces* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 10*(4), 122-127.

Sarmiento, V., Vargas, D., Pedroza, A., Matiz, A., & Poutou, R. (2003). Producción de alfa-amilasa con células libres e inmovilizadas de *Thermus* sp. *Revista MVZ Córdoba, 8*(2), 310-317.

Saranraj, P. & Stella, D. (2011). Fungal amylase: A review. International Journal of *Microbiological Research, 4*(2), 203-211. Doi: 10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170.

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011). *The genera of Hyphomycetes*. Hong Kong: APS press.

Sukumaran, R., Singhania, R., Mathew, G.M., & Pandey, A. (2009) Cellulase Production Using Biomass Feed Stock and Its Application in Lignocellulose Saccharification for Bio-Ethanol Production. *Renewable Energy, 34*, 421-424.

Sharma, S., Vijay, K., & Tripathi, R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 1*, 90-95.

Shin, H., Lee, J., Park, C., & Kim, S. (2011). Utilization of glycerol as cysteine and carbon sources for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum* M35 in methionine unsupplemented culture. *Journal of Biotechnology, 151*, 363-368.

Sinsabaugh, R. (2005). Fungal enzymes at the community scale. In J. Dighton, J. White, & P. Oudemans (Eds). *The fungal community: its organization and role in the ecosystem* (pp. 349–360). Boca Raton: Taylor & Francis.

Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., & Ammani, K. (2014). Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2*(4), 218 - 234.

Tester, R., Qi, X., & Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology, 130*(1), 39-54. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.01.016

Trigos, A., Mendoza, G., Luna, M., Heredia, G., & Arias, R. (2005). Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología 20*, 89-92.

Tsitsigiannis, D., Kowieski, T., Zarnowski, R., Keller, N. (2004). Endogenous lipogenic regulators of spore balance in Aspergillus nidulans. Eukaryot Cell, 3(6), 1398-1411.

Trigos, A., Onorio, C., Espinoza, S., & Morales, Y. (2006). Antibiotic activity of several phytopathogenic fungi. *Micología Aplicada International, 18*(1), 3-6.

Villalba, P., Bula, A., Juan, H., & Ávila, A. (2008). Yucca (*Manihot esculenta* Crantz) starch polysaccharide dextrination through biological procedures. *Interciencia, 33*(4), 314-316.

Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Praveen, K., & Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. Enzyme Research, 2014, 1-21.

Virgina, S. (1999). Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. (3rd Ed.). England: Cambridge University Press.

Yamada, T., Iritani, M., Ohishi, H., Tanaka, K., Minoura, K., Doi, M., & Numata, A. (2007). Pericosines, antitumour metabolites from the sea hare-derived fungus Periconia byssoides. Structures and biological activities. *Organic & Biomolecualr Chemistry, 5*, 3979-3986.

20. Apéndice

Listado de los integrantes del equipo de investigación

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	**Firma**
Licda. María del Carmen Bran	
Lic. Osberth Morales Esquivel	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	**Categoría**	**Registro de Personal**	**Pago**		**Firma**
			SI	**NO**	
Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos	Investigador I	20151723	X		

Guatemala, 09 de enero de 2019

Licda. María del Carmen Bran González
Coordinadora del proyecto de Investigación (4.8.63.6.10)

Vo.Bo. Inga. Liuba Cabrera
Coordinador PUIDI

Vo.Bo. Ing. Rufino Salazar
Coordinador general de programas