

**REPÚBLICA DE PANAMÁ**  
**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Optimización para la producción de metabolitos secundarios por hongos endófitos  
mediante elicitores abióticos de tipo químico y control de dos parámetros: pH y  
temperatura.**

**ELABORADO POR:**

**AGUILAR P. MADELAINE M.**

**Trabajo de graduación presentado a la  
Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales,  
Exactas y Tecnología como requisito parcial para  
Optar por el Título de Licenciada en Biología  
Con Orientación en Microbiología y Parasitología**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2015**

**MSc Humberto Cornejo**

**Profesor Asesor**

**Departamento de Microbiología y Parasitología**

## **DEDICATORIA**

A mi Dios todo poderoso que con su mano me ha guiado a lo largo de mi vida. A mis padres José L. Aguilar y Elena M. Pérez de Aguilar que me brindaron su apoyo día y noche. A mi amado hermano por estar en todo momento y por su inmenso amor. A mis abuelos maternos y paternos que me supieron educar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo incondicional de la profesora Nivia Judith Rios y al Dr. Luis Cubilla por la oportunidad brindada en el laboratorio de Biorgánica Tropical. A todos los amigos que en el día a día aprendí a conocer y amar María Julca, Kathleen Hernández, Manuel Jurado, Victor Rosales, Agustín Almanza. A todos mis familiares entre ellos mis tías Ana Matilde, Olga, y Dalila por su amor de madres; A mis amigos especialmente a Katherine Rangel, Sergio Mosquera y Ernesto Campos por su incondicional cariño.

## RESUMEN

Esta investigación se basa en el estudio de tres hongos para determinar cuáles son los niveles óptimos en la producción de biomasa, diversidad de compuestos y actividad biológica contra bacterias. Para ello se cultivaron en distintos medios y condiciones utilizando como inductores las sales inorgánicas  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  y el aminoácido Glu.; los cuales fueron seleccionados previamente bajo criterios de bioactividad y diversidad metabólica. Las cepas fueron cultivadas en medios a distintos pH, los mismos fueron preparados con soluciones amortiguadoras donde se utilizó sal de Citrato de Na/50mmol L<sup>-1</sup> como regulador de acidez para los pH 4.0, 4.6, 5.6 en medio MEA y MOPS 3- (N-morfolino) propanosulfónico para el pH de 6.6 en el medio SAB. Cumplido el periodo de incubación se elaboraron los extractos a partir del cultivo de cada hongo. Se registró el peso de la biomasa, de cada uno los extractos, los cuales posteriormente fueron probados en bioensayos contra bacterias para comparar y mostrar el incremento o disminución de la actividad inhibitoria basado en el tamaño del halo y número de bacterias sensibles a los mismos luego se seleccionaron los extractos que mostraron mayor actividad inhibitoria y diversidad de metabolitos observados mediante la técnica de CCD y se replicaron las condiciones, pero en este caso se aplicaron tratamientos a distintas temperaturas de incubación (Temperatura Ambiente, 24 °C, 28 °C) para determinar la temperatura óptima donde se registraba un incremento en la biomasa, en la actividad inhibitoria y del número de metabolitos de cada uno de acuerdo a los tratamientos. Se obtuvieron para cada hongo condiciones específicas de cultivo donde se logró aumentar el número de bacterias inhibidas y la producción de biomasa de cada hongo mostrando que las condiciones que influyeron en el cambio de su masa y actividad inhibitoria en cada hongo fueron para Hd 08 MEA +  $\text{CuSO}_4$  + pH 4.0 T + 28 °C y MEA +  $\text{CuSO}_4$  + pH 4.0 + 24 °C, para Hd 18 la condición MEA +  $\text{CuSO}_4$  + pH 4.0 + 24 °C y para LC 46 la condición SAB +  $\text{CaCl}_2$  + pH 6.6 +

24 °C lo que indica que en este caso a pH de 4.0 T y temperatura de 24 °C parámetros que fueron común a dos de las cepas estudiadas mostraron un incremento en su biomasa y actividad. En cambio el hongo LC 46 obtuvo un aumento en condiciones particulares como lo es un pH 6.6 y una temperatura de 28 °C.

## ABSTRACT

This research is based on the study of three fungi to determine which are the optimum levels in the production of biomass, diversity of compounds and biological activity against bacteria. To do this were cultivated in different ways and conditions by using inductors as inorganic salts  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  and the amino acid Glu. , Which were previously selected criteria under bioactivity and metabolic diversity. The strains were cultured in media at different pH, the same were prepared with buffer solutions was used where Citrate salt of Na/ 50mmol L<sup>-1</sup> as a regulator of acidity to the pH 4.0 , 4.6 , 5.6 in the middle and MEA MOPS 3- (N-morpholine) propanesulfonic Acid to pH of 6.6 in the middle SAB. Fulfilled the incubation period were developed the extracts from the cultivation of each fungus. Registration is the weight of the biomass, of each of the extracts, which were subsequently tested in bioassays against bacteria to compare and show the increase or decrease of the inhibitory activity based on the size of the halo and number of bacteria sensitive to the same then the extracts were selected that showed greater inhibitory activity and diversity of metabolites observed using the technique of CCD and replicated the conditions, but in this case treatments were applied to different incubation temperatures (room temperature, 24 °C, 28 °C) to determine the optimum temperature where there was an increase in the biomass in the inhibitory activity and the number of metabolites of each one according to the treatments. Were obtained for each fungus conditions of specific crop where they managed to increase the number of bacteria inhibited and biomass production of each fungus showing that the conditions that influenced the change of their mass and inhibitory activity in each fungus were for HD 08 MEA  $\text{CuSO}_4$  pH 4.0 T 28 °C and MEA  $\text{CuSO}_4$  pH 4.0 24 °C, for Hd 18 the condition MEA  $\text{CuSO}_4$  pH 4.0 and 24 °C for LC 46 the condition SAB  $\text{CaCl}_2$  pH 6.6 24 °C which indicates that in this case at a pH of 4.0 T and temperature of 24 °C parameters that were common to two of the studied strains showed an

increase in their biomass and activity. In contrast the fungus LC 46 obtained an increase in special conditions as it is a pH 6.6 and a temperature of 28 °C.

## INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre comenzó a utilizar los elementos que el medio natural le ofrecía, emprendió una etapa de explorar, identificar, utilizar, transformar y domesticar especies que le representaban algún tipo de beneficio. Sin embargo, en la actualidad esta búsqueda se ha intensificado debido a un aumento en el número de personas a nivel mundial que presentan problemas de salud causados por ciertos tipos de cáncer, bacterias resistentes a los medicamentos, los protozoos parásitos, virus y hongos.

La intensa búsqueda de nuevos agentes más eficaces para hacer frente a estos problemas está en marcha y se espera que mediante el empleo de tecnologías de punta, se logre dar un mejor uso y manejo sostenible a los recursos naturales, no solo desde el punto de vista de beneficio económico, sino también a nivel de conservación de las especies (Strobel et al., 2002). Dicha actividad se conoce como bioprospección o prospección biológica.

Aunque el término bioprospección es una denominación nueva, existe una historia muy antigua que describe el uso de procesos biológicos para la fabricación de productos, la cual abarca desde el empleo de la fermentación alcohólica en épocas anteriores, pasando por la fabricación de antibióticos, hasta el uso actual de la proteómica y la genómica para abrir nuevas perspectivas de uso y acceso a recursos que antes no se conocían.

El propósito del presente estudio será investigar la influencia de las condiciones del medio de cultivo, la elicitación y los factores ambientales sobre la producción de metabolitos bioactivos de hongos endófitos cuya bioactividad, ya es conocida determinando las condiciones óptimas de crecimiento y producción de los metabolitos de interés.

La bioprospección de los bosques tropicales es el enfoque de esta investigación, no sólo para cosechar sus microorganismos endófitos, sino para contribuir finalmente a una mejor comprensión

de la importancia y el valor que tienen estos para la humanidad, promoviendo de esta forma su conservación.

Además de las plantas, los microorganismos constituyen una fuente importante de productos naturales con propiedades bioactivas eficaces; dentro de ellos, los hongos, de los cuales se han aislado antibióticos  $\beta$ -lactámicos, griseofulvina, ciclosporina A, taxol, alcaloides y lovastatina; no obstante, aún se continúan reportando nuevos productos naturales de estructuras químicas variadas producidas por hongos (Grabley y Sattler et al., 2003) (Mitchell et al., 2008) (Stadler y Keller et al., 2008).

Sabemos que sólo el 7% de los aproximadamente 1,5 millones de especies de hongos (Hawksworth et al., 2004) han sido cultivados y seleccionados para la producción de medicamentos. Por lo tanto, es lógico postular que sólo hemos descubierto un pequeño porcentaje de los metabolitos de importancia biomédica y económica de origen fúngico. Por su capacidad versátil, de alimentación heterótrofa, los hongos reflejan su capacidad de explotar una variedad de sustratos y hábitats (Suryanarayanan y Hawksworth et al., 2005) (Hyde et al., 2005).

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS**

Algunos de los metabolitos primarios sirven como un punto de ramificación de las rutas biosintéticas que conducen al producto final del metabolismo primario y secundario.

Los metabolitos secundarios microbianos tienen características comunes como lo son:

- Mostrar amplias actividades biológicas, especialmente de relevancia farmacéutica (antimicrobianos, antitumorales, antivirales, farmacológicos, y actividades similares).

- Son productos metabólicos que se encuentran como sustancias diferenciadas en grupos taxonómicamente específicos.
- Son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (< 3.000) con una amplia gama de complejidades estructurales; la estereoquímica determina a menudo un papel crucial para sus actividades biológicas.
- Frecuentemente se acumulan después de que el crecimiento vegetativo o exponencial ha cesado, como familias (complejas) de compuestos relacionados estructuralmente (congéneres).

Por lo general, la producción biotecnológica de microorganismos se da en función de sus adaptaciones especiales a su entorno (Padmavathi et al., 2012). Ahora bien, sabiendo que las condiciones de cultivos afectan los perfiles de metabolitos producidos por los microorganismos, esto ha llevado a los investigadores a realizar diferentes experimentos para optimizar la producción de metabolitos en cuanto a masa y diversidad de los mismos, este método conocido como OSMAC (One Strain-Many Compounds) por sus siglas en inglés (una cepa de muchos compuestos) se basa en la utilización de medios de cultivos variados para simular diferentes entornos y por consiguiente inducir la producción de diferentes metabolitos.

La capacidad de los hongos para ser cultivados en el laboratorio y el hecho de que la producción de metabolitos puede ser optimizada y puede realizarse en medios líquidos o sólidos (Adelin et al., 2011) o en fermentadores (Omura, 1992) nos brinda una oportunidad para explotar. Las condiciones de cultivo sustancialmente controladas por la composición del medio de cultivo y parámetros bióticos y abióticos (Arroyo et al., 2013) (Kaeberlein et al., 2002).

Una manera de acortar el tiempo del desarrollo es integrando la mejora de líneas con el desarrollo de los procesos. Los procesos de desarrollo incluyen la optimización del medio, que es un paso clave, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno afectan en gran medida el crecimiento y la producción de metabolitos (represión por metabolito); además, los recursos adecuados pueden mejorar la biosíntesis de un metabolito requerido y otros parámetros de la fermentación (pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros.) también pueden afectar al crecimiento y a la estabilidad productiva y deben ser cuidadosamente controlados durante el escalado a los procesos productivos.

La tecnología genética se utiliza para obtener un perfil de producción ideal, por ejemplo para sobre expresar los genes que llevan al producto deseado o inactivar genes que llevan a productos no deseados y mejorar la autoresistencia de la línea de producción, incrementando tanto estabilidad como la concentración de la molécula deseada.

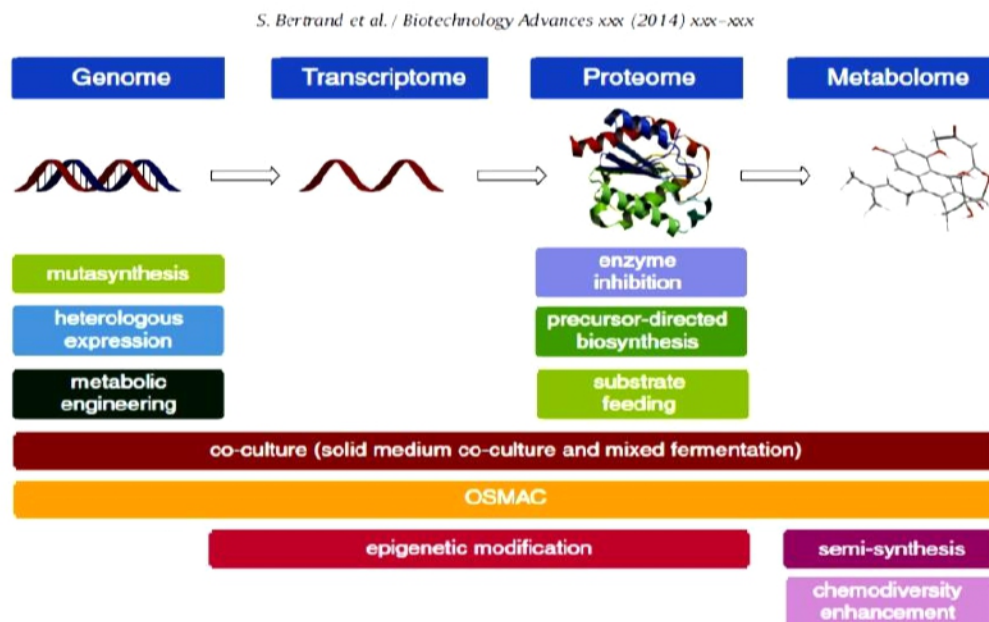


Fig 1. Métodos para influenciar la biosíntesis de metabolitos secundarios en microorganismos. La parte superior (azul y verde) muestra la demanda de conocimiento de la secuencia del genoma. Abreviatura: OSMAC, una cepa de muchos compuestos. *Figura tomada de Biotechnology Advances* (S. Bertrand et al., 2014).

Con el desarrollo de técnicas la biología molecular permite que los microorganismos también puedan ser diseñados para producir compuestos específicos.

Una reciente estrategia prometedora es el descubrimiento guiado por genoma de nuevos metabolitos basándose en el reconocimiento de genes típicamente silentes o crípticos para el metabolismo secundario, seguido por el uso de condiciones de cultivo poco habituales para inducir su expresión. Las moléculas deseadas se obtendrán a través de la expresión heteróloga que el organismo utiliza para eludir problemas de cultivo; esto da acceso a otra manera de activar los genes crípticos o clusters (Gómez-Escribano y Bibb, 2014); (Schneider et al., 2008).

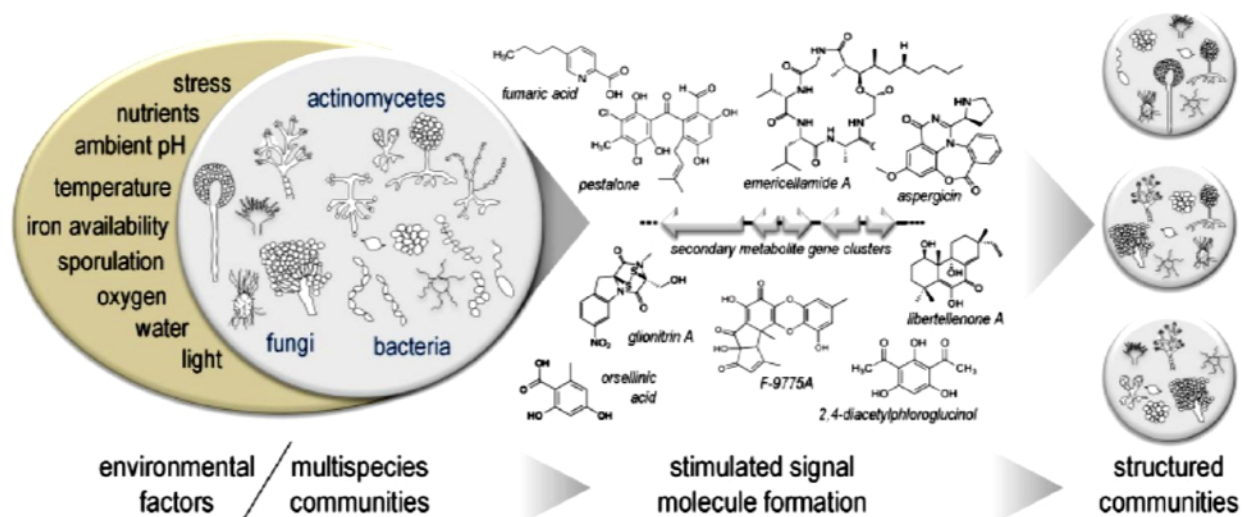


Fig.2. Múltiples especies de microorganismos forman comunidades que contribuyen a la estabilización de metabolitos secundarios. En la naturaleza, los microorganismos procesan las señales de ambos ambientes abióticos y bióticos; estos últimos ayudan a la síntesis de metabolitos secundarios o productos naturales cuya formación es a menudo suprimida en cultivos puros. Figura tomada de Biotechnology Advances (S. Bertrand et al., 2014)

## ELICITACIÓN

Tradicionalmente, la optimización en los análisis biológicos se ha llevado a cabo mediante el control de la influencia de un factor pero en los últimos años se han realizado algunos estudios utilizando el manejo de múltiples factores como temperatura, pH, intensidad lumínica y recientemente, se ha implementado la adición de sustancias al medio de cultivo conocido como elicitación.

La elicitación es un conjunto de técnicas en las que se somete las células de un organismo en particular al cambiar los factores externos, induciendo mecanismos de defensa que en ocasiones incrementan la síntesis de metabolitos específicos. Dichos factores son llamados elicitores y se clasifican de acuerdo a:

Su naturaleza, en:

- Bióticos: quitosano, metiljasmonato, alginato (Dong y Zhong, 2002; Conceicao et al., 2006; Ignatov et al., 1999; Wang y Zhong et al., 2002)
- Abióticos: Sales inorgánicas, aminoácidos, metales pesados, estrés térmico, estrés osmótico (Yu et al., 2005; Wu et al., 2001).

O de acuerdo a la interacción organismo-elicitor, en:

- General: metiljasmonato, ácido salicílico, si estos desencadenan una respuesta de defensa en cualquier organismo.
- Específicos: cuando sólo actúan sobre una especie en particular (Vasconsuelo y Boland et al., 2007).

Las condiciones del medio de cultivo para la obtención de un metabolito particular mediante la elicitación, requiere la determinación de la dosis óptima y el tiempo adecuado de aplicación del

elicitor, así como la respuesta en el tiempo del cultivo y los efectos combinados de distintos elicitores. Para determinar la dosis óptima del elicitor que maximiza la producción del metabolito de interés, se debe evaluar el efecto de la concentración de éste sobre el crecimiento y la producción de la molécula de interés (Thanh et al., 2005 y Zhao et al., 2004).

En cuanto al efecto sobre la producción, se ha encontrado que hay un incremento en ésta; a medida que aumenta la concentración del elicitor hasta un valor máximo, después decrece nuevamente, probablemente por la saturación de los receptores o por que dicha molécula puede ser tóxica para la célula.

Es por esta razón que en esta investigación los inductores que se utilizaron fueron compuestos químicos del grupo de las sales inorgánicas  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y el aminoácido Glu. de tipo orgánico los cuales fueron previamente seleccionados con base a la actividad obtenida previamente en bioensayos y la diversidad química producida al agregarlos al medio de cultivo esto nos permitió mediante un estudio guiado aplicar tratamientos donde se controlaron los factores abióticos como la concentración de iones de hidronio  $[\text{H}_3\text{O}]^+$  en el medio de cultivo (pH) y distintas temperaturas de incubación para cada hongo, y así lograr observar que factores incrementan la diversidad de metabolitos, la biomasa y por ende la actividad inhibitoria de los mismos.

## **BACTERIAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA**

Una de las razones específicas por la que se desarrolla esta investigación es el persistente incremento de las resistencias bacterianas las cuales han sido identificadas desde hace mucho tiempo, aunque quizás no tan bien la magnitud de su impacto en salud pública. Si bien no hay

demasiados datos de lo que hace resistentes a las bacterias que afectan a los seres humanos, la mayor información proviene, en forma bastante lógica, del campo hospitalario.

Un listado de las bacterias resistentes de mayor trascendencia en infecciones hospitalarias, debería incluir a:

- *Staphylococcus* meticilino-resistentes
- *Enterobacter cloacae*
- *Enterococos sp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Por su parte, en la población urbana o rural, las infecciones por microorganismos resistentes serían causadas por:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Escherichia coli*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Salmonella sp.*
- *Campylobacter sp.*

La emergencia de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos está, obviamente, ligada a la utilización de este tipo de agentes. Es claro, sin embargo, que, si los antibacterianos se utilizaran, en todos los casos, en forma racional, las resistencias serían mucho más raras de lo que,

efectivamente, son. Por lo tanto, la mala utilización de antibacterianos es una condición para la emergencia y el desarrollo de resistencias.

### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LA PLANTA A PARTIR DE LA CUAL SE AISLARON DOS HONGOS ENDOFITOS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN**

Dos de los endófitos utilizados para esta investigación se aislaron de *Hyptis dilatata*, la cual es una hierba aromática, que posee un tallo de 1m de alto, a menudo hojas pequeñas oblongas, linear-oblonga raramente o fuertemente linear, capítulos densamente cubierto de pelos, corolla lavanda-azul o blanca. Distribución Norte y este de Bolivia, Panamá, Colombia y Norte de Brazil. (H.J. Cuddy et al., 1969)



Fig. 3. *Hyptis dilatata*. Figura tomada de Flora of Panama.

## INDICE

<b>MSc Humberto Cornejo</b> .....	2
A mi Dios todo poderoso que con su mano me ha guiado a lo largo de mi vida. A mis padres José L. Aguilar y Elena M. Pérez de Aguilar que me brindaron su apoyo día y noche. A mi amado hermano por estar en todo momento y por su inmenso amor. A mis abuelos maternos y paternos que me supieron educar. ....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
Agradezco el apoyo incondicional de la profesora Nivia Judith Rios y al Dr. Luis Cubilla por la oportunidad brindada en el laboratorio de Biorgánica Tropical. A todos los amigos que en el día a día aprendí a conocer y amar María Julca, Kathleen Hernández, Manuel Jurado, Victor Rosales, Agustín Almanza. A todos mis familiares entre ellos mis tías Ana Matilde, Olga, y Dalila por su amor de madres; A mis amigos especialmente a Katherine Rangel, Sergio Mosquera y Ernesto Campos por su incondicional cariño. ....	4
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS</b> .....	10
<b>ELICITACIÓN</b> .....	14
<b>BACTERIAS Y RESISTENCIA ANTIBIÓTICA</b> .....	15
<b>DESCRIPCIÓN BREVE DE LA PLANTA A PARTIR DE LA CUAL SE AISLARON DOS HONGOS ENDOFITOS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN</b> .....	17
<b>INDICE</b> .....	18
<b>ANTECEDENTES BASADOS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS POR LAS ESPECIES FÚNGICAS UTILIZADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN</b> .....	21
Cladosporium sp. (Hd 18):.....	22
<i>Lentinus strigellus</i> (LC 46): .....	22
Pestalotiopsis microspora (Hd 08): .....	22
<b>Objetivo general:</b> .....	23
<b>Objetivos específicos:</b> .....	23
<b>HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>METODOLOGÍA</b> .....	25
<b>A. Selección de las cepas</b> .....	25
<b>B. Medios de cultivos seleccionados para cada cepa:</b> .....	25

C. Inductores seleccionados: .....	26
<b>I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS SECUNDARIOS.....</b>	<b>27</b>
A. Preparación de soluciones amortiguadoras:.....	27
B. Preparación del medio de cultivo: .....	27
<b>II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS SECUNDARIOS.....</b>	<b>28</b>
<b>III. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE LOS CULTIVOS REALIZADOS CON LAS CEPAS SELECCIONADAS .....</b>	<b>29</b>
<b>IV. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR (MÉTODO KIRBY BAUER).....</b>	<b>30</b>
A. Preparación del estándar de turbidez: .....	30
B. Inoculación de las placas Petri:.....	30
<b>V. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD QUÍMICA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD).....</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
A. determinación del efecto del pH sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios. ....	34
B. Actividad inhibitoria influenciada por el tratamiento de pH.....	36
C. Influencia de la temperatura en la biomasa y diversidad metabólica producida por cada hongo.....	37
D. Actividad inhibitoria de cada extracto elaborado a partir de cultivos a condiciones previamente seleccionadas incubados a distintas temperaturas.....	39
<b>DIVERSIDAD QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ELABORADOS A PARTIR DE LAS CEPAS CULTIVADAS.....</b>	<b>40</b>
<b>RELACIÓN DIVERSIDAD QUÍMICA - ACTIVIDAD INHIBITORIA .....</b>	<b>42</b>
<b>CONDICIONES DE CULTIVO PARA CADA HONGO BASADO EN LOS RESULTADOS DE AUMENTO DE BIOMASA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y DIVERSIDAD QUÍMICA MEDIANTE ADICIÓN DE ELICITORES ABIÓTICOS DE TIPO QUÍMICO Y CONTROL DE DOS PARAMETROS: pH Y TEMPERATURA.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
<b>GRÁFICOS .....</b>	<b>61</b>
<b>FIGURAS .....</b>	<b>84</b>



## **ANTECEDENTES BASADOS EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS POR LAS ESPECIES FÚNGICAS UTILIZADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN**

Durante varios años, los productos naturales se han utilizado directamente como drogas o han aportado la arquitectura química básica para derivar tales fármacos. Existen al menos 200 mil metabolitos naturales con propiedades bioactivas (Berdy et al., 2005). Alrededor del 52% de los nuevos productos químicos introducidos en el mercado en todo el mundo durante los años 1981 a 2002 fueron productos naturales o sus derivados (Chin et al., 2006).

Desde los comienzos de las investigaciones cuyo objetivo era la búsqueda de nuevos fármacos las plantas fueron los organismos pioneros a partir de la cual se comenzaron a aislar metabolitos de interés médico; sin embargo, la teoría sobre la existencia de organismos endófitos se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar aquellos organismos fúngicos que viven dentro de las plantas (Léveillé et al., 1846); (de Bary et al., 1866), pero el significado de este término ha variado acorde con el avance del conocimiento en este campo (Wilson et al., 1995). En la actualidad existe algún grado de consenso en aceptar a los endófitos como organismos que viven asintóticamente dentro de tejidos aéreos vegetales vivos (Carroll et al., 1986), e incluso en raíces, pero excluyendo los hongos productores de micorrizas (Saikkonen et al., 1998). Los hongos endófitos se encuentran en prácticamente todas las plantas, estudiadas hasta ahora, de las cuales parece que sólo se han estudiado y analizado algunos de sus metabolitos bioactivos, dando como resultado la oportunidad de encontrar nuevas e interesantes moléculas de estos microorganismos.

A menudo las sustancias orgánicas extremadamente inusuales y valiosas son producidas por hongos endófitos con la finalidad de proteger a su planta hospedera, sin embargo, estos compuestos, una vez aislados y caracterizados, también pueden tener uso potencial en la medicina moderna, la agricultura y la industria.

*Cladosporium* sp. (Hd 18):

A partir de esta cepas se aislaron dos policétidos de la familia de los dépsidos, la uredinina A y el 4-[(2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoil)oxi]-2-hidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenilo, del hongo *Cladosporium uredinicola*, un endófito de la guayaba (*Psidium guajava*, Rosaceae) (Medeiros et al., 2012).

*Lentinus strigellus* (LC 46):

Esta seta se encuentra en ciertas partes de América del Sur, la cual se ha reportado como una fuente de polisacáridos bioactivos. Este es el primer informe de este hongo como biocatalizador en reacciones orgánicas.

El basidiomycete *Lentinus strigellus* se ha cultivado en tres medios de cultivo diferentes y se aislaron e identificaron los metabolitos secundarios producidos bajo diferentes condiciones de cultivo. El echinuline alcaloide indólico y el fiscione antraquinona. También se aislaron Panepoxydona e isopanepoxydona cuando el microorganismo se cultiva en medio Czapek.

*Pestalotiopsis microspora* (Hd 08):

Esta cepa posee una matriz diversa de nuevos compuestos que ha mostrado producir. Como tal, se cree que es una rica fuente para la bioprospección cuando se compara con los de los demás géneros de hongos (Aly y Xu et al., 2010). (Strobel y Larga et al., 1998) muchos investigadores describieron a *Pestalotiopsis* como el “E. coli de los sistemas templados y tropicales de la selva tropical”. Las especies de *Pestalotiopsis* pueden tener un papel importante en los ecosistemas; tienen una distribución geográfica cosmopolita y se encuentran en casi todas partes (Tejesvi et al. 2007a). Las especies de *Pestalotiopsis* han sido utilizadas para producir un gran número de metabolitos que pueden tener aplicaciones industriales, agrícolas y medicinales. La mayoría de las cepas endofíticas de *Pestalotiopsis* (Lee et al 1996;.. Strobel et al 1996a, b; Li y Strobel 2001)

además de algunas cepas patógenas (Kwon et al., 1996). han demostrado producir alcaloides, terpenoides bioactivos, derivados, isocumarina cumarinas, cromonas, quinonas, semiquinonas, péptidos, xantonas, derivados de xantonas, fenoles, ácidos fenólicos, y lactonas con una gama de antifúngico, antimicrobiano, y actividades antitumorales (Xu et al. 2010).

**Objetivo general:**

Inducir mediante la adición de elicitores al medio de cultivo y el control de factores físicos (pH y temperatura) un cambio en la producción la biomasa y metabolitos secundarios.

**Objetivos específicos:**

- Determinar el pH óptimo del medio donde el hongo logra un cambio en la biomasa y producción de metabolitos secundarios bioactivos inducido por elicitores.
- Determinar el valor de temperatura más adecuado donde el hongo lograra un cambio en la biomasa y producción de metabolitos bioactivos en el medio de cultivo inducido por elicitores.
- Establecer las diferencias entre la actividad antibacteriana presentada en el cultivo original del hongo y los cultivos sometidos a los tratamientos de optimización.

## **HIPÓTESIS**

**Hipótesis i:** Mediante inserción de elicitores; y control de variaciones de pH y temperatura se puede inducir un incremento en la producción de metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos.

**Hipótesis o:** Mediante inserción de elicitores; y control de variaciones de pH y temperatura no se puede inducir un incremento en la producción de metabolitos secundarios aislados de hongos endófitos.

## **METODOLOGÍA**

### **A. Selección de las cepas**

Las cepas fúngicas utilizadas en esta investigación fueron seleccionadas con base a los siguientes criterios:

1. Valores de actividad obtenidos previamente en bioensayos contra parásitos causantes de enfermedades tropicales como Leishmania, Chagas, Malaria y bacterias de importancia médica
2. La diversidad química producida al agregar al medio de cultivo elicitores.

Los hongos utilizados para esta investigación fueron:

- *Cladosporium* sp. (Hd 18)
- *Lentinus strigellus* (LC 46)
- *Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

### **B. Medios de cultivos seleccionados para cada cepa:**

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron seleccionados en pre-ensayos donde estas cepas presentaron mayor actividad y la mayor producción de biomasa. En la Tabla 1. Se lista cada cepa con su respectivo medio

**Tabla 1.** Medios de cultivo para cada cepa.

Hongo	Medio
• <i>Cladosporium</i> sp. (Hd 18)	MEA
• <i>Lentinus strigellus</i> (LC 46)	SDA
• <i>Pestalotiopsis microspore</i> (Hd 08)	MEA

**C. Inductores seleccionados:**

Experimentos previos demostraron que los extractos elaborados a partir de las cepas cultivadas en presencia de los elicitores químicos mostraron una variedad de metabolitos. La Tabla 2. muestra los inductores seleccionados.

**Tabla 2.** Inductores utilizados en el proceso de elicitación.

Inductor	Concentración g/L
CuSO <sub>4</sub>	0.06
CaCl <sub>2</sub>	0.54
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Glu.	0.90

## **I. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS SECUNDARIOS**

### **A. Preparación de soluciones amortiguadoras:**

Se prepararon diluciones amortiguadoras para estabilizar el pH; para MEA (4.0, 4.6 y 5.6) y Sabouroud (4.6, 5.6, y 6.6) para ésto se utilizó sal de Citrato de Na/50 mmol L<sup>-1</sup> como regulador de acidez para los pH (4.0, 4.6, 5.6) en medio MEA y MOPS 3- (N-morfolino) propanosulfónico, un tampón introducido por (Good et al., 1960), el cual se utilizó para el pH de 6.6 en el medio Sabouroud.

### **B. Preparación del medio de cultivo:**

Una vez preparados los tampones fueron utilizados para preparar los medios de los cuales una vez esterilizados a 121 °C y 15 PSI/30 min y dejado enfriar a 45 °C se le agregaron los elicitores. Después fueron servidos en platos petri esteriles de 145 mm; 6 para cada hongo en sus pH respectivos; posteriormente fueron inoculados con las cepas de interés mediante el método de saturación en el cual utilizando una espátula estéril se raspo cuidadosamente el micelio y se añade en agua estéril y se procedió a verter el inóculo sobre el medio de cultivo, se selló cada placa petri con papel parafinado para evitar contaminación y se incubaron durante 15 días a 26 °C, con iluminación permanente utilizando una cámara de crecimiento para este fin (Shell Lab. 15). Se realizaron observaciones diarias para descartar contaminantes. (Ver tabla 3.)

<b>Tabla 3.</b> Condiciones seleccionadas con base a la actividad inhibitoria para el cultivo de cada cepa a distintos pH.						
Cepa	Medio	Inductor	pH 4,0	pH 4,6	pH 5,6	pH C
Hd 18	MEA	CuSO <sub>4</sub>	6	6	6	6
		FeSO <sub>4</sub>	6	6	6	6
		CaCl <sub>2</sub>	6	6	6	6
Hd 08	MEA	CuSO <sub>4</sub>	6	6	6	6
		CaCl <sub>2</sub>	6	6	6	6
			4,6	5,6	6,6	C
LC 46	SDA	CaCl <sub>2</sub>	6	6	6	6
	MEA	Glu.	6	6	6	6
Se muestra la cepa fúngica (Hd 08, LC 46, Hd 18); el medio de cultivo (MEA, SDA); los inductores (CuSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> y Glu.); pH (4.0, 4.6, 5.6 y 6.6)						

## **II. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y METABOLITOS SECUNDARIOS.**

Los medios descritos en I y II fueron inoculados con los hongos que en el tratamiento de pH mostraron mayor actividad antibacteriana y mayor diversidad química, e incubados a 24 °C, temperatura ambiental y 28 °C. La tabla 4. muestra las condiciones seleccionadas para el cultivo de cada cepa.

<b>Tabla 4.</b> Condiciones seleccionadas con base a la actividad inhibitoria para el cultivo de cada cepa e incubadas a 24 °C, TA y 28 °C.			
Cepa	Medio	Inductor	pH
Hd 18	MEA	CuSO <sub>4</sub>	4.0 T
		CaCl <sub>2</sub>	5.6 T
LC 46	SDA	CaCl <sub>2</sub>	6.6 T
	MEA	Glu.	4.0 T
Hd 08	MEA	CuSO <sub>4</sub>	4.0 T
		CaCl <sub>2</sub>	4.0 T
Se muestra la cepa fúngica (Hd 08, LC 46, Hd 18); el medio de cultivo (MEA, SDA); los inductores (CuSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> y Ac. Glu.); pH (4.0, 5.6 y 6.6) T= Tamponados.			

### **III. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS A PARTIR DE LOS CULTIVOS REALIZADOS CON LAS CEPAS SELECCIONADAS**

Una vez cumplido el período de incubación se procedió a colocar el micelio del hongo utilizando una espátula para cortar en cuadros de 5 cm el agar con micelio, se colocó el material en un vaso químico de 1000 mL utilizando una espátula para este fin y se agregó acetato de etilo hasta cubrir el volumen del medio, pasado unos 30 minutos se trituro cada muestra con ayuda de un polytron (pt 3100) para homogenizar las partes, luego en un sistema de filtrado al vacío se colocó la muestra sobre papel filtro wthaman N° 7; luego se coloca en un embudo, para obtener la fase acuosa orgánica ( fase de interés) la cual procedimos a colocar en un balón de 500 ml y concentrar en un sistema de baja presión con ayuda de un rota-vapor (Büchi), a 30 °C con baño maría incorporado, obteniendo así el extracto en acetato de etilo de cada una de las especies en estudio (Christophersen et al., 1999). Una vez seco el extracto, utilizando acetona para disolver la muestra, se colocó en

viales de centelleo previamente rotulados y pesados donde se registró el peso de cada vial, y luego se procedió a secar las muestras; para asegurarnos de tener un extracto libre de agua, se colocaron en un Speed vac de secado al vacío durante 24 h, una vez seco el extracto se registró la biomasa de los mismos.

#### **IV. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR (MÉTODO KIRBY BAUER)**

El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standards) fue originalmente descrito por de Kirby-Bauer (Jorgensen et al., 2007). Al mismo se le han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

Para la evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de extractos naturales (Fúngicos) se utilizó el método de difusión en agar por discos (Calvo y Asencio et al., 1999).

##### **A. Preparación del estándar de turbidez:**

Para el estándar de turbidez se agregó 0,5 mL de una solución de  $\text{BaCl}_2$  0.048 M ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1.175 % p/v) a 99,5 mL de una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.18M (0.36 N) es decir 1% v/v en constante movimiento para mantener la suspensión luego se verifico la densidad correcta del standard utilizando un espectrofotómetro cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mcfarland finalmente se almaceno en oscuridad a temperatura ambiental 22 °C - 26 °C.

##### **B. Inoculación de las placas Petri:**

De un cultivo en placa incubado a 24 horas se seleccionaron entre cuatro y cinco colonias aisladas de la cepa con ayuda de un asa y se transfirió a un tubo que contiene solución salina luego se procede a comparar visualmente con el tubo solución Mcfarland, preparado previamente, utilizando un

contra fondo negro como contraste; esta suspensión contiene aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  (UFC/mL).

Cada placa Petri de 45 mm con agar ATS es inoculada con 100  $\mu$ L de la dilución bacteriana y con ayuda de un esparcidor estéril se distribuye homogéneamente la muestra sobre el medio.

Se dejó secar el inóculo a temperatura ambiente dentro de la cámara de seguridad durante 15 min posteriormente se colocaron los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar el contacto directo con la superficie del agar; cada disco se distribuye uniformemente de modo que estén a una distancia mínima de 25 ( el diámetro de los discos según la organización mundial de la salud OMS debe ser de 6 mm, no se deben colocar más de 12 discos por placa de 150 mm para evitar la superposición de las zonas de inhibición, una vez se colocaron todos los discos se procedió a colocar 15  $\mu$ L del extracto para cada disco cada placa se hizo por duplicado para obtener resultados reproducibles en las mismas condiciones se incubaron las placas en forma invertida a 37 °C después de 24 horas de incubación se examinó cada placa y se midieron los diámetros de inhibición que se observaron alrededor de cada disco en cada plato y de la réplica para obtener el valor de inhibición que se expresa aplicando la siguiente fórmula:

**Valor de inhibición= Diámetro de inhibición en mm – Diámetro del disco (6 mm)**

Para los análisis “in vitro” de la actividad inhibitoria para cada extracto se utilizaron las siguientes cepas tipo de importancia hospitalaria. (Tabla 5.)

**Tabla 5.** Cepas bacterianas tipo de importancia médica.

Cepa bacteriana	Gram
<i>Stapylococcus aureus</i>	Cocos +
<i>Echericcia coli</i>	Bacilos -
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilos +
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos -
<i>Enterococcus fecalis</i>	Cocos -
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilos -
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilos +
<i>Pasturella multocida</i>	Bacilos +
<i>Salmonella thiphyenterica</i>	Bacilos -
<i>Salmonella entérica</i>	Bacilos -
<i>Shiguella fuxneri</i>	Bacilos -
<i>Proteus vulgaris</i>	Bacilos -
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos -
<i>Klebsiella penumoniae ozoenae</i>	Bacilos -
<i>Listeria ivanovii</i>	Bacilos +
<i>Legionella pneumophylla</i>	Bacilos -
<i>Bordetella bronchyseptica</i>	Bacilos -
<i>Micrococcus luteus</i>	Cocos +
<i>Streptococcus oralis</i>	Cocos +
<i>Enterococcus cloacae</i>	Cocos -

En esta tabla se muestran 20 cepas bacterianas su morfología y tipo de tinción Gram.

## V. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD QUÍMICA MEDIANTE

### CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)

Utilizando láminas cromatográfica de sílice de aluminio, se demostró de manera cualitativa la probable presencia de algunos compuestos obtenidos a partir de los tratamientos de pH y temperatura analizando los extractos para cada cepa.

<b>Tabla 6.</b> Extractos de cada cepa fúngica a partir de los cuales se realizaron las CCD.			
Cepa	Extracto Elicitor	Extracto pH	Extracto temperatura
Hd 18	MJ-144-8E	MAP-15-9	MJ18-165-5
LC 46	MJ-146-9D	MAP-15-23	MJ46-167-5
Hd 08	MJ-142-8E	MAP-15-29	MJ08-166-3
			MJ08-166-5

De cada uno de los extractos se prepararon disoluciones con  $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$  a una concentración de 0.02 mg/mL y se procedió a colocar en la placa cromatográfica con ayuda de un capilar picando 7 veces cada muestra, luego para el sistema eluyente se utilizó una solución 7:3  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$  luego observando con luz ultravioleta a longitudes de ondas de 254 nm y 366 nm y se analizó posteriormente con ayuda de P-anisaldehído utilizado como revelador universal para productos naturales por último se procedió a observar los cromatogramas para cada cepa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. determinación del efecto del pH sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios.

Se obtuvieron un total de 28 extractos elaborados a partir de los tratamientos de incubación a distintos pH en el medio de cultivo.

A continuación se describen los resultados basados en el rendimiento de biomasa para cada tratamiento.

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

En cuanto al tratamiento de pH para este hongo se registró que a pH de 4.0 T se obtuvo la mayor masa producida con un peso de 260 mg en MEA + CuSO<sub>4</sub> comparado con el control en la condición MEA + CuSO<sub>4</sub> a pH 4.6 °C el cual registra una masa de 89.5 mg; seguido de las condiciones MEA + FeSO<sub>4</sub> a pH 4.0T y MEA + FeSO<sub>4</sub> a pH 4.6 T con pesos de 212.8 mg y 128 mg respectivamente donde podemos observar que el pH entre 4.0 y 4.6 favorece la producción de biomasa del extracto para este hongo, en cambio los pesos más bajos registrados se observaron a pH de 5,6 (Ver tabla 7.) (Gráfico 1.) A estos valores registrados en biomasa se le aplicó la prueba estadística Wilcoxon-Kruskal wallis para analizar la influencia que tienen los elicitores en el comportamiento de la biomasa, el cual estadísticamente, no es significativo ( $p = 0.1264 > 0.05$ ) lo que quiere decir que el hongo posee el mismo comportamiento frente a los tres elicitores; sin embargo existen diferencias en el tratamiento de pH ( $p = 0.0001 < 0.05$ ) donde efectivamente la masa de los extractos presentan una disminución respecto al tratamiento donde solo se utiliza el medio + elicitor, dada por el valor en la Razón  $t = -11.574$  del análisis estadístico aplicado. (Gráfico 2.)

*Lentinus strigellus* (LC 46):

Para esta cepa el mayor peso registrado fue 642 mg a un pH de 4.6 T en SDA + CaCl<sub>2</sub> seguido de MEA + Glu. a pH 4.6 T con masa de y 320.9 mg estos pesos comparados con sus respectivos controles SDA + CaCl<sub>2</sub> + 5.6 °C con 175.5 mg y MEA + Glu. + 4.6 °C con 94.7 mg mostraron un incremento en la biomasa de los extractos en estas condiciones. Los pesos más bajos se registraron a rangos de pH entre 5,6 y 6,6 y pH 4,0 (Ver tabla 8.) (Gráfico 3.). Estos resultados se analizaron mediante el análisis estadístico Wilcoxon/Kruskal Wallis el cual demuestra que existe diferencia significativa entre los elicitores utilizados para este hongo dado por el valor de la probabilidad ( $p = 0.014 < 0.05$ ) en este caso el Glu. es el más influyente en la producción de biomasa de los extractos elaborados para este hongo. También se demostró que existe diferencia significativa en cuanto al comportamiento de la biomasa del extracto al aplicarle el tratamiento de pH tamponados dado por el valor estadístico ( $p = 0.039 < 0.05$ ) y el valor del estadístico  $S = -15.000$  que comprueba que hubo una disminución (Gráfico 4.)

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

Esta cepa registro su peso más alto, 264 mg a un pH de 4.0 T en MEA + CuSO<sub>4</sub> el cual comparado con el control MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.6 de masa 133.7 mg representa un aumento en la biomasa del extracto seco seguido de MEA + CuSO<sub>4</sub> pH 5,6 y 4,6 T con pesos de 67.8 y 52.9 mg respectivamente. El elicitore CuSO<sub>4</sub> a distintos pH parece incrementar la biomasa en cambio el CaCl<sub>2</sub> en todos los pH disminuye la producción. (Ver tabla 9.) (Gráfico 5) Los datos reportados por esta cepa fueron analizados mediante la prueba no paramétrica Wilcoxon Kruskal-Wallis para demostrar la influencia de los elicitores CaCl<sub>2</sub> y CuSO<sub>4</sub> aplicados en los tratamientos (Gráfico 6) pero los mismos no muestran diferencia significativa esto es demostrado por el valor ( $p = 0.393 > 0.05$ ) es decir que a biomasa tiene el mismo comportamiento frente a los dos elicitores; sin

embargo nuevamente se muestra una diferencia significativa al comparar las biomásas obtenidas a partir del tratamiento de pH dado por el valor ( $p = 0.021 < 0.05$ ) y la disminución de la biomasa dada por el valor de la Razon  $t = -2.962$  (Gráfico 21.).

Según (Lilly y Barnett, et al. 1951). El pH del medio determina la velocidad y la cantidad de crecimiento de la biomasa del hongo por otro lado Jackson et al. 1991) reporta que *Trichoderma* puede crecer en pH entre 2-6 con un óptimo a 4.0 (Seyis et al. 2005) observaron que la producción de biomasa óptima de tres cepas fúngicas aisladas son producidas en intervalos de pH entre 4,0 y 6,8 esto hace referencia a los resultados obtenidos en donde podemos observar que los mayores valores se observaron a pH de entre 4.0 y 4.6 para los tres hongos.

### **B. Actividad inhibitoria influenciada por el tratamiento de pH.**

Se obtuvieron los siguientes resultados para cada cepa basados en el análisis del ensayo por disco difusión Kirby – Bawer.

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

De los extractos elaborados a partir de este hongo solo presentaron actividad inhibitoria el extracto MAP15-9 elaborado a partir de cultivos en MEA +  $\text{CuSO}_4$  + pH 4,0 T el cual presento actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. thyphy* y *S. enterica* y el extracto MAP15-3 elaborado a partir de MEA +  $\text{CaCl}_2$  + pH 5.6 T activo contra *S.aureus*, *B.cereus*, *L. monocytogenes* y *K. ozoenae*. (Gráfico 7.).

*Lentinus strigellus* (LC 46):

Los extractos elaborados a partir de este hongo que presentaron actividad fueron el MAP15-17 en MEA + Glu. + pH 4.0 T activo contra *K. pnuemoniae* y MAP15-23 en SDA +  $\text{CaCl}_2$  + pH 6.6 T activo contra *S. aureus* y *B. cereus*. (Gráfico 8.).

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

A partir de este hongo presentaron actividad los extractos MAP15-26 en MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 4.6 T contra *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* y *E. Cloacae* y MAP15-29 en MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T contra *P. aeruginosa* y *M. luteus*. (Gráfico 9.).

(Thongwai y Kunopakarn et al., 2007) señalaron que la mayor parte de los microorganismos tienen la capacidad de síntesis de compuestos antimicrobianos que van a pH 5,5 - 8,5. Esto apoya los resultados descritos anteriormente ya que los pH utilizados se encuentran en este rango y se puede suponer que este desencadena probablemente el aumento de la concentración del metabolito en cuestión o una familia de diversos metabolitos que permite que en el caso del hongo Hd 18 muestre actividad contra un número mayor de distintas cepas bacterianas en comparación con los otros dos hongos analizados.

### **C. Influencia de la temperatura en la biomasa y diversidad metabólica producida por cada hongo.**

Se obtuvieron un total de 18 extractos, 6 para cada hongo de acuerdo a las 3 temperaturas de incubación utilizadas (24 °C, 28 °C y temperatura ambiente).

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

El mayor rendimiento en cuanto a biomasa se registró para los extractos MJ18-165-5 con 1194 mg, MJ18-165-3 con 1012 mg MJ18-165-4 con 306 mg, elaborados de los cultivos realizados a partir de MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 + 24 °C, MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 + 28 °C, MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 5.6 + 28 °C respectivamente; (Ver tabla 10.) (Gráfico 10.).

Se analizaron los datos con una T pareada para este hongo en donde la interacción de los tratamientos explica el cambio de la biomasa solo al 49% dado por el valor ( $p = 0.285 > 0.05$ ) lo cual no es significativo. (Gráfico 11.)

*Lentinus strigellus* (LC 46):

La producción más alta de biomasa se registró en el extracto MJ46-167-5 en la condición SDA + CaCl<sub>2</sub> + pH 6.6 T a 24 °C con una masa de 1311 mg en cambio si aumentamos la temperatura a 28 °C se observa una disminución de la misma en estas condiciones; mientras que a temperatura ambiente se registraron los valores más bajos de producción para este hongo. (Ver Tabla 11.) (Gráfico 12.)

Para estos datos se realizó una T pareada en donde la interacción se puede explicar solo al 41% dado por el valor ( $p = 0.372 > 0.05$ ) lo cual no es significativo. Esto quiere decir que no existe interacción entre los tratamientos en el cambio de la biomasa. (Gráfico 13.)

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

Por otro lado pudimos observar que este hongo mostro los valores más bajos de producción de biomasa; su mayor peso registrado fue 520 mg en MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 4.0 + TA seguido de MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 + TA con una biomasa de 448 y el menor peso fue 44mg en MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 4.0 T + 28 °C (Tabla 12.) (Gráfico 14.). En este caso la prueba estadística T pareada nos muestra un valor de 1.0 es decir, el 100% el cual es un aumento que se ve influenciado por la interacción del elicitor CaCl<sub>2</sub> dado por el valor  $p = 0.0001 < 0.05$  el cual es significativo. (Gráfico 15.)

En este estudio los hongos LC 46 y Hd 18 mostraron un incremento en la biomasa del extracto a 24 °C (Jain y Pundir et al. 2011). Reportan que el crecimiento más alto en algunas cepas se logra a una temperatura de 24 °C lo cual nos permite estar en conformidad con estos resultados.

**D. Actividad inhibitoria de cada extracto elaborado a partir de cultivos a condiciones previamente seleccionadas incubados a distintas temperaturas.**

Se analizó la actividad de cada extracto mediante la prueba de disco difusión Kiyryby – Bawer detallados a continuación.

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

Estos resultados muestran que el extracto MJ18-165-4 elaborado a partir de MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 5,6 + 28 °C presento un aumento en la actividad contra *S. aureus* 3.0 mm (inhibición previa al tratamiento de temperatura de incubación) a 7.0 mm, el extracto MJ18-165-5 MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T presento actividad contra *E.fecalis*, *P. vulgaris* y *E. cloacae* para las cuales a 26 °C (Temperatura control) no presentaba actividad contra estas cepas y el extracto MJ18-165-6 presento actividad contra *E. cloacae* elaborado a partir de MEA + CaCl<sub>2</sub> + pH 5,6 + 24 °C el cual previamente a estas condiciones no registraba actividad para esta cepa. (Gráfico 16.)

*Lentinus strigellus* (LC 46):

MJ46-167-2, MJ46-167-4, elaborados a partir de MEA + Glu. + pH 4.0 + TA y MEA + Glu. + pH 4.0 + 28 °C respetivamente presentaron un aumento en el número de cepas inhibidas el primero contra *B. cereus S. typhy*, *S. entérica* y el segundo contra *E. coli*, *S. cereus. S. typhy* y *S. entérica* por otro lado el extracto MJ46-167-6 elaborado a partir de MEA + Glu. + pH 4.0 + 24 °C registro actividad contra *B. cereus* y *M. luteus* esta última no registrada antes. (Gráfico 17.)

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

Los extractos elaborados a partir de esta cepa incubada a 26 °C solo presentaban actividad contra dos bacterias. Mediante el tratamiento de temperaturas de incubación se pudo registrar que el extracto MJ08-166-3 elaborado a partir de MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 + 28 °C presento actividad

inhibitoria contra *E. fecalis*, *P. vulgaris* y *S. oralis* para las cuales anteriormente no presentaba inhibición.

Por otro lado el extracto MJ08-166-5 presento actividad contra 11 cepas distintas (Ver tabla 15.) el cual en un principio solo registraba inhibiciones para *M. luteus* la cual desapareció (Gráfico 18.). Por último el extracto MJ-166-2 registro actividad contra *B. cereus* dicha actividad no se reportaba antes.

La producción más alta de compuesto antimicrobiano se obtuvo a 28 °C según (Bhattacharyya y Jha, et al. 2011). El aumento de la temperatura de incubación desde 25 °C a 30 °C mejoró la producción de metabolito bioactivo en la cepa *Aspergillus* esto apoya el resultado presentado en cuanto al aumento de la actividad inhibitoria basado en el número de bacterias como es el caso del extracto MJ08-166-5 del hongo Hd 08 y aumento en el halo de inhibición en el caso del hongo Hd 18 con el extracto MJ18-165-5.

## **DIVERSIDAD QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS ELABORADOS A PARTIR DE LAS CEPAS CULTIVADAS.**

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

Extracto 1 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub>): muestra 3 compuestos A, B, C a bajas concentraciones de polaridad alta, mediana y baja respectivamente.

Extracto 2 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T): muestra 2 compuestos B, C los cuales se mantienen aún después de aplicar el tratamiento de pH 4.0 en las condiciones de cultivo; el Compuesto A en este extracto no se ve reflejado.

Extracto 3 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 24 °C): muestra solo el compuesto B el cual permanece en el extracto elaborado a partir del tratamiento de incubación a 24 °C. (Fig. 4).

*Lentinus strigellus* (LC 46):

Extracto 1 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub>): muestra 3 compuestos a bajas concentraciones el B de polaridad alta y el E y F de polaridad baja.

Extracto 2 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub> + pH 6.6 T): muestra una variedad de compuestos A y B de alta polaridad, C y D de polaridad media y E, F de baja polaridad; distintos del E1, en donde (B, E, F) aumentan notablemente su concentración aún después de aplicar en las condiciones de cultivo el pH 6.6.

Extracto 3 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub> + pH 6.6 T + 24 °C): muestra 3 compuestos B, D y E de polaridad alta y mediana respectivamente los cuales muestran permanecer a bajas concentraciones en el extracto elaborado a partir del tratamiento de incubación a 24 °C en las condiciones de cultivo. (Fig. 5)

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

Extracto 1 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub>): muestra 4 compuestos A, de polaridad alta; B, de polaridad media y C, D de polaridad baja.

Extracto 2 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T): permanecen los compuestos reflejados en el E1 (A, B, C, D) aún después de aplicar el tratamiento de pH 4.0 en las condiciones de cultivo.

Extracto 3 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 28 °C): muestra solo el compuesto A y B de polaridad alta y media respectivamente los cuales permanecen en el extracto elaborado a partir del tratamiento de incubación a 28 °C.

Extracto 4 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 24 °C): muestra solo el compuesto B de polaridad media el cual permanece en el extracto elaborado a partir del tratamiento de incubación a 24 °C. (Fig. 6).

## RELACIÓN DIVERSIDAD QUÍMICA - ACTIVIDAD INHIBITORIA

*Cladosporium sp.* (Hd 18):

El extracto 1 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub>) mostró actividad contra *B. bronchyseptica*, sin embargo en el extracto 2 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T) la CCD nos muestra que los compuestos B y C permanecen en el extracto y se observa mediante los ensayos de inhibición que el mismo es activo contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *S. entérica*; por lo tanto presenta un aumento en su espectro de actividad en estas condiciones; mientras que el extracto 3 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 24 °C) muestra sólo el compuesto B; al probar la actividad biológica este último fue activo contra *E. fecalis*, *E. cloacae* y *P. vulgaris* a diferencia del extracto 1 y 2. Por otra parte el mismo una disminuye su actividad en cuanto al número de bacterias. Según (Zain et al., 2009) un aumento en la biomasa llevan a un retraso en la producción del metabolito secundario. (Tabla 14)

*Lentinus strigellus* (LC 46):

El extracto 1 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub>) de esta cepa no presentaba actividad inhibitoria contra bacterias, sin embargo el extracto 2 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub> + pH 6.6 T) mostro ser activo contra *B. cereus* y *S. aureus* probablemente dada por la diversidad de compuestos que muestra este extracto a estas condiciones; el extracto 3 (Hongo + SDA + CaCl<sub>2</sub> + pH 6.6 T + 24 °C) presento una disminución en su actividad y mostro ser activo solo contra *S. typhi*. Una vez más podemos relacionar este resultado con (Zain et al., 2009) que sostiene que un aumento en la biomasa lleva a un retraso en la producción del metabolito secundario. (Tabla 14)

*Pestalotiopsis microspore* (Hd 08):

Extracto 1 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub>) el cual muestra una diversidad de compuestos presentaba actividad contra *B. bronchyseptica* y *P. multocida*. Extracto 2 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T). En el extracto 2 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T), el número de compuestos visibles en

la CCD disminuye y las actividades para estas bacterias no se reportaron sin embargo se reportan actividades contra *M. luteus* y *P. aeruginosa*; En el extracto 3 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 28 °C), se observa un aumento de la concentración del compuesto A el mismo presenta actividad contra *E. fecalis*, *P. vulgaris*. y *S. oralis* por lo tanto un aumento en su actividad en comparación con el extracto 1 y 2. En el extracto 4 (Hongo + MEA + CuSO<sub>4</sub> + pH 4.0 T + 24 °C) permanece el compuesto B el cual reporta actividad contra *S. aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *E. fecalis*, *S. typhy*, *S. enterica*, *P. vulgaris*, *K. ozoenae*, *L. pneumohila*, *S. oralis*, *E. cloacae*; por lo tanto se muestra un notable aumento en el número de bacterias inhibidas. (Tabla 15).

**CONDICIONES DE CULTIVO PARA CADA HONGO BASADO EN LOS RESULTADOS DE AUMENTO DE BIOMASA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y DIVERSIDAD QUÍMICA MEDIANTE ADICIÓN DE ELICITORES ABIÓTICOS DE TIPO QUÍMICO Y CONTROL DE DOS PARAMETROS: pH Y TEMPERATURA.**

En las tablas (13, 14, 15) se estiman las condiciones de cultivo para la elaboración de extractos, mediante la adición de elicitores y niveles de pH y temperatura para cada uno de los hongos.

Los resultados obtenidos para la cepa Hd 18 (*Cladosporium* sp.) y Hd 08 (*Pestalotiopsis micropora*) en cuanto a su aumento de biomasa, actividad inhibitoria y diversidad química basados en la influencia del elicitor CuSO<sub>4</sub> se encuentran en conformidad, ya que según (Wolfenden et al., 1982) la inducción por este tipo de compuestos fue probada en varios estudios con diferentes hongos, entre ellos *Pestalotiopsis* sp. en donde las actividades por lacasa, la cual según (Bumpus et al., 1987) tiene la capacidad de oxidar un amplio rango de compuestos orgánicos tóxicos a metabolitos no tóxicos, aumentan en presencia de este dicatión. Esta es un tema de estudio por parte de muchos investigadores debido a su importancia biotecnológica.

Se muestra para el hongo LC 46 la influencia del  $\text{CaCl}_2$  el cual según (Chardonnet et al., 2000) es requerido por los hongos en pequeñas cantidades para el crecimiento de las hifas. Este catión está envuelto en diversas funciones, tales como la síntesis de los polímeros de la pared celular de la célula fúngica, el movimiento de vesículas dentro del citoplasma y en el crecimiento del ápice hifal.

Según (Li Miao et al., 2006) algunos pH óptimos de los medios de cultivos podrían dar origen a la producción de más de un compuesto activo por el hongo, sin embargo algunos compuestos pueden ser producidos a pH 4,5 y algunos alrededor de pH 7,5 esto apoya los valores obtenidos en cuanto biomasa y actividad donde se muestran los mejores resultados en extractos elaborados a partir de medios de cultivo a pH 4.0 como se muestra en este caso para dos de los hongos analizados en esta investigación (Grafico 19.) y (Grafico 21.); (Zain et al., 2009) reporta que el pH 6.5, en el medio influye mostrando una baja actividad antibacteriana producida por el hongo como es el caso de la cepa LC 46, el cual muestra una disminución en el número de bacterias inhibidas al ser cultivado a pH 6.6.

Por otro lado Según (Suja Mathan et al. 2013) el crecimiento óptimo y la producción de metabolitos bioactivos ocurren en pH de 5,5 y a temperatura de 25 °C pero en este caso se mostraron los mayores valores en biomasa e inhibición en extractos elaborados a partir de condiciones de cultivo de pH 4.0 y a temperatura de 24 °C.

Según (Katzung 1987; Gómez et al., 2003) los compuestos de mediana a baja polaridad extraídos con acetato de etilo pueden atravesar con mayor facilidad la pared celular de las bacterias; esto puede explicar el aumento en la actividad respecto al número de bacterias inhibidas por cada extracto elaborado donde en cada uno de ellos permanecen compuestos de polaridades bajas y medianas mostrada en cada CCD.

Por lo antes descrito en general los medios de cultivos y condiciones de incubación poseen gran influencia en la producción de metabolitos; Según (Thakur *et al.*, 2009); (Miao *et al.*, 2006); (Kumara y Rawal., 2008); (Gautam *et al.*,2011); (Bhattacharyya y Jha., 2011). el rendimiento de compuestos bioactivos a veces se puede aumentar sustancialmente mediante la optimización de factores físicos (temperatura, factores de salinidad, pH y luz), químicos (componentes en medios de cultivos, precursores, inhibidores) para el crecimiento de los hongos. (Zhang *et al.*, 2010) señala que no hay consenso sobre qué medios de cultivos son los óptimos para la producción de metabolitos pero si el hecho de que el entorno natural sigue siendo el más contribuyente e importante en cuanto a la producción de nuevos fármacos en miras al desarrollo de la química combinatoria, que rápidamente genera miles de nuevos productos químicos lo cual mediante múltiples ensayos *in vitro* nos proporcionará diversos compuestos.

## CONCLUSIONES

- De los elicitores utilizados el  $\text{CuSO}_4$  y el Glu. en conjunto con el tratamiento de pH poseen una influencia directa sobre el aumento de la biomasa, producción de metabolitos y actividad antibacteriana en los hongos utilizados en esta investigación.
- Se demostró que a pH 4.0 T, poseen una influencia sobre la producción de metabolitos, aumento de biomasa de los hongos utilizados.
- Los rangos de temperaturas empleados en esta investigación no ejercen una influencia directa sobre el aumento de la biomasa, producción de metabolitos secundarios, ni aumento en la actividad antibacteriana.
- La actividad antibacteriana puede variar de acuerdo al tratamiento utilizado para cultivar la cepa fúngica.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar rangos más alejados de temperatura para determinar un mayor efecto de este factor físico en los tratamientos.
- Realizar una gamma más diversa de bioensayos (parásitos, Fito patógenos) para aprovechar los extractos obtenidos de cada tratamiento.
- Determinar la estructura, naturaleza química de las sustancias bioactivas que reducen la actividad antimicrobiana.
- Realizar la elucidación de genes involucrados en la síntesis de estos metabolitos bioactivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disk method. *Am J Clin Pathol*, Vol.44:493– 496.
- Bérdy J, 2005. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *The Journal of Antibiotics* Vol.58:1-26.
- Bhattacharyya PN, Jha DK, 2011. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *Journal of Applied Biology and Pharmaceutical technology*. Vol. 2(4):133-145.
- Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigiano, R.N., Conway, W.S, 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Postharvest Pathogens and Mycotoxins*, Vol 90(7): 769-774.
- Chin Y-W, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD, 2006. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal* Vol. 8: E239-E253.
- Carroll GC, 1988. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*. 69:2-9.
- De Bary A, 1866. . *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Engelann, Leipzig, Alemania.
- Dong H.D, Zhong JJ, 2002. Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation sucrose feeding and ethylene incorporation. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 31(1): 116-121.
- Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Awasthi MK, Sarsaiya S, 2011. Isolation, identification and cultural optimization of indigenous fungal isolate as a potential bioconversion agent of municipal solid waste. *Ann. Environ. Sci.* Vol. 5: 23-34.

- Grabley S, Sattler I, 2003. Natural products for lead identification: Nature is a valuable resource for providing tools. In Modern methods of drug discovery. Birkhauser Verlag, Switzerland, 87-107.
- H.J. Cuddy, 1969. Annals of the Missouri Botanical Garden. vol. 56: 90
- Hawksworth DL, 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections, Studies in Mycology, Vol. 50: 9-18
- Jorgensen, JH, y JD Turnidge, 2007. Métodos de prueba de susceptibilidad: los métodos de dilución y de difusión por disco. Manual de microbiología clínica. 1152-1172.
- Kumara KLW, Rawal RD, 2008. Effect of different pH values on growth and sporulation of *Estye vermicola*. Trop. Agric. Res. Exten. Vol. 11: 7-12.
- Lee JC, Strobel GA, Lobkovsky E, Clardy JC (1996) Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. J Org Chem 61:3232–3233
- Lévillé Jh, 1846. Considérations mycologiques suivies d'une nouvelle classification des champignons. Paris.
- Li JY, Strobel GA, 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycetocyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. Phytochemistry 57:261–265
- Lilly VG, Barnett HL, 1951. Physiology of Fungi. McGraw Hill Book Company Inc., New York, 464p.
- Maccheroni JW, Mai G, Martinez NM, Rossi A, 1997. The sequence of pal F, and environmental pH response gene. Vol.194: 163-167,


- L.S. Medeiros, 2012. Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus found in Guava fruit. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 23 (8):1551–1557.
- Miao L, Kwong TFN, Qian PY, 2006. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 72: 1063-1073.
- Padmavathi T, Nandy V, Agarwal P, 2012. Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*. *Euro. J. Exp. Bio.* Vol. 2 (4):1161-1170.
- Ripa FA, Nikkon F, Zaman S, Khondkar P, 2009. Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. *Mycobiol.* Vol. 37(3): 211-214.
- Strobel GA, 2002. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 67: 491-50.
- Tejesvi MV, Kini KR, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS, 2007a. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* (2011) 50:167–187, *Fungal Divers* 24:37–54-186
- Thakur D, Bora TC, Bordoloi GN, Mazumdar SJ, 2009. Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Pseudonocardia* sp. VUK-10. *Med. Mycol.* Vol. 19: 161-167.
- Thanh N, Murthy H, Yu K, Hahn E, Paek KY, 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. *Applied Microbial and Biotechnology.* Vol. 67(2): 197-201.

- Thongwai N, Kunopakarn J, 2007. Growth Inhibition of *Ralstonia solanacearum* PT1J by Antagonistic Bacteria Isolated from Soils in the Northern Part of Thailand, *J. Sci.* Vol. 34: 345-354.
- Vasconsuelo A, Boland R, 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites. *Plant Science.* Vol. 172(5):861-875.
- Wolfenden, R.S. and Wilson, D.L., 1982. "Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction," *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, vol.II, pp.805-812.
- Xu J, Ebada SS, Proksch P, 2010. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Divers* Vol. 44(1):15–31
- Yu KW, Murthy HN, Jeong CS, Hahn EJ, Paek KY, 2005. Organic germanium stimulates the growth of ginseng adventitious roots and ginsenoside production. *Process Biochemistry.* Vol. 40(9): 2959-2961.
- Zain ME, Razak AA, El-Sheikh HH, Soliman HG, Khalil AM, 2010. Full Length Research Paper Influence of growth medium on diagnostic characters of *aspergillus* and *penicillium* species. *Res. Microbiol.* Vol. 3(5): 280-286.
- Zhang J, Li YT, Yong JL, Li MC, Yan JM, Li SZ, Fang W, Zhi GS, Yong CL, Kenneth KW, Li WF, 2010. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *Mar. Drugs.* Vol.8: 1469-1481.
- Thanh N, Murthy H, Yu K, Hahn E, Paek KY, 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. *Applied Microbial and Biotechnology.* Vol. 67(2): 197-201.

# **ANEXOS**


**Tabla 7.** Masa de los extractos elaborados a partir del tratamiento de pH para el hongo Hd 18.

Condiciones de cultivo	Masa mg	Código del extracto
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.0	157.0	MAP-15-1
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.6	127.1	MAP-15-2
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 5.6	32.7	MAP-15-3
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.6 C	64.8	MAP-15-4
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.0	260	MAP-15-9
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.6	73.4	MAP-15-10
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 5.6	50.4	MAP-15-11
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.6 C	89.5	MAP-15-12
MEA + FeSO <sub>4</sub> + 4.0	212.8	MAP-15-13
MEA + FeSO <sub>4</sub> + 4.6	128.5	MAP-15-14
MEA + FeSO <sub>4</sub> + 5.6	80.4	MAP-15-15
MEA + FeSO <sub>4</sub> + 4.6 C	115.9	MAP-15-16

Condiciones seleccionadas para el tratamiento a distintas pH de incubación   
Medio + Elicitor + pH; Código de la muestra, C= control


**Tabla 8.** Pesos de extractos elaborados a partir del cultivo del hongo LC 46.

Condiciones de cultivo	Masa mg	Código del extracto
MEA + Glu. + 4.0	74.2	MAP-15-17
MEA + Glu. + 4.6	320.9	MAP-15-18
MEA + Glu. + 5.6	16.6	MAP-15-19
MEA + Glu. + 4.6 C	94.7	MAP-15-20
SDA + CaCl <sub>2</sub> + 4.6	642.3	MAP-15-21
SDA + CaCl <sub>2</sub> + 5.6	59.7	MAP-15-22
SDA + CaCl <sub>2</sub> + 6.6	74.4	MAP-15-23
SDA + CaCl <sub>2</sub> + 5.6 C	175.5	MAP-15-24

Condiciones seleccionadas para el tratamiento a distintas pH de incubación.   
Medio + Elicitor + pH; Código de la muestra, C= control.

**Tabla 9.** Pesos de extractos elaborados a partir del cultivo del hongo Hd 08.

Condiciones de cultivo	Masa mg	Código del extracto
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.0	15.3966	MAP-15-25
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.6	15.2028	MAP-15-26
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 5.6	15.0157	MAP-15-27
MEA + CaCl <sub>2</sub> + 4.6 C	15.0416	MAP-15-28
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.0	264.3	MAP-15-29
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.6	52.9	MAP-15-30
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 5.6	67.8	MAP-15-31
MEA + CuSO <sub>4</sub> + 4.6 C	133.7	MAP-15-32

Condiciones seleccionadas para el tratamiento a distintas pH de incubación  
Medio + elicitor + pH; Código del extracto, C= control. 

**Tabla 10.** Bioensayo basado en la actividad antibacteriana de los extractos producidos a partir de cultivos de distinta composición química debido a la presencia de inductores y sometidos a distintos niveles de pH contra cepas bacterianas de importancia hospitalaria.

Condición de Cultivo	Código de extracto	S.aureus #1	E.coli#2	B.cereus #3	P.aeruginosa #4	L.monocytogenes #7	S.thyph#9	S.enterica #10	K.pneumoniae #13	F.oozenae #14	B.branchyseptica #17	M.livetus #18	S.oralis #19	E.Cloacae #20
HD18 MEA CaCl2 4.0T	MAP-15-1	1		1		2.5				1.5				
HD18 MEA CaCl2 4.6T	MAP-15-2	2		2										
HD18 MEA CaCl2 5.6T	MAP-15-3	3		2.5		4				3				
HD18 MEA CaCl2 4.6C	MAP-15-4			2	1.5									
HD18 MEA CuSO4 4.0T	MAP-15-9		1.25		3.25		1.5	2.5						
HD18 MEA CuSO4 4.6T	MAP-15-10													
HD18 MEA CuSO4 4.6C	MAP-15-12													
HD18 MEA FeSO4 4.0T	MAP-15-13							3						
HD18 MEA FeSO4 4.6T	MAP-15-14							1		3				
HD18 MEA FeSO4 5.6T	MAP-15-15			3.5	3.5	1				2.5	1.5			
HD18 MEA FeSO4 4.6C	MAP-15-16													
LC46 MEA Ac. GLUT 4.0T	MAP-15-17									2.5				
LC46 MEA Ac. Glut 4.6T	MAP-15-18			1						2.5				
LC46 MEA Ac. Glut 5.6T	MAP-15-19	2												
LC46 MEA Ac. GLUT 4.6C	MAP-15-20													
LC46 SAB CaCl2 4.6T	MAP-15-21													
LC46 SAB CaCl2 5.6T	MAP-15-22			2.5										
LC46 SAB CaCl2 6.6T	MAP-15-23	2		3										
LC46 SAB CaCl2 5.6C	MAP-15-24	1.5	4.25 IP											
HD08 MEA CaCl2 4.0T	MAP-15-25	1.5				1.5		1		1.5		2.75		2.5
HD08 MEA CaCl2 4.6T	MAP-15-26				1.75	2								2
HD08 MEA CaCl2 5.6T	MAP-15-27					1.5								
HD08 MEA CaCl2 4.6C	MAP-15-28						2.5	0.5						
HD08 MEA CuSO4 4.0T	MAP-15-29				6.75 IP							2		
HD08 MEA CuSO4 4.6T	MAP-15-30													
HD08 MEA CuSO4 5.6T	MAP-15-31													
HD08 MEA CuSO4 4.6C	MAP-15-32					1.5							1.5	2.5

Condiciones de cultivos. Código de extractos por hongo. Bacterias: *Staphylococcus aureus*(1), *Echericcia coli*(2), *Bacillus cereus*(3), *Pseudomonas aeruginosa*(4), *Enterococcus fecalis*(5), *Proteus mirabilis*(6), *Listeria monocytogenes*(7), *Pasturella multocida*(8), *Salmonella thiphyenterica*(9), *Salmonella enterica*(10), *Shiguelia fuxneri*(11), *Proteus vulgaris*(12), *Klebsiella pneumoniae*(13), *Klebsiella penumoniae ozonae*(14), *Listeria ivanovii*(15), *Legionella pneumophylla*(16), *Bordetella bronchiseptica*(17), *Micrococcus luteus*(18), *Streptococcus oralis*(19), *Enterococcus cloacae*(20).

**Tabla 11.** Peso de extractos elaborados a partir del hongo Hd 18 cultivados en medios de distinta composición química mediante elicitores a distintos pH y a tres valores distintos de temperatura.

Condiciones de cultivo T °C	Código	Masa (mg) del extracto
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0+ T1	MJ18-165-1	249
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6+T1	MJ18-165-2	148
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0+ T2	MJ18-165-3	1012
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6 + T2	MJ18-165-4	306
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0+T3	MJ18-165-5	1194
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6 +T3	MJ18-165-6	183

Condición; Medio + elicitore + pH +T  
T1:TA= Temperatura ambiente, T2: 28 °C, T3: 24 °C

**Tabla 12.** Peso de extractos elaborados a partir del hongo LC 46 cultivados en medios de distinta composición química mediante elicitores a distintos pH y a tres valores diferentes de temperatura.

Condiciones de cultivo T °C	Código	Masa (mg) del extracto
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + T1	MJ46-167-1	116
MEA + Glu.+ pH: 4.0 + T1	MJ46-167-2	53
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + T2	MJ46-167-3	1101
MEA + Glu.+ pH: 4.0 + T2	MJ46-167-4	564
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + T3	MJ46-167-5	1311
MEA + Glu. + pH: 4.0 + T3	MJ46-167-6	42

Condición; Medio + elicitore + pH +T  
T1:TA= Temperatura ambiente, T2: 28 °C, T3: 24 °C

**Tabla 13.** Peso de extractos elaborados a partir del hongo Hd 08 cultivados en medios de distinta composición química mediante elicitores a distintos pH y a tres valores diferentes de temperatura.

Condiciones de cultivo T °C	Código	Masa (mg) del extracto
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0 + T1	MJ08-166-1	448
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4.0 + T1	MJ08-166-2	520
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0 + T2	MJ08-166-3	278
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4.0 + T2	MJ08-166-4	44
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4.0 + T3	MJ08-166-5	62
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4.0 + T3	MJ08-166-6	262

Condición; Medio + elicitores + pH + T  
T1:TA= Temperatura ambiente, T2: 28 °C, T3: 24 °C

**Tabla 14.** Bioensayo basado en la actividad antibacteriana de los extractos producidos a partir de cultivos de distinta composición debido a la presencia de inductores y sometidos a distintos niveles de pH incubados a diferentes niveles de temperatura contra cepas bacterianas de importancia hospitalaria. Se presentan solo las cepas que mostraron inhibición.

Condiciones de cultivo	CODIGO	#E	1	2	3	4	5	9	10	12	14	16	18	19	20
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + TA	MJ46-167-1	1													
MEA + Glu. + pH: 4 + TA	MJ46-167-2	2			1.5			1	1.5						
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + T: 28	MJ46-167-3	3													
MEA + Glu. + pH: 4 + T: 28	MJ46-167-4	4		2.5	1.5			4	1.5				2		
SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 6.6 + T: 24	MJ46-167-5	5						2.5							
MEA + Glu. + pH: 4 + T: 24	MJ46-167-6	6			2.5								3		
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + TA	MJ18-165-1	7													
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6 + TA	MJ18-165-2	8													
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + T: 28	MJ18-165-3	9													
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6 + T: 28	MJ18-165-4	10	7												
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + T: 24	MJ18-165-5	11					2.5			2.5					1.5
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 5.6 + T: 24	MJ18-165-6	12													1
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + TA	MJ08-166-1	13													
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4 + TA	MJ08-166-2	14			2										
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + T: 28	MJ08-166-3	15					3			4				1.5	
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4 + T: 28	MJ08-166-4	16													
MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH: 4 + T: 24	MJ08-166-5	17	7	1.5		1	3	2	2	2.5	2.5	4		2	2
MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH: 4 + T: 24	MJ08-166-6	18													

Condiciones de cultivos. Código de extractos por hongo. Bacterias: *Staphylococcus aureus* (1), *Echericcia coli* (2), *Bacillus cereus* (3), *Pseudomonas aeruginosa*(4), *Enterococcus fecalis* (5), *Proteus mirabilis*(6), *Listeria monocytogenes* (7), *Pasturella multocida* (8), *Salmonella thiphyenterica* (9), *Salmonella enterica* (10), *Shiguella fuxneri* (11), *Proteus vulgaris* (12), *Klebsiella pneumonia* (13), *Klebsiella penumoniae ozoenae* (14), *Listeria ivanovii* (15), *Legionella pneumophylla* (16), *Bordetella bronchyseptica* (17), *Micrococcus luteus* (18), *Streptococcus oralis* (19), *Enterococcus cloacae* (20).

<b>Tabla 15.</b> Condiciones de cultivo estimadas para Hd 18.						
Tratamiento	Condición de cultivo	Biomasa (mg)	Bioactividad	Gram (+,-)	Perfil cromatografico	Polaridad
Medio + elicitor	MEA + CuSO <sub>4</sub>	160.0	<i>B. bronchyseptica</i> Total: 2	(-)	A B C	Alta Media Baja
Medio + elicitor + pH	MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH 4.0	264.3	<i>E.coli,</i> <i>P.aeruginosa S.</i> <i>typhy,</i> <i>S. enterica.</i> Total: 4	(-) (-) (-)	B C	Media Baja
Medio + elicitor + pH + T °C	MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH 4.0 + 24 °C	278.0	<i>E. fecalis,</i> <i>E. cloacae,</i> <i>P. vulgaris</i> Total: 3	(-) (-) (-)	B	Media

<b>Tabla 16.</b> Condiciones de cultivo estimadas para LC 46.						
Tratamiento	Condición de cultivo	Biomasa (mg)	Bioactividad	Gram (+,-)	Perfil cromatografico	Polaridad
Medio + elicitor	MEA + CaCl <sub>2</sub>	354	Total: 0		B E F	Alta Baja Baja
Medio + elicitor + pH	MEA + CaCl <sub>2</sub> + pH 4.0	74.4	<i>B. creus,</i> <i>S. aureus.</i> Total: 2	(+) (+)	A B C D E F	Alta Alta Media Media Baja Baja
Medio + elicitor + pH + T °C	SDA + CaCl <sub>2</sub> + pH 6.6 T + 24 °C	1311	<i>S. typhy</i> Total: 1	(-)	B D E	Alta Media Baja

Tabla 17. Condiciones de cultivo estimadas para Hd 08.						
Tratamiento	Condición de cultivo	Biomasa (mg)	Bioactividad	Gram (+,-)	Perfil cromatográfico	Polaridad
Medio + elicitor	MEA + CuSO <sub>4</sub>	160.0	<i>B. bronchyseptica</i> <i>P. multocida</i>  <i>Total: 2</i>	(-) (+)	A B C D	Alta Media Baja Baja
Medio + elicitor + pH	MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH 4.0 T	264.3	<i>M. luteus</i> <i>P. aeruginosa</i>  <i>Total: 2</i>	(+) (-)	A B C D	Alta Media Baja Baja
Medio + elicitor + pH + T °C	MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH 4.0 + 28 °C	278.0	<i>E. fecalis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. oralis</i>  <i>Total: 3</i>	(-) (-) (+)	A B	Alta Media
Medio + elicitor + pH + T °C	MEA + CuSO <sub>4</sub> + pH 4.0 + 24 °C	62	<i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. fecalis</i> , <i>S. typhy</i> , <i>S. enterica</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>K. ozoenae</i> , <i>L. pneumohila</i> , <i>S. oralis</i> , <i>E. cloacae</i>  <i>Total:11</i>	(+) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (-)	B	Media

# GRÁFICOS

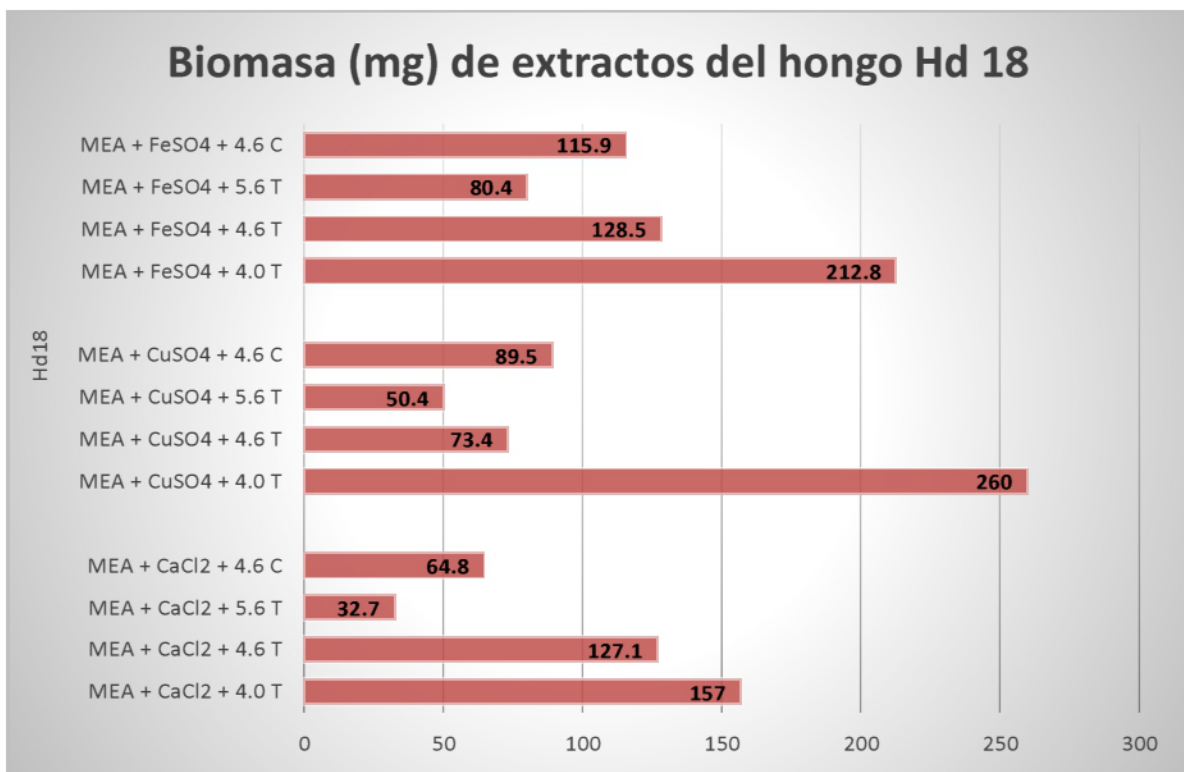


Gráfico 1. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 18 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

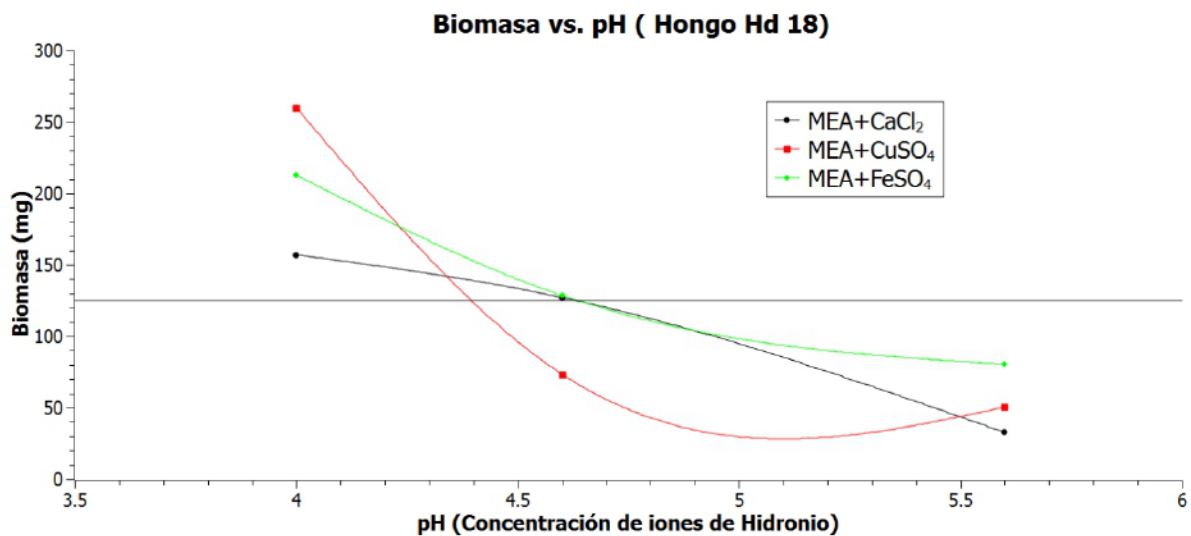


Gráfico 2. Se muestra la influencia de los elicitores y el pH en el comportamiento de la biomasa del hongo Hd 18 para cada condición de cultivo.

#### ANOVA

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	Prob > F
Elicitor	2	9742.16	4871	2.2977	0.1264
Tiempo	1	263132.04	263132	124.1176	<.0001*
Error	20	42400.45	2120		
C. Total	23	315274.65			

Comportamiento de la biomasa basado en el tratamiento de pH.				
Después	108.917		Razón t	-11.5746
Antes	318.333		Grados de libertad	11
Diferencia de medias	-209.42		Prob >  t	<.0001*
Error estándar	18.0928		Prob > t	1.0000
Extremo superior del IC al 95%	-169.59		Prob < t	<.0001*
Extremo inferior del IC al 95%	-249.24			
N	12			
Correlación	0.38449			

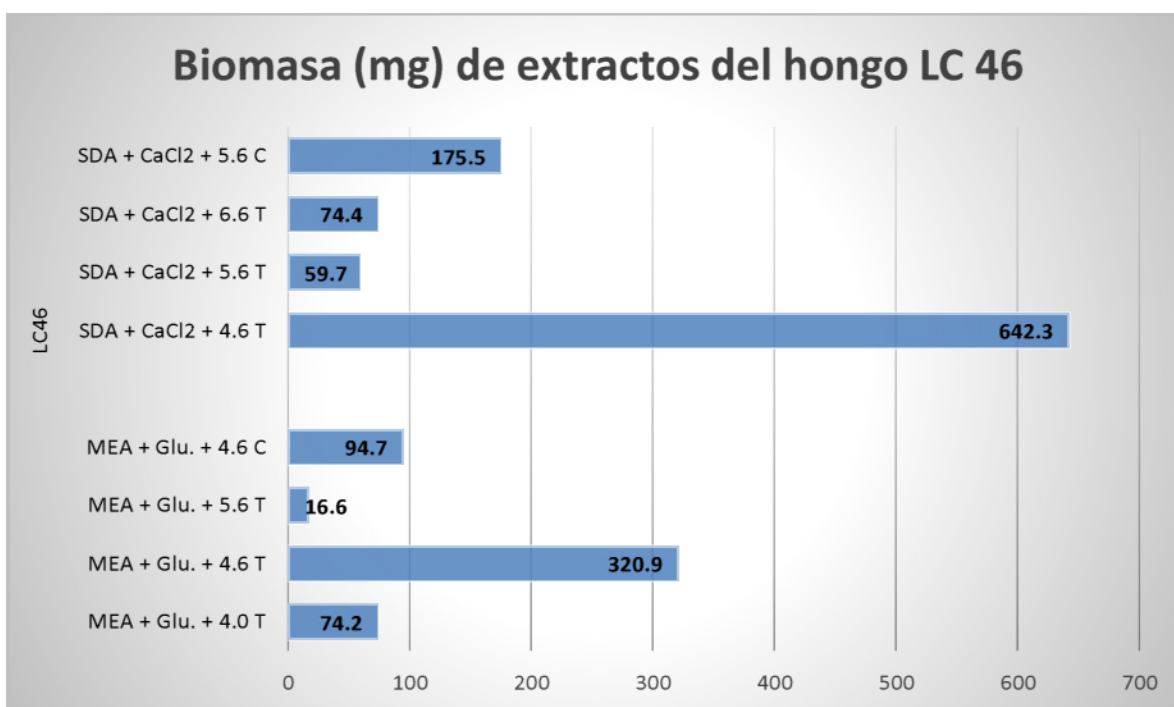


Gráfico 3. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

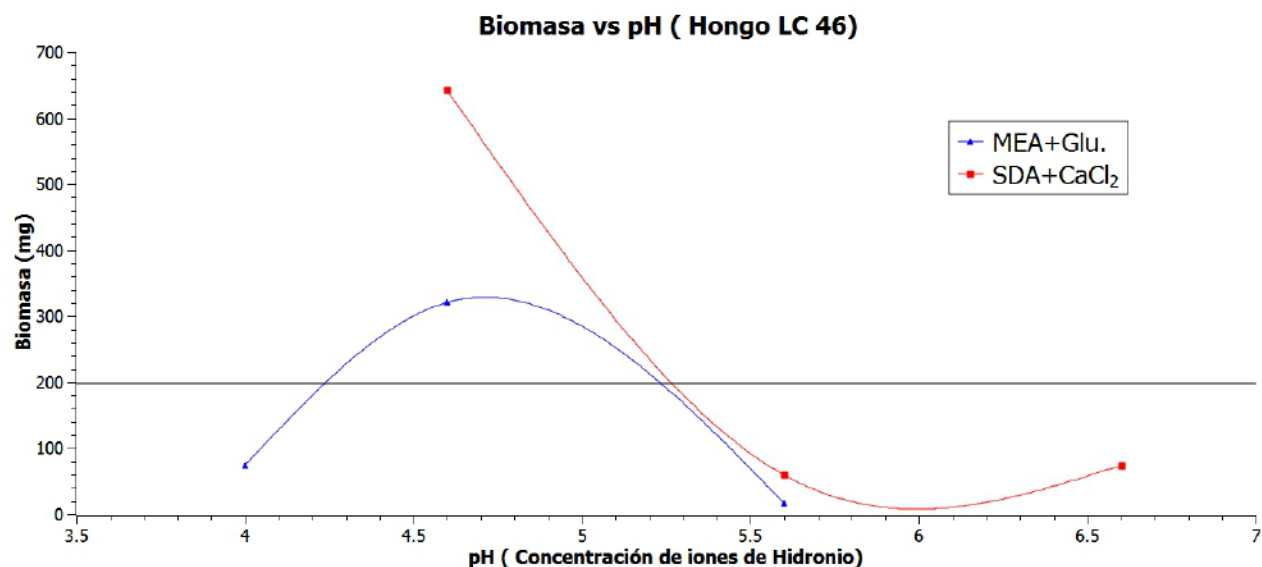


Gráfico 4. Se muestra la influencia de los elicitors y el pH en el comportamiento de la biomasa del hongo LC 46 para cada condición de cultivo.

#### Wilcoxon/Kruskal-Wallis

S	Z	Prob >  Z
91	2.39851	0.0165*

Ji cuadrado	Grados de libertad	Prob > Ji cuadrado
6.0114	1	0.0142*

	Después- Antes
Estadístico de prueba S	-15.000
Prob >  S	0.0391*
Prob > S	0.9805
Prob < S	0.0195*

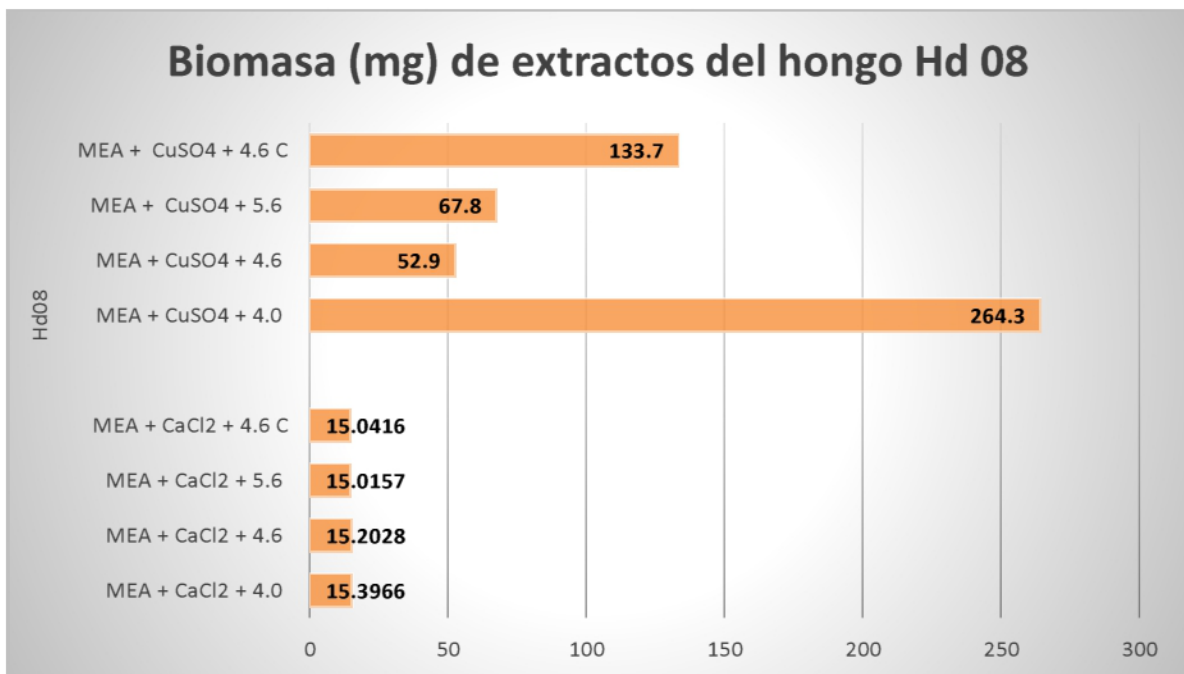


Gráfico 5. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

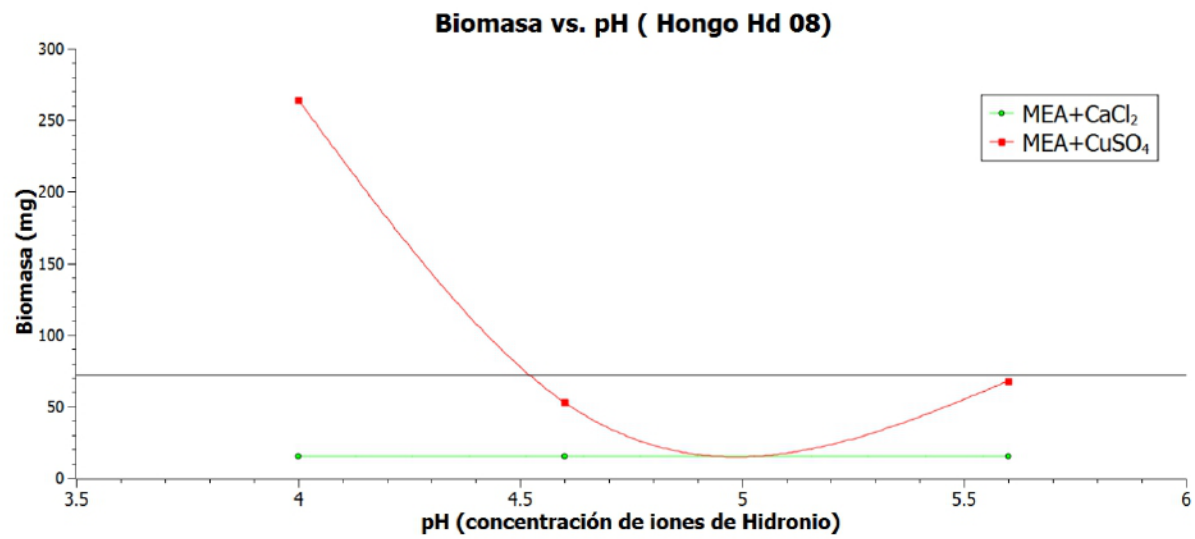


Gráfico 6. Se muestra la influencia de los elicitores y el pH en el comportamiento de la biomasa del hongo Hd 08 para cada condición de cultivo.

**Wilcoxon/Kruscal-Wallis**

**S**                      **Z**                      **Prob > |Z|**  
 76                      0.79950                      0.4240

**Ji cuadrado**                      **Grados de libertad**                      **Prob > Ji cuadrado**  
 0.7273                      1                      0.3938

Comportamiento de la biomasa basado en el tratamiento de pH.				
Después	72.4196		Razón t	-2.96268
Antes	196		Grados de libertad	7
Diferencia de medias	-123.58		Prob >  t	0.0210*
Error estándar	41.7124		Prob > t	0.9895
Extremo superior del IC al 95%	-24.946		Prob < t	0.0105*
Extremo inferior del IC al 95%	-222.21			
N	8			
Correlación	-0.6963			

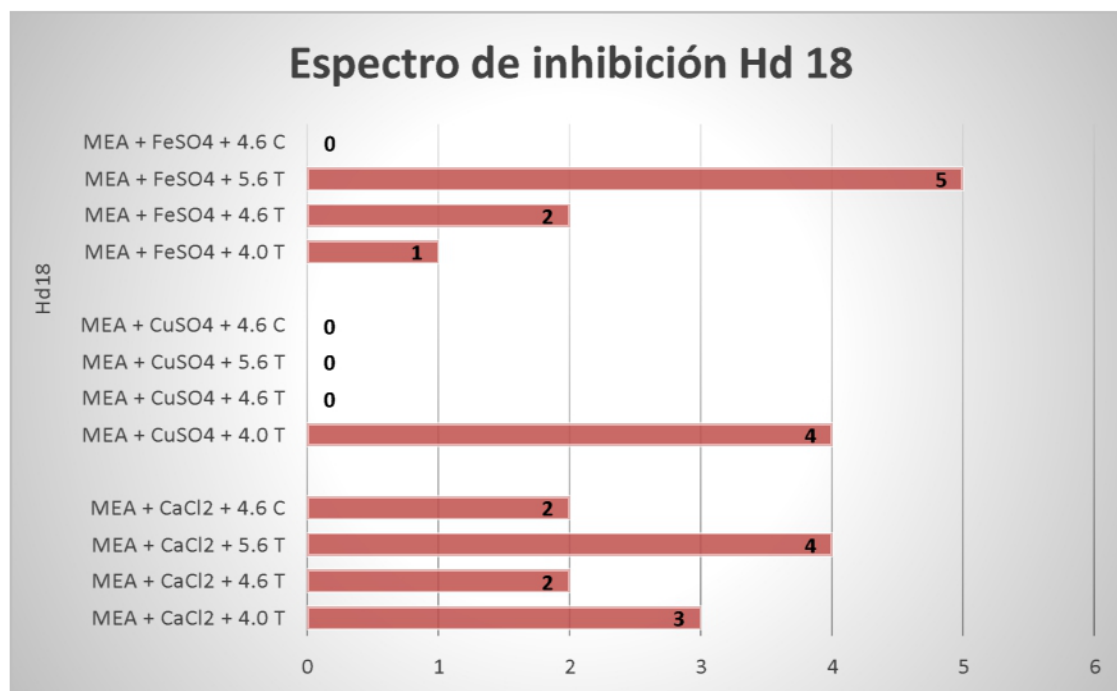


Gráfico 7. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 18 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

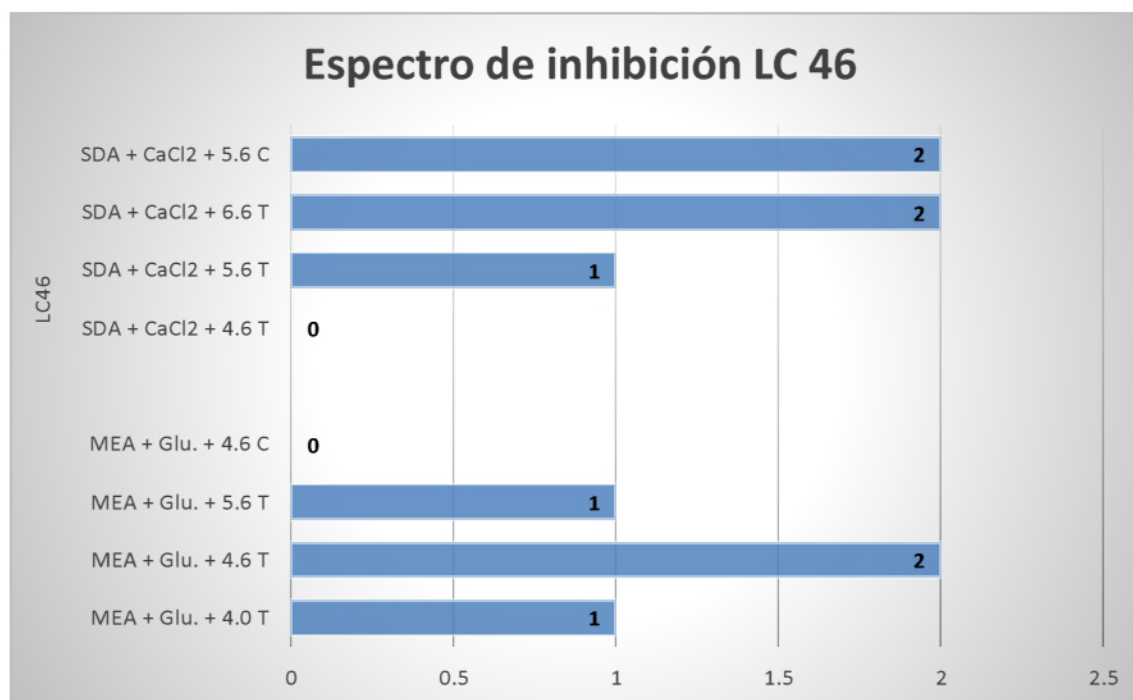


Gráfico 8. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

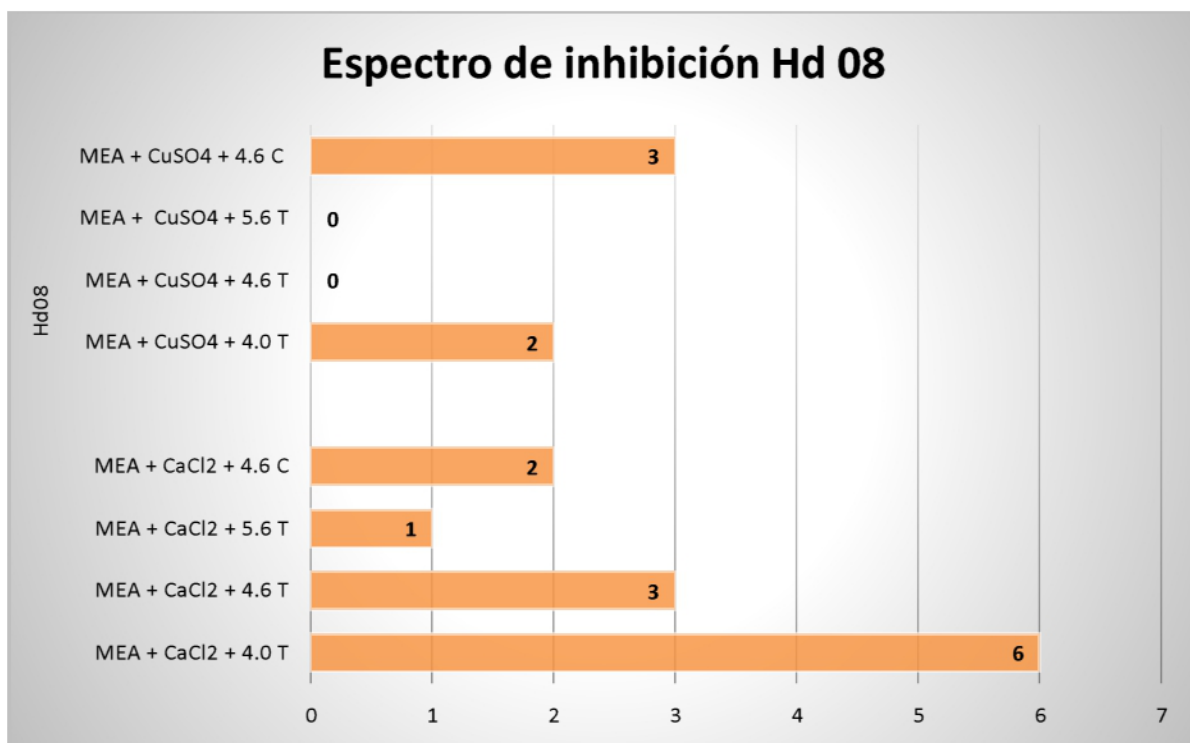


Gráfico 9. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de pH para cada condición de cultivo.

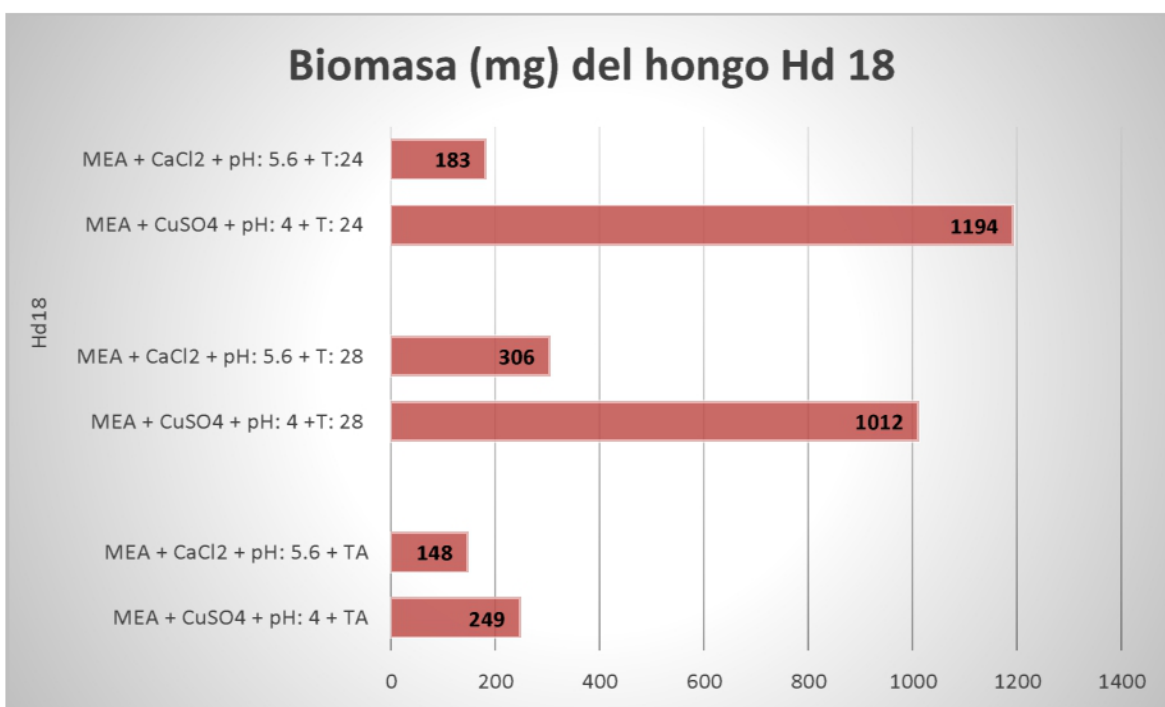


Gráfico 10. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 18 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

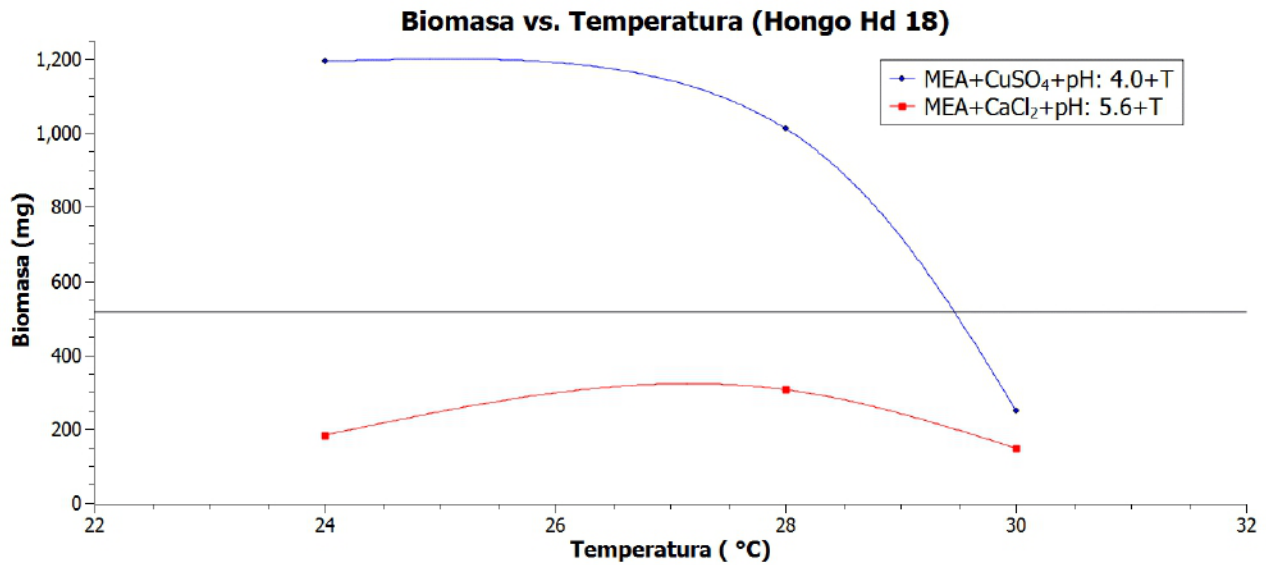


Gráfico 11. Se muestra la influencia de los elicitores y la temperatura en el comportamiento de la biomasa del hongo Hd 18 para cada condición de cultivo.

R cuadrado	0.799021
R cuadrado ajustado	0.497552
Raíz del error cuadrático medio	327.5095
Media de respuesta	515.3333
Observaciones (o suma de pesos)	6

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	3	852874.3	284291	2.6504
Error	2	214525.0	107262	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	5	1067399.3		0.2858

R cuadrado	0.765499
R cuadrado ajustado	0.413747
Raíz del error cuadrático medio	429.6254
Media de respuesta	531.1667
Observaciones (o suma de pesos)	6

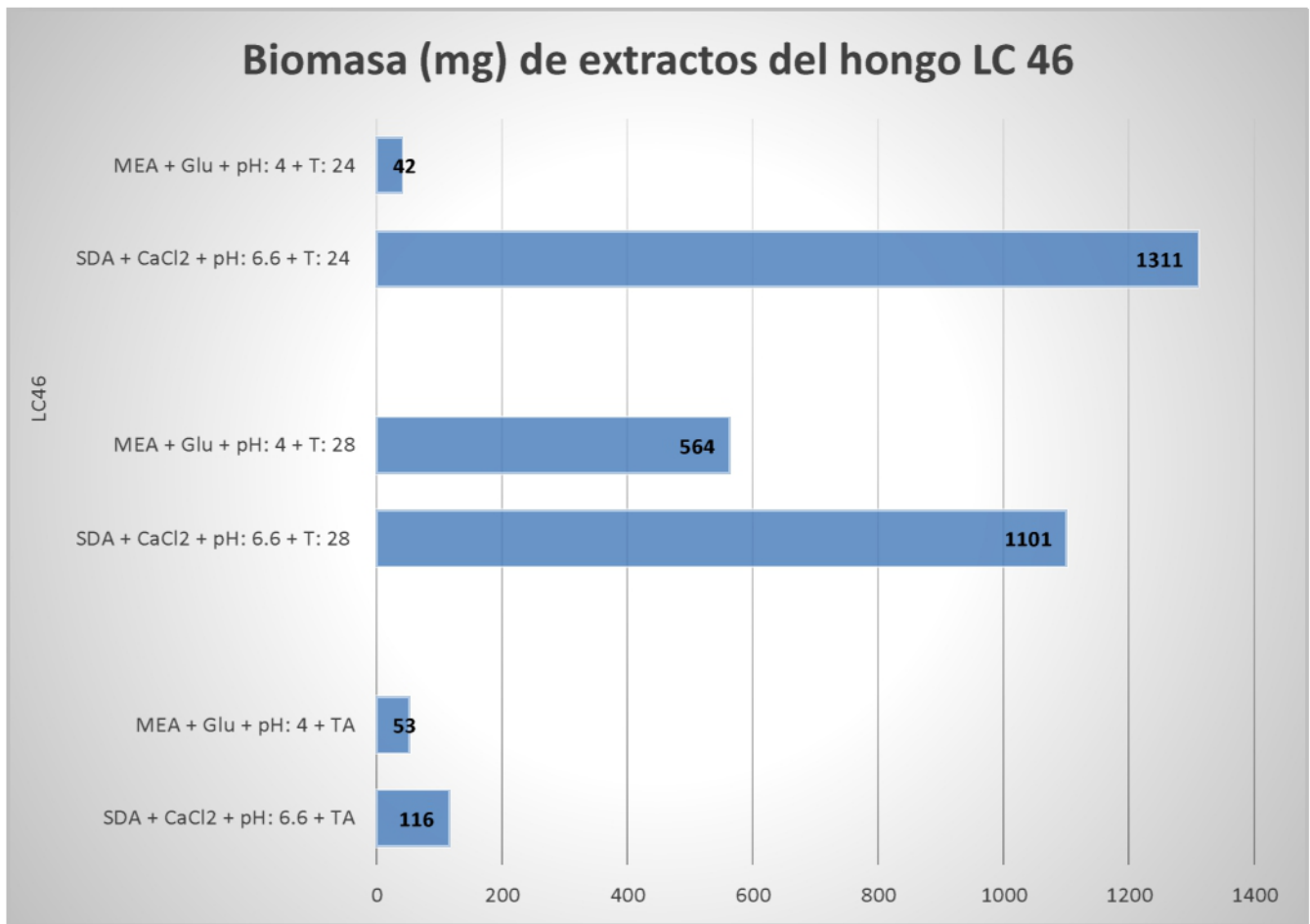


Gráfico 12. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

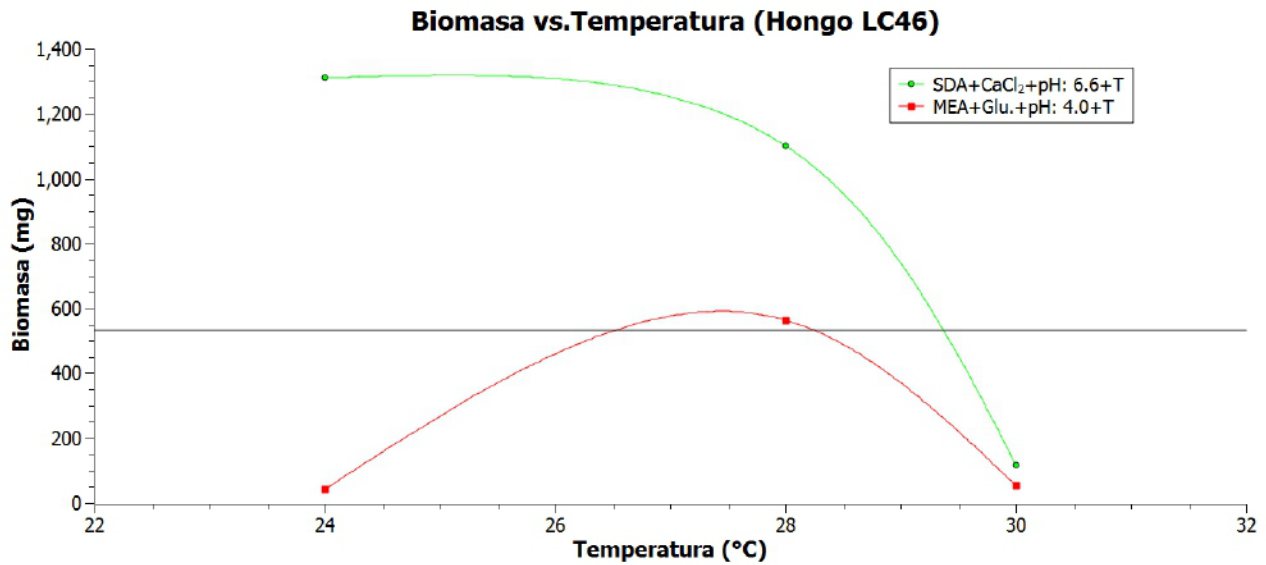


Gráfico 13. Se muestra la influencia de los elicitores y la temperatura en el comportamiento de la biomasa del hongo LC 46 para cada condición de cultivo.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	3	1205062.8	401688	2.1762
Error	2	369156.0	184578	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	5	1574218.8		0.3302

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Elicitor	1	0	0.00	.	.
Temperatura	2	2	622869.33	1.6873	0.3721
pH	1	0	0.00	.	.

Fuente	N parámetros	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
Elicitor	1	1	92929.354	6.39e+15	<.0001*
Temperatura (°C)	2	2	0.000	0.0000	1.0000
pH	1	0	0.000	.	.

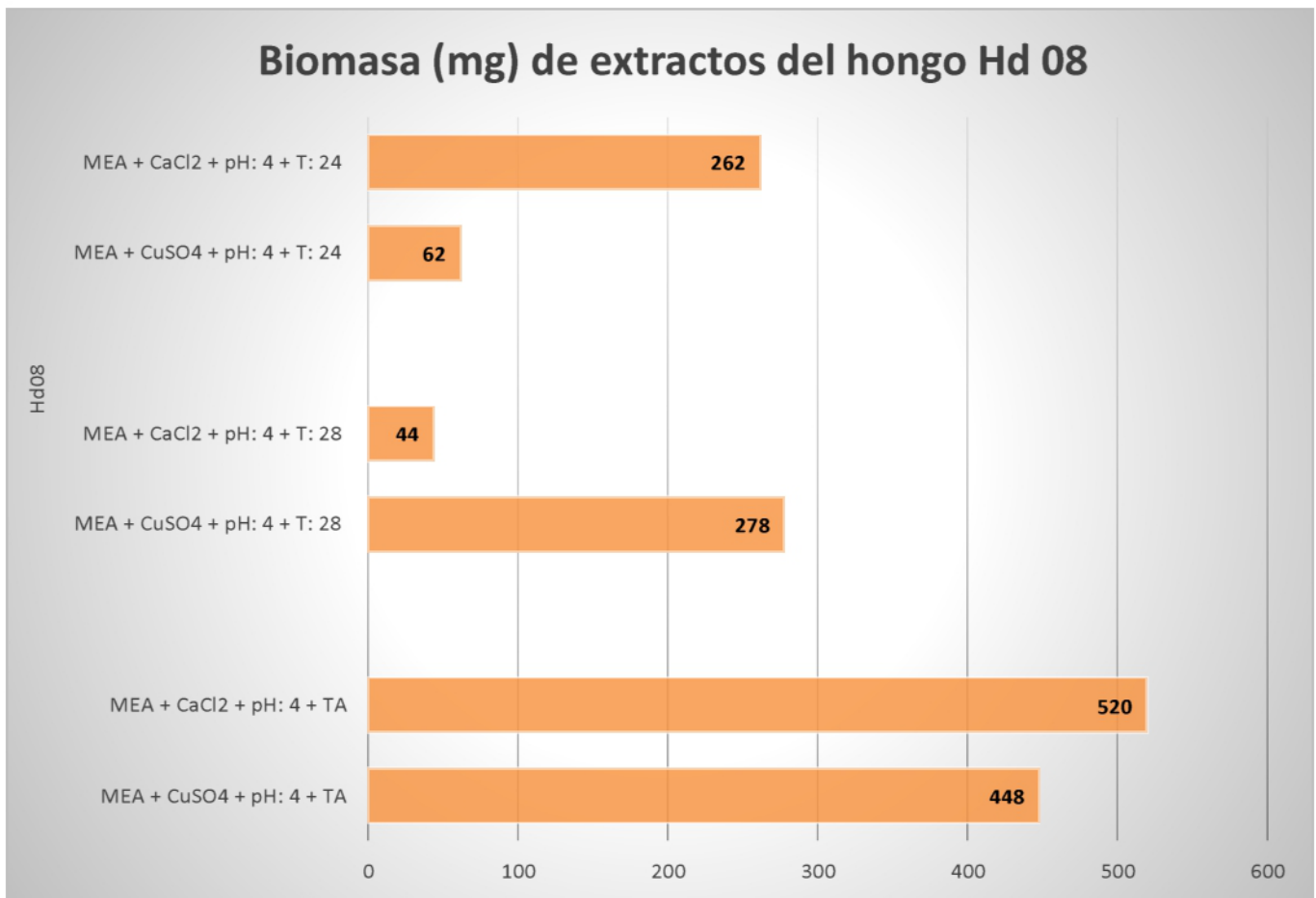


Gráfico 14. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

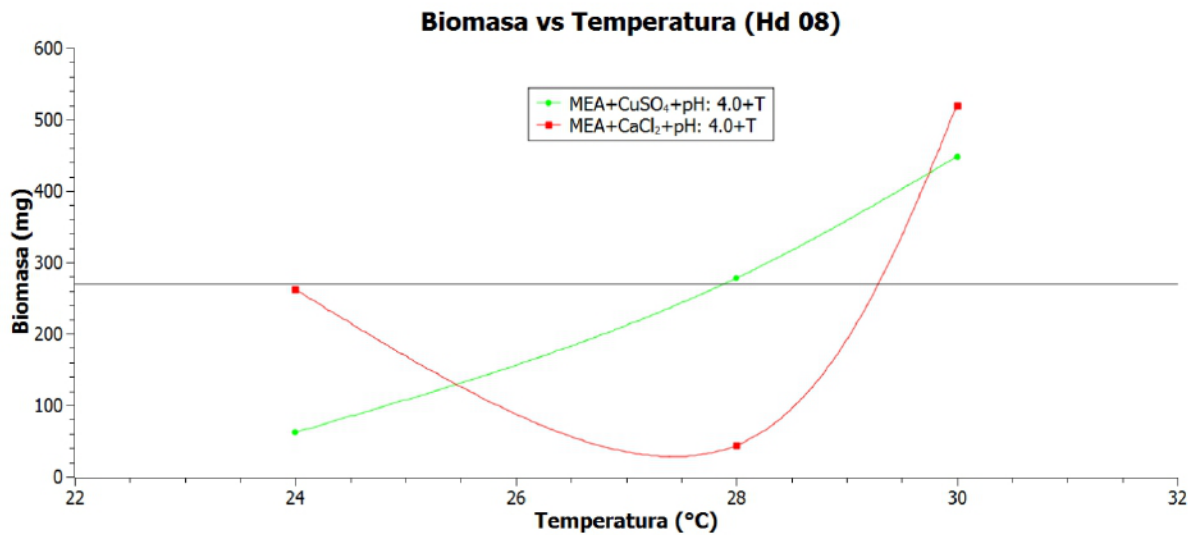


Gráfico 15. Se muestra la influencia de los elicitores y la temperatura en el comportamiento de la biomasa del hongo Hd 08 para cada condición de cultivo.

R cuadrado	1
R cuadrado ajustado	1
Raíz del error cuadrático medio	3.815e-6
Media de respuesta	139.8483
Observaciones (o suma de pesos)	6

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	3	92929.354	30976.5	2.13e+15
Error	2	2.9104e-11	1.46e-11	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	5	92929.354		<.0001*

Término	Estimación	Error estándar	Razón t	Prob >  t
Constante del modelo	139.8483	1.557e-6	9e+7	<.0001*
Elicitor[CaCl <sub>2</sub> ]	-124.4517	1.557e-6	-8e+7	<.0001*
Temperatura (°C)[24]	0	2.202e-6	0.00	1.0000
Temperatura (°C)[28]	0	2.202e-6	0.00	1.0000
pH	Puesto a cero	0	.	.

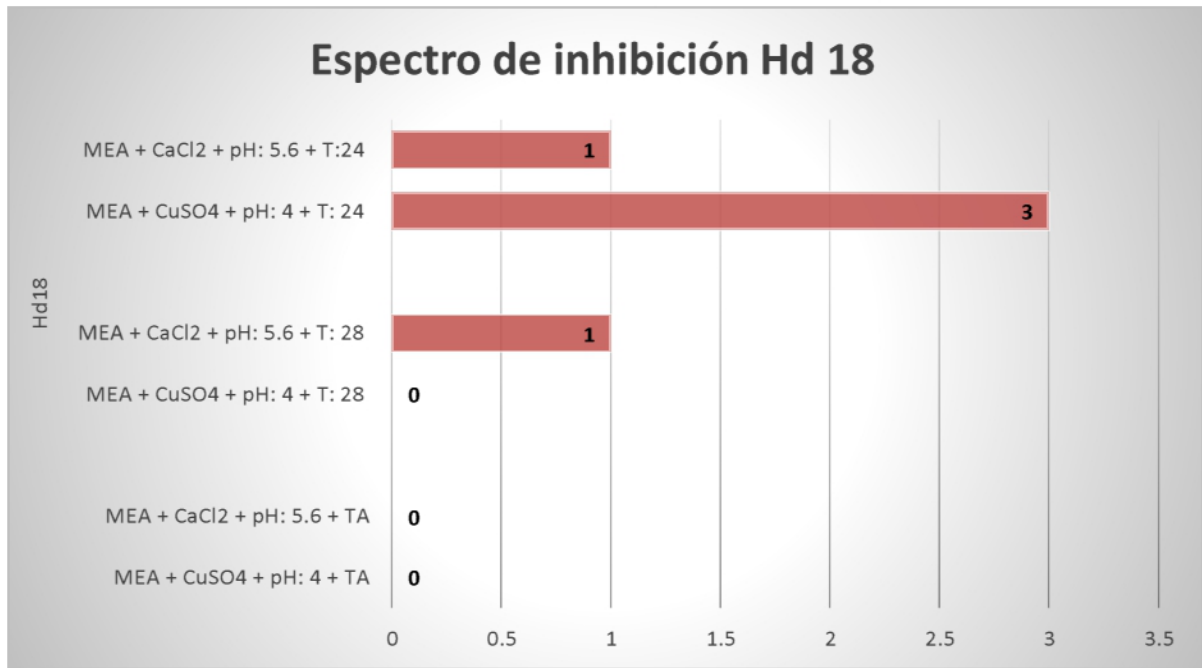


Gráfico 16. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 18 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

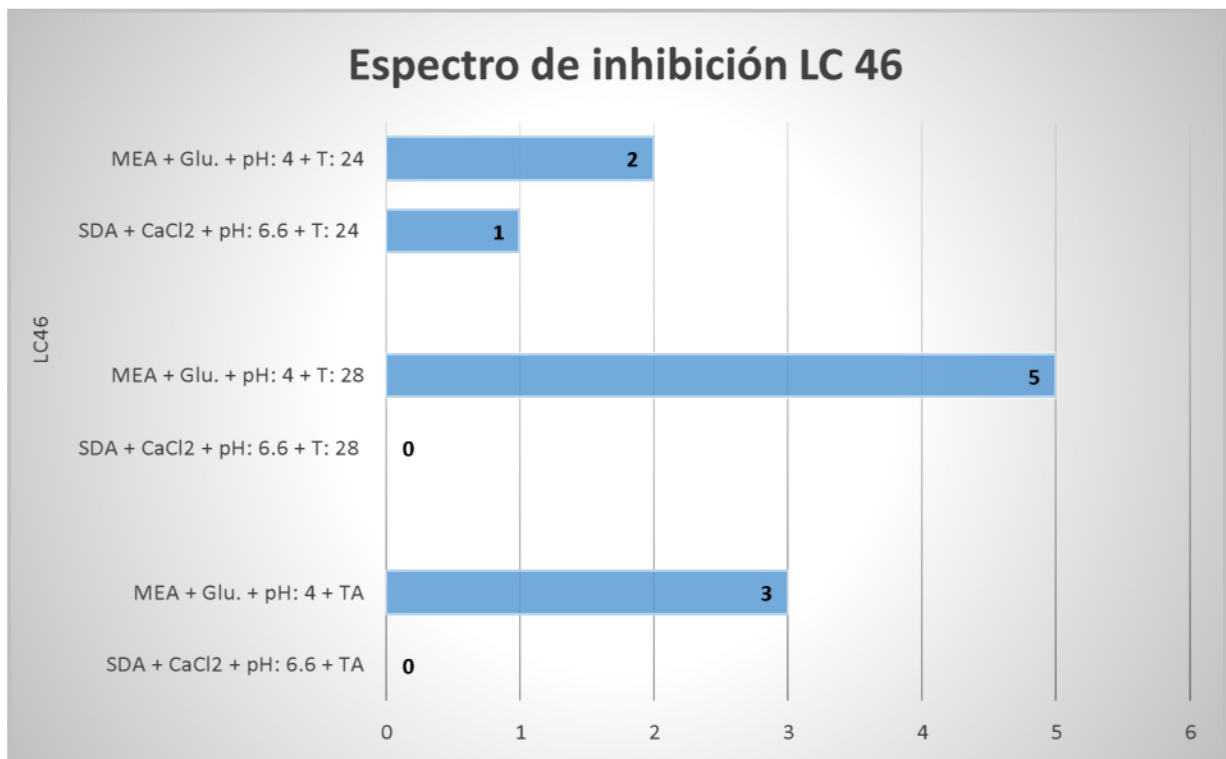


Gráfico 17. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

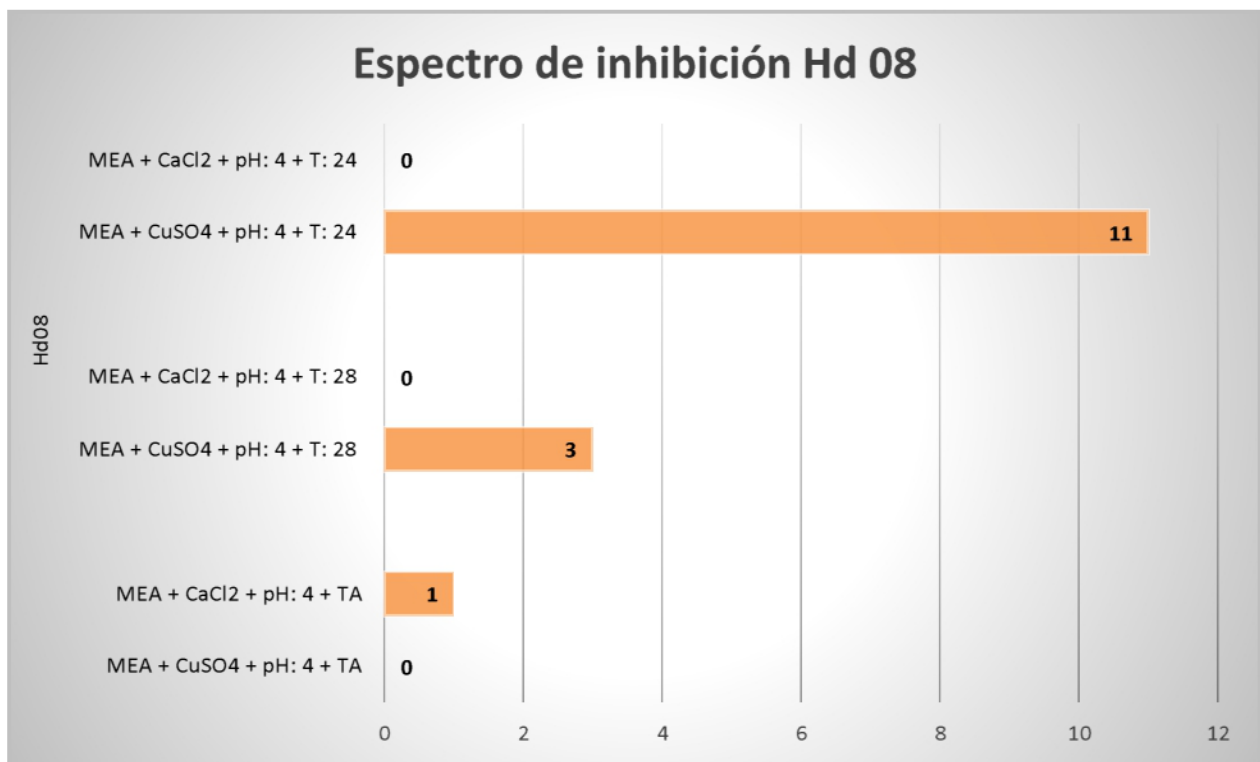


Gráfico 18. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de temperatura para cada condición de cultivo.

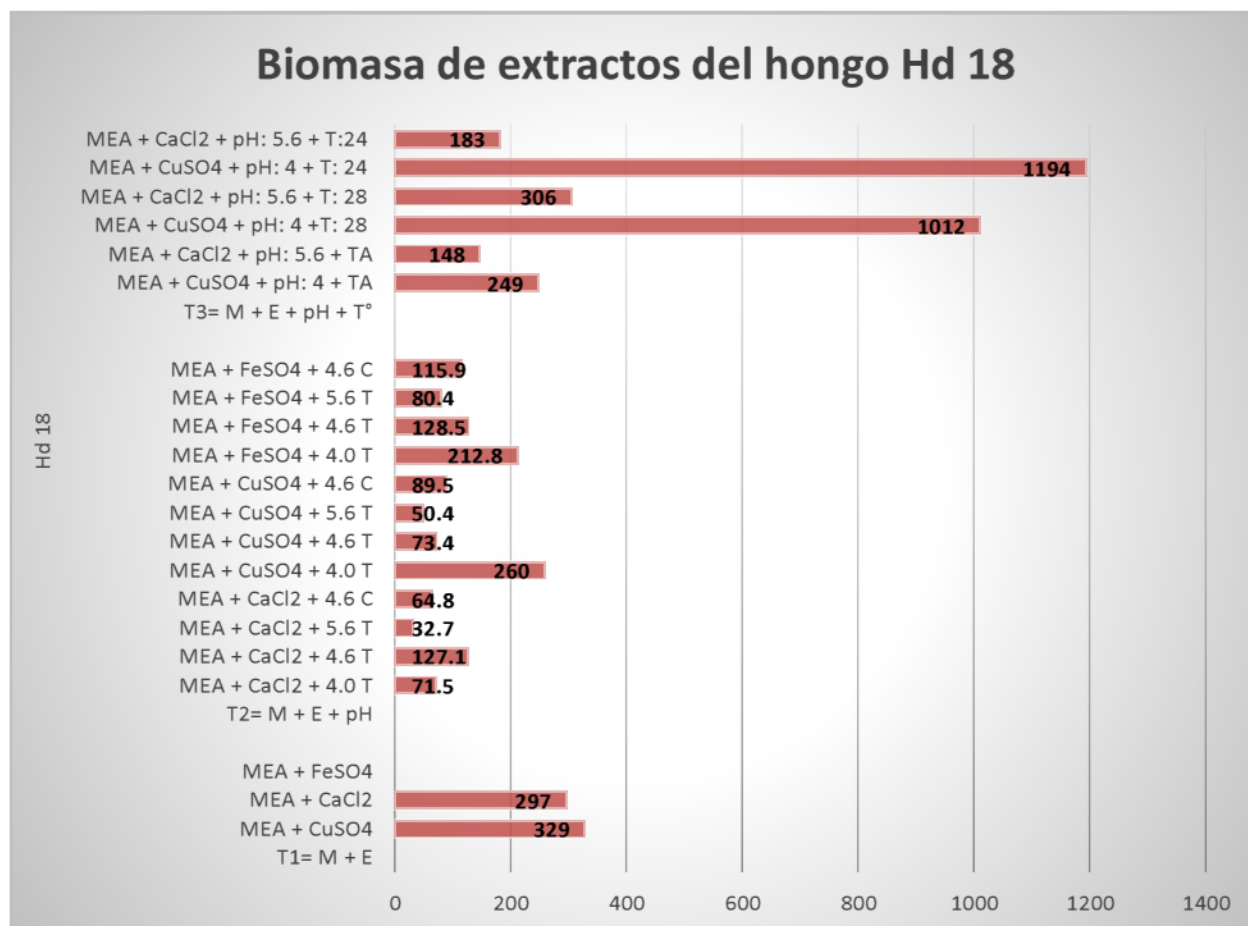


Gráfico 19. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de pH y temperatura para cada condición de cultivo.

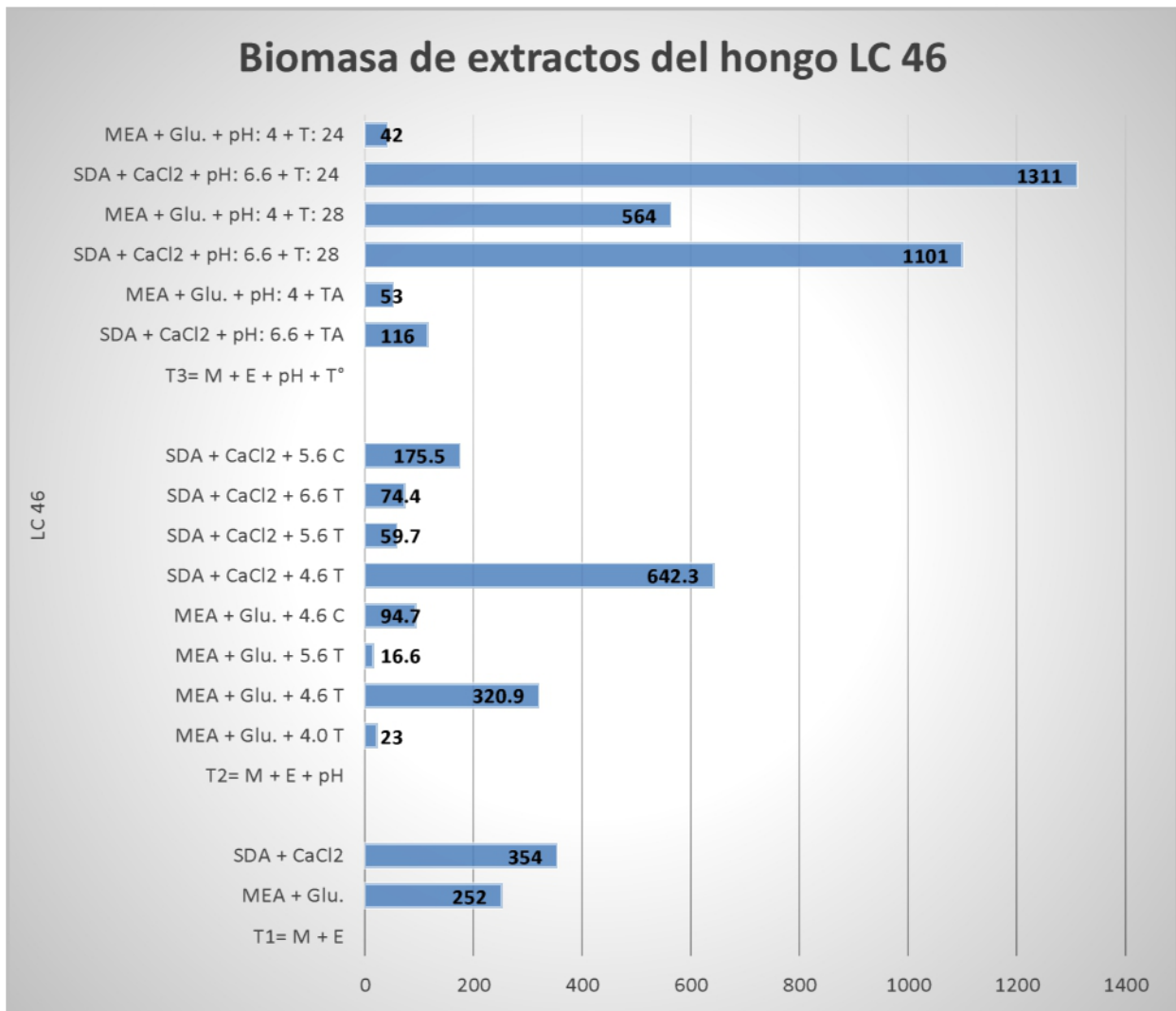


Gráfico 20. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de pH y temperatura para cada condición de cultivo.

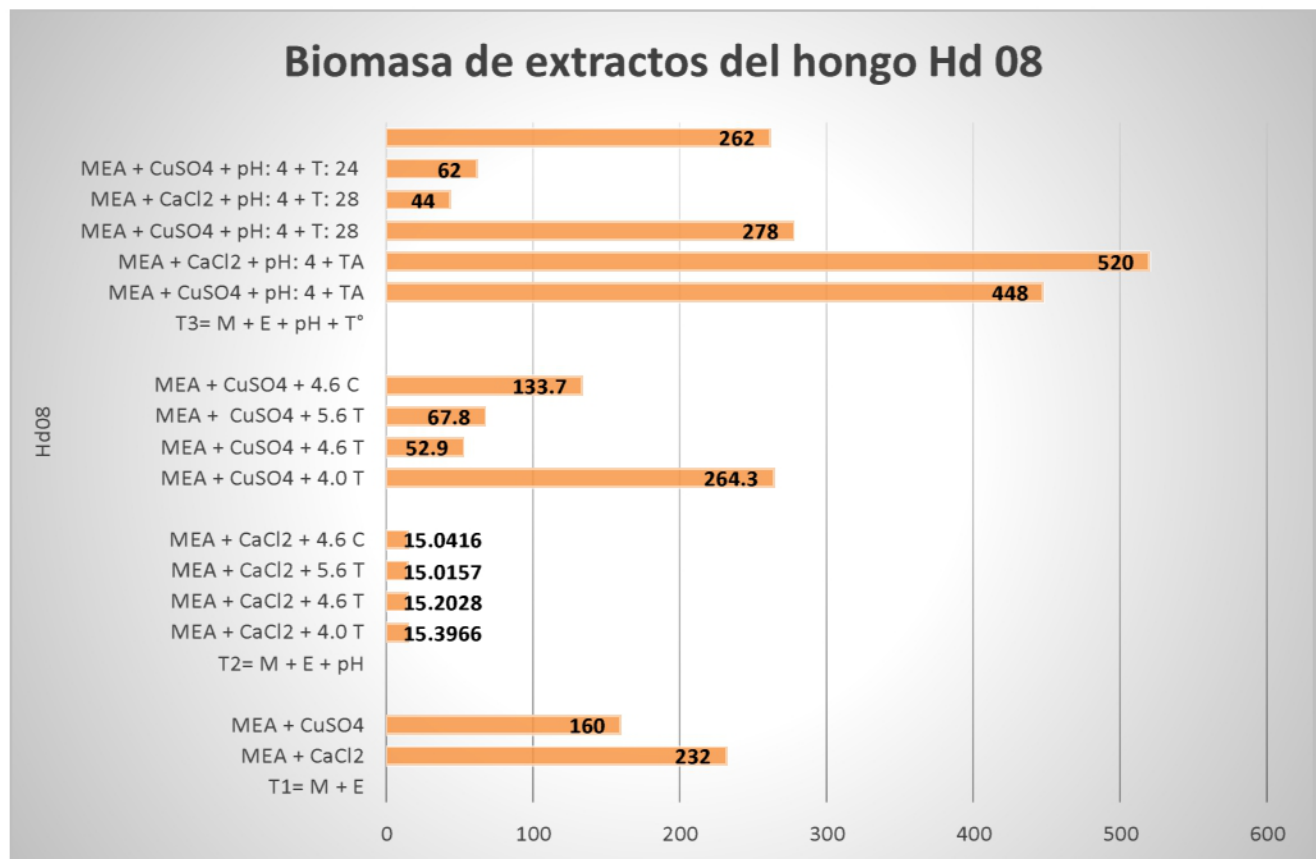


Gráfico 21. Se muestra el cambio en la biomasa del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de pH y temperatura para cada condición de cultivo.

## Actividad inhibitoria de acuerdo a los tratamientos de optimización del hongo Hd 18

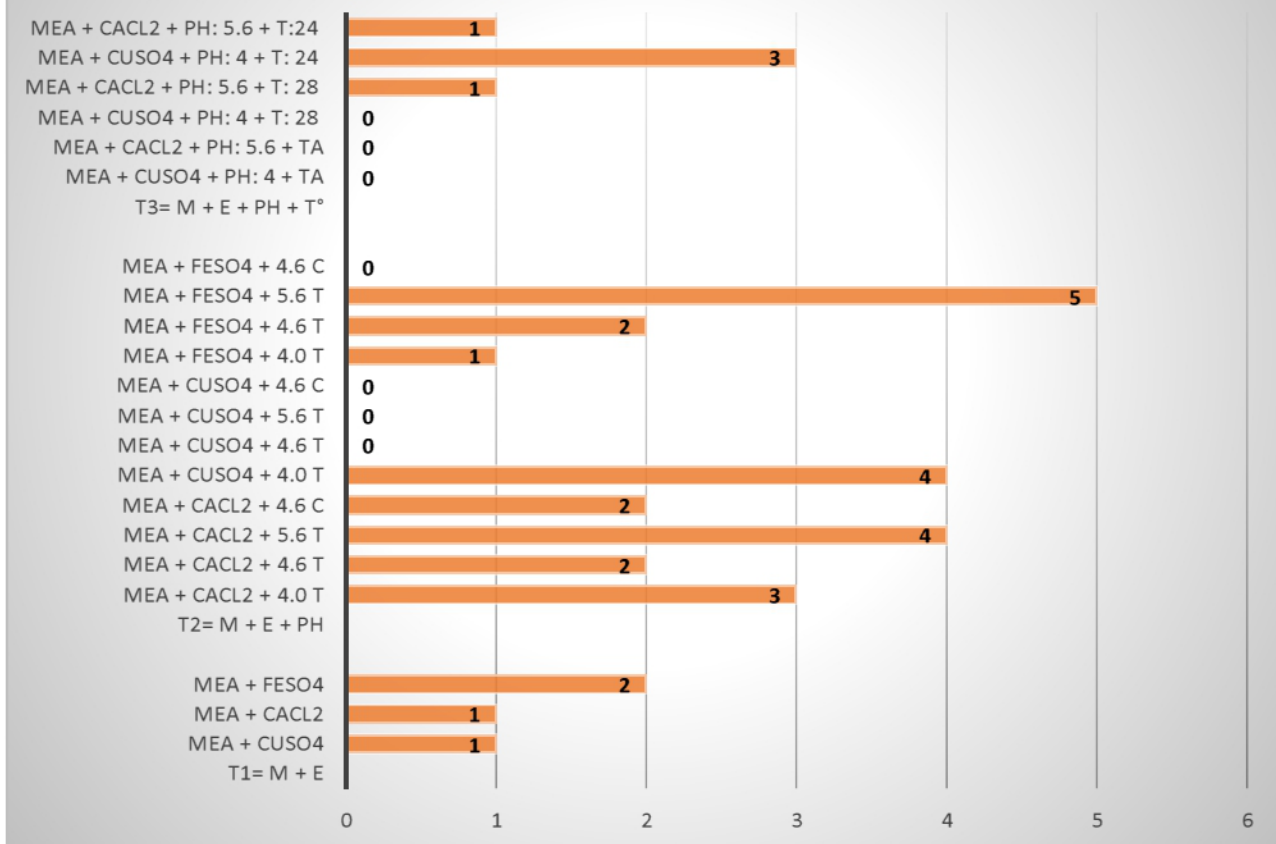


Gráfico 22. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 18 dada por los distintos tratamientos de pH temperatura para cada condición de cultivo.

## Actividad inhibitoria de acuerdo a los tratamientos de optimización del hongo LC 46

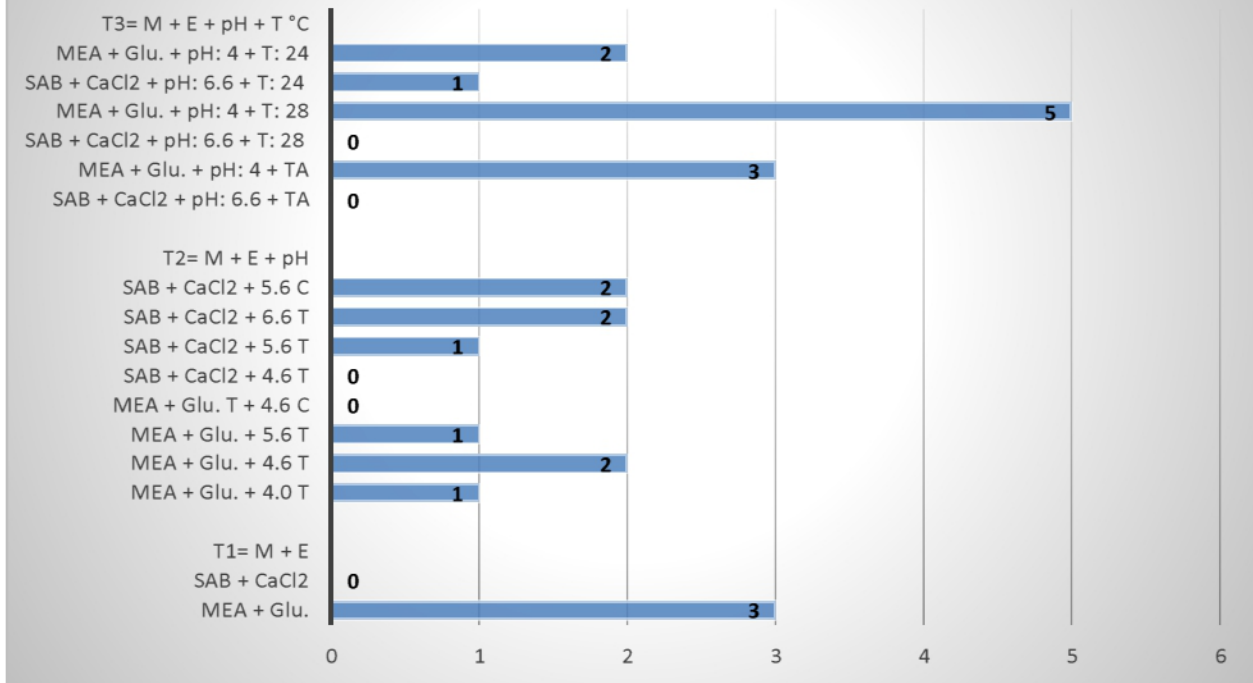


Gráfico 23. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo LC 46 dada por los distintos tratamientos de pH temperatura para cada condición de cultivo.

## Actividad inhibitoria de acuerdo a los tratamientos de optimización del hongo Hd 08

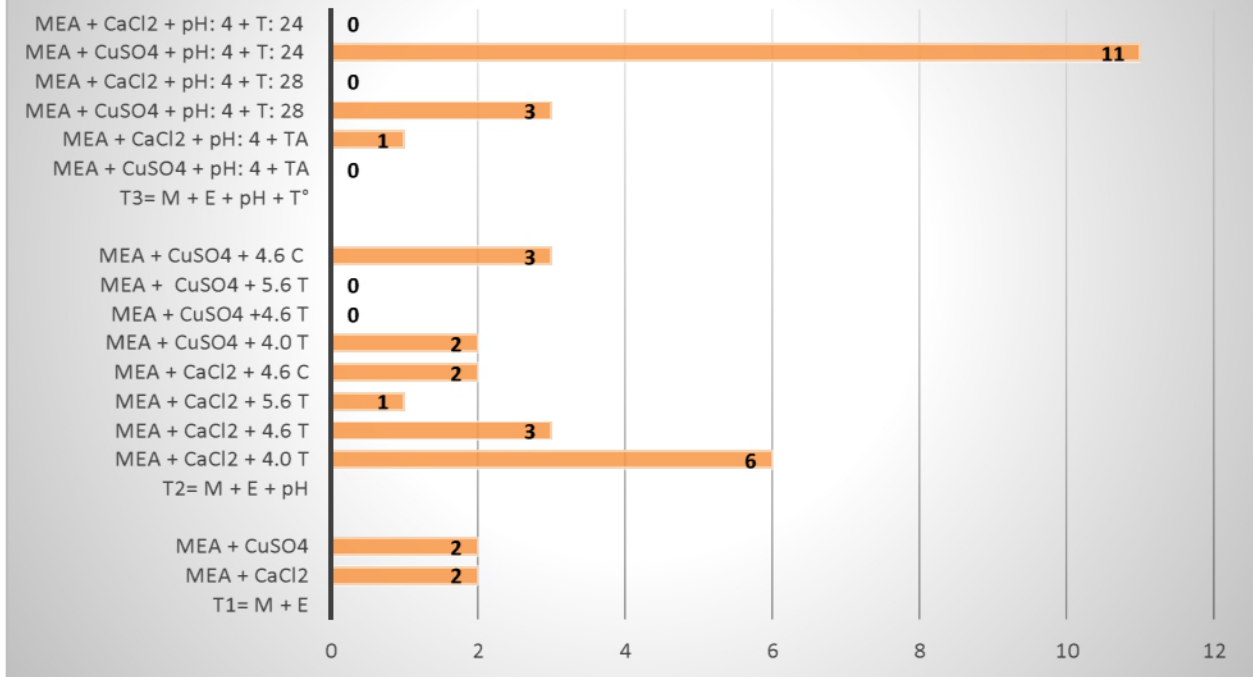
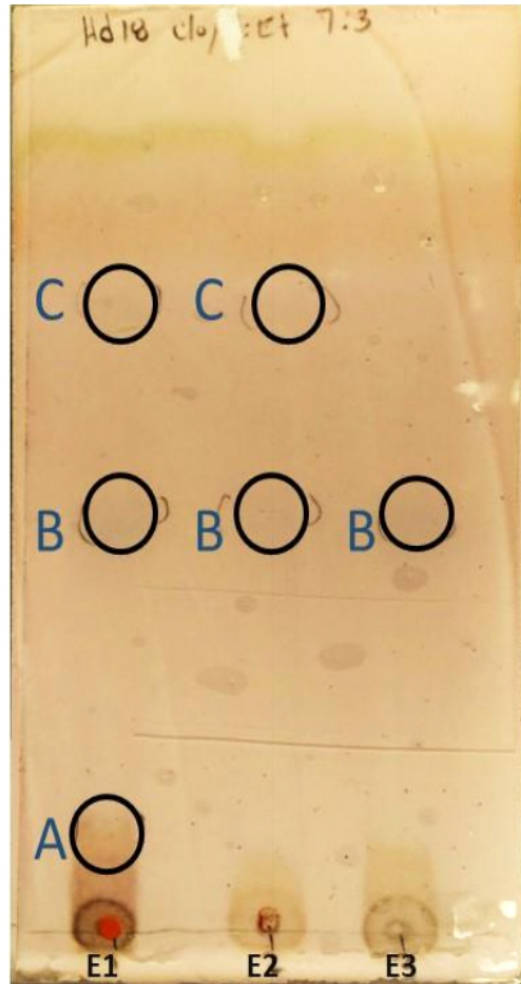
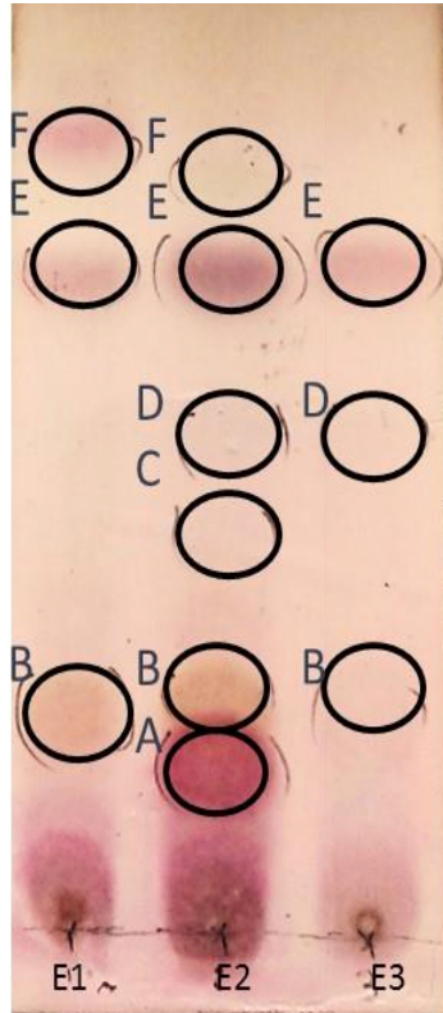


Gráfico 24. Se muestra el cambio en la inhibición del hongo Hd 08 dada por los distintos tratamientos de pH temperatura para cada condición de cultivo.

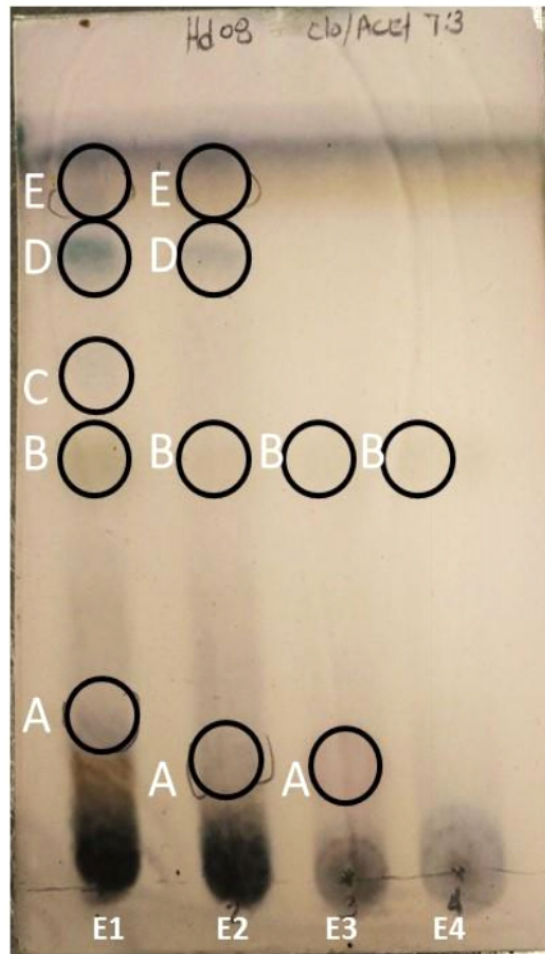
# FIGURAS



**Fig. 4.** Placa CCD para la cepa Hd 18; elución 7:3 ( $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ); E1: Medio + elicitor: 3 compuestos (A,B,C); E2: Medio + elicitor + pH, 2 compuestos(B,C); E3: Medio + elicitor + pH + T °C : 1 compuesto(B).



**Fig. 5.** Placa CCD para la cepa LC 46; elución 7:3  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$  ; E1: Medio + elicitor: 3 compuestos (B, E, F); E2: Medio + elicitor + pH: 6 compuestos (A, B, C, D, E, F); E3: Medio + elicitor + pH + T °C: 3 compuestos (B, D, E).



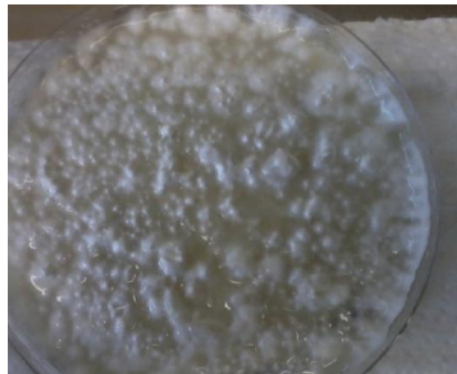
**Fig. 6.** Placa CCD para la cepa Hd 08; elución 7:3  $\text{CHCl}_3/\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$  ; E1: Medio + elicitor, 5 compuestos (A, B, C, D, E); E2: Medio + elicitor + pH, 4 compuestos (A, B, D, E); E3: Medio + elicitor + pH + T1°C, 2 compuestos (A,B); E4: Medio + elicitor + pH + T2 °C, 1 compuesto (B).



**Fig.7.** Cladosporium sp.(Hd 18)



**Fig.8.** Lentinus strigellus (LC 46)



**Fig.9.** Pestalotiopsis Microspore  
(Hd 08)