

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ENZIMO-FUNCIONAL DE HONGOS LIGNINO-CELULOLÍTICOS PROCEDENTES DE LA CORTEZA DE ALISO (*Alnus acuminata*), ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) Y PUMAMAQUI (*Oreopanax heterophyllum*) PRESENTES EN MANCHAS DE BOSQUE NATIVO DEL PASOCHOA, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ÉRIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO

SANGOLQUÍ, 25 DE MARZO DE 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. Érika Cristina Castillo Tamayo

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Laura López

Sangolquí, 25 de marzo de 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. **ERIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO**, como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**.

Sangolquí, 25 de marzo de 2011

Bs. Karina Ponce
DIRECTORA

Ing. Mariela Vera
CODIRECTORA

REVISADO POR

Ing. Rafael Vargas
DIRECTOR DE LA CARRERA

DEDICATORIA

A Dios por iluminarme y llenarme de sabiduría para alcanzar mis metas. A mi papi Patricio que con su ejemplo ha sabido guiarme y ser mi fuerza para cada día ser mejor. A mi mami Cristina que ha estado siempre a mi lado y me ha enseñado a luchar por mis sueños. A mis hermanitos PJ, Soffy y Diani a los que quiero mucho. A Dorita que me ha apoyado y es parte de la familia. A mi abuelita Enriqueta que ha sido mi segunda madre y a mi abuelito Miguel Ángel que desde el cielo siempre ha cuidado de mí. A Rodrigo por su continuo apoyo y por brindarme su amor.

A G R A D E C I M I E N T O S

Le agradezco a mi papi y a mi mami por ser los cimientos de mi vida, porque me han ayudado a crecer como persona y han cultivado en mí valores, ideales y responsabilidades para ser una buena persona. Me han enseñado que las cosas que uno quiere las debe obtener con esfuerzo y dedicación, que nada en la vida es fácil pero que siempre se puede luchar para conseguirlas. Gracias porque además de padres son mis amigos.

Agradezco también a mis hermanos PJ, Soffy y Dianita por estar siempre a mi lado y aunque en ocasiones discutimos sabemos que siempre podemos contar el uno con el otro. Porque la familia es lo más importante.

Gracias a mi enamorado por no dejar que me dé por vencida y por enseñarme que la vida es un sueño y que siempre hay que luchar por los sueños.

A mis amigos Adri, Alex, Caro, Fer, Karlitos, Leo y Tañis, a los que conocí en prepolitécnico y desde entonces no nos hemos separado. La amistad es un tesoro, dichosos los que cuentan con verdaderos amigos. Sé que difícilmente encontraré personas de tan buenos sentimientos como ustedes.

A mi directora Karina Ponce y mi codirectora Mariela Vera, por sus conocimientos, orientación y dedicación. A todos los ingenieros de la carrera por ser parte de mi formación académica y personal.

A Almita y Blanquita que gracias a su ejemplo de vida he aprendido a ser mejor cada día. A Geomy por siempre ayudarme en lo que estuvo en sus manos.

A la Ingeniera Neyda Espín por abrirme las puertas del laboratorio de Bioprosesos y por brindarme sus conocimientos y colaborar de forma activa en mi proyecto. A Mary y Dianita que siempre se alegraron por mis triunfos. Al ingeniero Abraham Oleas por su asesoría y apoyo continuo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE CUADROS.....	xii
LISTADO DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. Hongos lignino-celulolíticos.....	5
1.4.2. Recolección de muestras, aislamiento y purificación de hongos.....	8
1.4.3. Actividad enzimática.....	9
1.4.4. Caracterización morfológica de hongos.....	11
1.4.5. Volcán Pasochoa.....	13
1.4.6. Aliso (<i>Alnus acuminata</i>).....	14
1.4.7. Arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>).....	14
1.4.8. Pumamaqui (<i>Oreopanax heterophyllum</i>).....	15
1.4.9. Desechos sólidos orgánicos.....	16
1.5. Hipótesis.....	17

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Participantes.....	18
2.2. Zona de estudio.....	18
2.3. Procedimientos.....	19
2.3.1. Fase de campo.....	19
2.3.2. Fase de laboratorio.....	20
2.3.3. Diagrama de flujo del proceso.....	29
2.4. Tiempo de investigación.....	30
2.5. Diseño experimental.....	30
2.6. Análisis de datos.....	30
CAPITULO 3: RESULTADOS	31
3.1. Aislamiento, purificación y caracterización preliminar de las cepas lignino-celulolíticas.....	31
3.2. Evaluación de la actividad enzimática.....	38
3.2.1. Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica.....	38
3.2.2. Actividad enzimática cuantitativa.....	44
3.3. Caracterización morfológica de las tres especies más eficientes.....	59
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	62
4.1. Aislamiento, purificación y caracterización preliminar de las cepas lignino-celulolíticas.....	62
4.2. Evaluación de la actividad enzimática de las cepas fúngicas aisladas e identificadas.....	65
4.2.1. Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica.....	65
4.2.2. Actividad enzimática cuantitativa.....	67
4.3. Caracterización morfológica de las tres cepas más eficientes.....	70
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	73
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	74

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1	Frecuencia y porcentaje de hongos desarrollados según los medios de cultivo.....	31
Tabla 3.2	Frecuencia y porcentaje de las especies fúngicas aisladas en medio MA.....	32
Tabla 3.3	Frecuencia y porcentaje de las especies fúngicas aisladas en medio PDA.....	32
Tabla 3.4	Frecuencia y porcentaje de las especies vegetales.....	32
Tabla 3.5	Frecuencia y porcentaje del número de las resiembras de purificación.....	34
Tabla 3.6	Frecuencia y porcentaje del número de resiembras realizadas en medio MA.....	35
Tabla 3.7	Frecuencia y porcentaje del número de resiembras realizadas en medio PDA.....	36
Tabla 3.8	Características microscópicas.....	37
Tabla 3.9	Familias o géneros de las cepas purificadas.....	37
Tabla 3.10	Resultados del análisis de varianza (ANOVA).....	40
Tabla 3.11	Subconjuntos homogéneos de las cepas fúngicas, según la prueba DHS de Tukey, para diámetros de los halos de hidrólisis (cm).....	41
Tabla 3.12	Intervalos generales de confianza, al 95%, de los diámetros de los halos de hidrólisis.....	42
Tabla 3.13	ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad CMCasa generados por las cepas fúngicas seleccionadas.....	45
Tabla 3.14	Subconjuntos homogéneos de cepas fúngicas, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad CMCasa (U/L_{ENZ}).....	45
Tabla 3.15	Intervalos generales de confianza, al 95%, de la actividad CMCasa...	46
Tabla 3.16	ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad avicelasa generados por la cepa fúngica.....	48
Tabla 3.17	Subconjuntos homogéneos de la cepa fúngica, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad avicelasa (U/L_{ENZ}).....	49
Tabla 3.18	Intervalos generales de confianza, al 95%, de la actividad avicelasa..	50

Tabla 3.19	ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad lignino peroxidásica generados por la cepa fúngica.....	52
Tabla 3.20	Subconjuntos homogéneos de la cepa fúngica, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad lignino peroxidásica (U_{LENZ}).....	53
Tabla 3.21	Intervalos generales de confianza, al 95%, de la actividad lignino peroxidásica.....	54

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1	Imagen de la especie vegetal aliso (<i>Alnus acuminata</i>).....	14
Figura 1.2	Imagen de la especie vegetal arrayán (<i>Myrcianthes hallii</i>).....	15
Figura 1.3	Imagen de la especie vegetal pumamaqui (<i>Oreopanax heterophyllum</i>).....	16
Figura 2.1	Toma de la corteza de la especie vegetal aliso.....	19
Figura 2.2	Siembra de las cortezas vegetales en los dos medios de cultivo PDA y MA.....	20
Figura 2.3	Resiembra de purificación de una cepa proveniente de la corteza de la especie vegetal pumamaqui.....	21
Figura 2.4	Conservación en tubos con agar inclinado de una cepa del género <i>Aspergillus</i>	23
Figura 3.1	Hongos de la corteza vegetal de arrayán sembrada en medio PDA y en medio MA.....	33
Figura 3.2	Hongos de la corteza, de aliso, sembrada en medio PDA.....	33
Figura 3.3	Primera resiembra de purificación, cepa procedente de la corteza de la especie vegetal pumamaqui, árbol #8.....	34
Figura 3.4	Primera resiembra de purificación, mezcla de dos cepas procedentes de la corteza de la especie aliso, árbol #4.....	35
Figura 3.5	Visión macroscópica y microscópica de una cepa del género <i>Aspergillus</i>	36
Figura 3.6	Porcentajes de la incidencia de los géneros y las familias de las cepas fúngicas purificadas.....	38
Figura 3.7	Resultados de la actividad enzimática cualitativa positiva de una cepa de <i>Trichoderma</i> a las 72 horas de incubación.....	39
Figura 3.8	Resultados de la actividad enzimática cualitativa positiva de una cepa de <i>Fusarium</i> a las 72 horas de incubación.....	39
Figura 3.9	Resultados de la actividad enzimática cualitativa negativa de una cepa de <i>Aspergillus</i> a las 72 horas de incubación.....	40
Figura 3.10	Medias del diámetro de los halos de hidrólisis en relación con las cepas fúngicas.....	43

Figura 3.11	Variabilidad de los diámetros de los halos de hidrólisis por cepa fúngica.....	44
Figura 3.12	Medias de los valores de la actividad CMCasa en relación con la cepa fúngica.....	47
Figura 3.13	Variabilidad de los valores de la actividad CMCasa por especie fúngica.....	48
Figura 3.14	Medias de los valores de la actividad avicelasa en relación con la cepa fúngica.....	51
Figura 3.15	Variabilidad de los valores de la actividad avicelasa por cepa fúngica.....	52
Figura 3.16	Medias de los valores de la actividad lignino peroxidásica en relación con la cepa fúngica.....	55
Figura 3.17	Variabilidad de los valores de la actividad lignino peroxidásica por cepa fúngica.....	56
Figura 3.18	Diagrama de barras de la actividad CMCasa para cada cepa fúngica.....	57
Figura 3.19	Diagrama de barras de la actividad avicelasa para cada cepa fúngica.....	58
Figura 3.20	Diagrama de barras de la actividad lignino peroxidásica para cada cepa fúngica.....	59
Figura 3.21	Fotografía de las cepas <i>Fusarium semitectum</i> (PPm Fs 2), <i>Fusarium oxysporum</i> (PPm Fs 1) y <i>Aspergillus flavus</i> (MPm Ap 1).....	61

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Hongos degradadores de material lignino-celulósico.....	2
Cuadro 2.1	Codificación de las cepas caracterizadas.....	23
Cuadro 3.1	Características macro y microscópicas de las tres cepas más eficientes.....	60

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A:	Codificación de las cepas caracterizadas.....	86
Anexo B:	Medios de cultivo.....	87
Anexo C:	Preparación de reactivos y Tampón de acetato de sodio.....	88
Anexo D:	Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	89
Anexo E:	Características microscópicas de las cepas fúngicas aisladas.....	91

RESUMEN

A partir de las cortezas de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*), se aislaron 57 cepas fúngicas, en PDA y MA. Se realizó una caracterización preliminar para determinar la familia, género o especie de estas cepas.

De las muestras aisladas, se obtuvieron 37 cepas consideradas puras, a las cuales se realizó una prueba celulolítica semi-cuantitativa, mediante el revelado de halos de hidrólisis con rojo congo, en medio agar carboximetilcelulosa al 1%. Las cepas del género *Trichoderma* presentaron los mayores diámetros de halos. Se cuantificó la capacidad celulolítica y ligninolítica de las 25 cepas que presentaron la formación de halos de hidrólisis.

La actividad carboximetilcelulasa y avicelasa de las cepas escogidas fue evaluada mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), para lo cual previamente los microorganismos fueron desarrollados en un caldo nutritivo que contenía 8% de azúcar morena, durante 31 h. La cepa *Fusarium-2* presentó la mayor actividad CMCasa con $183,08 \pm 14,77$ U/L_{ENZ}; mientras que, la cepa *Fusarium-1* presentó la mayor actividad avicelasa con $722,04 \pm 59,50$ U/L_{ENZ}. La actividad lignino peroxidásica se cuantificó mediante la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído por acción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en un caldo nutritivo que contenía 66,67 g/L de aserrín, durante 72 h. La cepa *Aspergillus-1* mostró la mayor actividad ligninolítica con $16,29 \pm 5,77$ U/L_{ENZ}.

Las tres cepas fúngicas de mayor actividad enzimática se identificaron y se caracterizaron macro y microscópicamente. La cepa *Fusarium-2* se identificó como *Fusarium semitectum*; un hongo blanco, con tintes color durazno; con conidióforos, que poseen ramas en fiálides cortas; y, con conidias septadas de $17,0$ a $28,0 \times 2,5$ a $4,0$ μm . La cepa *Fusarium-1* se identificó como *Fusarium oxysporum*; un hongo blanco, con tintes rosados; con microconidias abundantes, de forma variable, ovoide o elipsoidal, ligeramente curvadas de $5,0$ a $12,0 \times 2,2$ a $3,5$ μm y macroconidias septadas (3 a 5 septos fusiformes). La cepa *Aspergillus-1* se identificó como *Aspergillus flavus*; un hongo verde oliváceo a verde amarillento, con conidióforos hialinos; con vesículas globosas a subglobosas, de 25-45 μm de diámetro; con fiálides, que crecen de las vesículas o de la métula ($6,5$ a $10,0 \times 3,0$ a $5,0$ μm) y con conidias de $3,0$ a $6,0$ μm .

ABSTRACT

From the bark of Aliso (*Alnus acuminata*), Arrayán (*Myrcianthes hallii*) and Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*), 57 fungal strains were isolated in PDA and MA culture media. A preliminary characterization was carried out to determine family, genus or species. Of them, 37 strains were considered pure.

A semi-quantitative cellulolytic test was applied to purified samples, through the revealed halos of hydrolysis with Congo red, in agar medium with CMC 1%. *Trichoderma* strains presented the greatest halos diameters. Then, cellulolytic and ligninolytic activity on 25 strains was measured, those which presented the hydrolysis halos formation.

CMCase and Avicelase activity of active strains was evaluated using the technique of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The growth of fungal strains was conducted in a nutrient broth containing 8% of brown sugar, during 31 hours. *Fusarium-2* strain showed the highest CMCase activity (183.08 ± 14.77 U/L_{ENZ}). *Fusarium-1* strain presented the highest Avicelase activity (722.04 ± 59.50 U / L_{ENZ}). The ligninolytic activity was measured as lignin peroxidase activity by the veratryl alcohol oxidation to veratraldehyde, with hydrogen peroxide (H₂O₂) as co-substrate, in a nutrient broth with 66.67 g/L of sawdust, during 72 hours. Most enzyme activity was expressed by the *Aspergillus-1* strain (16.29 ± 5.77 U/L_{ENZ}).

The fungal strains with highest enzymatic activity were identified and characterized. The *Fusarium-2* strain was identified as *Fusarium semitectum*; a white fungus, orange tinged; with conidiophores, which have branches in short phialides; and, with septate conidias from 17.0 to 28.0×2.5 to 4.0 μm . The *Fusarium-1* strain was identified as *Fusarium oxysporum*; a white fungus, pink tinged; with abundant microconidias, with different shapes, ovoid or ellipsoidal, slightly curved of 5.0 to 12.0×2.2 to 3.5 μm and septate macroconidias (3-5 septa). The *Aspergillus-1* was identified as *Aspergillus flavus*; a green olive fungus to yellowish green one, with transparent conidiophores; with globolous to subglobolous vesicles, of 25-45 μm in diameter; with phialides, that grow from blisters or of the metulae (6.5 to 10.0×3.0 to 5.0 μm) and with conidia of 3.0 to 6.0 μm .

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

Actualmente, una gran cantidad de residuos orgánicos son producidos en el mundo entero como resultado de la actividad antropogénica. Los residuos orgánicos provienen principalmente de la industria alimenticia, florícola, ganadera, maderera y papelera (Diorio *et al.*, 2003; Gaitán y Pérez, 2007).

En el Ecuador, cada habitante produce un promedio diario de 0,54 kg de basura, esto significa que en el país se generarían 194.400 ton de desperdicios, cada mes (Torres, 2005). En Quito, se producen 1.550 ton diarias de basura, de las cuales se calcula que 30 provienen de los mercados (El Universo, 2007). A estos productos lignino-celulósicos, se deben añadir los desechos de instituciones, como los centros educativos, gubernamentales, militares, religiosos y de oficina donde, por lo general, se desechan a diario papeles, cartones, cartulinas; así como los subproductos de las industrias madereras y papeleras.

El uso de microorganismos potenciales degradadores de residuos lignino-celulósicos se convierte en la opción con mayor viabilidad para solucionar dicha problemática. Además, el procesamiento de los residuos orgánicos que, pueden considerarse como un material contaminante del ambiente, también constituyen una materia prima capaz de generar significativas cantidades de glucosa, producto básico de la industria química actual (Gaitán y Pérez, 2007).

En el presente trabajo, a escala de laboratorio, se plantea el aislamiento y la caracterización morfológica y enzimo-funcional de hongos lignino-celulolíticos, procedentes de la corteza de especies vegetales nativas de las faldas del volcán Pasochoa, que tendrían aplicaciones en la degradación de materiales lignino-celulósicos, por lo que las áreas de mayor influencia serían la ambiental e industrial.

1.2 Justificación

Durante varias décadas de investigación, se ha verificado que la descomposición de materiales lignino-celulósicos se produce, preferentemente, por la acción de hongos, que favorecen su putrefacción. Los hongos lignino-celulolíticos ya caracterizados pertenecen, casi en su totalidad, a los Basidiomycetes y a los hongos imperfectos, aunque existen excepciones con especies pertenecientes a los Ascomycetes. Los hongos que descomponen la celulosa segregan enzimas llamadas celulasas (Vilches, 2002).

A nivel mundial, se han realizado varias investigaciones sobre el aislamiento y la caracterización de hongos lignino-celulolíticos. Estos microorganismos generalmente se han usado para a) definir parámetros culturales (fuentes de carbono y nitrógeno), b) establecer los efectos de la temperatura y pH sobre la estabilidad de las enzimas celulolíticas, c) determinar la actividad de los componentes de los complejos celulolíticos, d) encontrar la eficiencia en la conversión de distintos materiales orgánicos vegetales (paja de trigo, algodón, avena, etc.) por enzimas celulolíticas, e) sacarificar sustratos celulósicos, f) caracterizar los efectos que tienen las condiciones de cultivo sobre la producción de las enzimas del complejo celulolítico, entre otras (Vilches, 2002).

Algunos de los hongos más utilizados e importantes en la degradación de material lignino-celulósico se encuentran en el cuadro 1.1

Cuadro 1.1 Hongos degradadores de material lignino-celulósico.

<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium lycopersici</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Fusarium lini</i>	<i>Xylaria regalis</i>

Fuente: Vilches, 2002

En general, se conoce que las principales enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa son (Wachinger *et al.*, 1989; Gaitán y Pérez, 2007):

- Endo- β -glucanasas ó 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4): rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria, en el interior de las moléculas de celulosa, producen nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble de la celulosa, como por ejemplo la carboximetilcelulosa (CMC).
- Exo- β -glucanasas ó 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91): atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores y liberan subunidades de celobiosa. No son muy activas frente a la celulosa cristalina, pero exhiben una acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas.
- β -glucosidasas o celobiasas (EC 3.2.1.21): hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa.

Se conoce que la degradación de la lignina se debe, en gran parte, a las lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, peroxidasa versátiles y lacasas como proteínas extracelulares, así como por el sistema enzimático intracelular citocromo P450. Este conjunto de enzimas es el responsable de producir mediadores para la oxidación de la lignina (Vázquez, 2004).

Las enzimas del sistema celulolítico tienen importancia en la degradación de residuos sólidos, lo que fue demostrado en el tratamiento de residuos de banana con *Trichoderma harzianum*, *Acrophialophora nainiana* y *Humicola grisea* (Medeiros *et al.*, 2000). Estas enzimas se han utilizado ampliamente en la industria textil, del papel y en la alimentaria (Diorio *et al.*, 2003).

Las Técnicas de fermentación en estado sólido (compostaje) son frecuentemente utilizadas en la reducción biológica de la masa de los residuos

lignino-celulósicos, estas son preferidas ante las fermentaciones en estado líquido por sus bajos costos y facilidad de manejo. (Awafo *et al.*, 1996). Sin embargo el principal inconveniente de estas técnicas está relacionado con los períodos de aplicación prolongados (de cuatro a diez meses), mediante el empleo de biorreactores aeróbicos se ha intentado reducirlos, sin resultados efectivos (Atkinson *et al.*, 1997).

La aplicación de enzimas purificadas es otra alternativa empleada en la reducción de residuos y/o su pre-tratamiento. Estos procesos involucran tiempos de incubación de unos pocos días, sin embargo, poseen costos muy elevados (Diorio *et al.*, 2003).

En el año 2003, en la Universidad de Buenos Aires, se analizó la capacidad de degradación de residuos orgánicos sólidos de *Saccobolus saccoboloides*, un hongo Ascomycete, filamentoso, con una importante capacidad celulolítica, en medio sintético líquido y 24 °C de temperatura; pero, todavía no ha sido estudiado desde el punto de vista biotecnológico. Es un habitante normal del estiércol de herbívoros, responsable de reciclar esos residuos celulósicos (Diorio *et al.*, 2003).

Estos microorganismos, que degradarían la basura y desechos orgánicos con gran facilidad, permitirían el aprovechamiento de toneladas de materiales que actualmente en el país constituyen un problema de grandes magnitudes para los gobiernos seccionales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar morfológica y enzimo-funcionalmente, a escala de laboratorio, tres cepas eficientes de hongos lignino-celulolíticos procedentes de las cortezas de los árboles de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) presentes en manchas de bosque nativo del Pasochoa.

1.3.2 Objetivos específicos

- Recolectar las muestras de las cortezas de los árboles de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) presentes en manchas de bosque nativo del volcán Pasochoa.
- Desarrollar, propagar y aislar las cepas lignino-celulolíticas fúngicas nativas a partir de las cortezas.
- Evaluar la capacidad lignino-celulolítica de las cepas fúngicas encontradas.
- Seleccionar tres cepas eficientes en la capacidad lignino-celulolítica y caracterizarlas morfológicamente.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Hongos lignino-celulolíticos

Los hongos son simples organismos que utilizan la madera como fuente de alimento. Se mueven a través de la madera como una red microscópica que al crecer penetra la pared celular de la madera. Las hifas producen las enzimas que degradan la celulosa, hemicelulosa, o lignina que absorbe el material degradado para terminar el proceso de desintegración (Vaca, 1998).

Una vez que el hongo obtiene suficiente energía de la madera, produce un cuerpo fructífero sexual o asexual para distribuir las esporas reproductivas que pueden invadir otras maderas (Zaid, 2004). Los cuerpos fructíferos varían de las esporas unicelulares producidas al final de las hifas para elaborar cuerpos fructíferos perennes que producen millones de esporas. Estas esporas son transportadas por el viento, los insectos y otros medios, que pueden ser encontrados en el mismo entorno.

Consecuentemente, todas las estructuras de madera están expuestas al ataque de los hongos, cuando la humedad, la temperatura, el oxígeno y el pH necesarios para su desarrollo, estén presentes (Vaca, 1998).

Los hongos lignino-celulolíticos pertenecen, casi en su totalidad, a los Basidiomycetes y a los hongos imperfectos; sin embargo, existen excepciones con

especies pertenecientes a los Ascomycetes (Vilches, 2002; Laura y Castellanos, 2009).

Los Basidiomycetes son una división del reino Fungi, que incluye a los hongos que producen basidios con basidiosporas. Contienen a las clásicas setas y hongos con sombrero (Blanco *et al.*, 2008). Los hongos imperfectos (fungi imperfecti), antiguamente llamados Deuteromycetes o Deuteromycotas, comprenden más de 15.000 especies diferentes que se clasifican juntas porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción. Los Ascomycetes comprenden aproximadamente 28.500 especies, su micelio es septado y producen ascas o ascos que son meiosporangios microscópicos unicelulares, que forman ascosporas, esporas de origen sexual (Pontón *et al.*, 2002).

Las especies más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo, otros géneros y especies de hongos, tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Phanerochaete* e, incluso, especies comestibles como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, también producen celulasas (Vilches, 2002; Castillo *et al.*, 2005).

Los microorganismos celulolíticos han sido de gran interés, desde el inicio de los estudios relacionados con la degradación de materiales lignino-celulolósicos. Stutzenberger *et al.*, en 1970, aisló tres cepas de hongos *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus sp.*, *Thermoactinomyces sp.*. Posteriormente, en 1982, Saddler trabajó con más de cien cepas de hongos pudridores de madera y comparó su capacidad para degradar bloques de madera mediante la evaluación de peso perdido debido a la degradación fúngica. Algunas de estas cepas, como: *Phanerochaete chrysosporium*, *Liberetella sp.*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma sp.*, entre otras, fueron ensayadas para determinar su actividad celulolítica extracelular.

De igual manera, otros investigadores han aislado cepas fúngicas para sus estudios; entre estos, se puede nombrar a Ceroni y Gutiérrez-Correa, en 1988, que estudiaron la cinética de producción de celulasas en seis hongos aislados a partir del suelo, *Gilmaniella sp.*, *Trichoderma glaucum*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium*

implicatum, *Penicillium spinolosum* y Sphaeropsidales; y, a Barbosa y de Queiroz, que en 1996 aislaron cuarenta y ocho hongos filamentosos, de los cuales *Aspergillus janus* var. *brevis* y *Penicillium bilaii* revelaron los mayores niveles enzimáticos; entre otros.

En América Latina, también se han desarrollado trabajos vinculados con la investigación de hongos celulolíticos. En el estudio de Castellanos *et al.* (1999, 2000) se aislaron hongos con propiedades celulolíticas de diferentes regiones del Perú, para lo cual se utilizó un medio mínimo de sales minerales Czapeck. Se obtuvieron 87 cepas de la provincia Huaylas, 61 cepas de Huaraz y 45 cepas de Tingo María. También, en la misma investigación, se trabajó con muestras de suelo de las provincias de Concepción y Satipo para el aislamiento, identificación y selección de hongos celulolíticos. Se lograron aislar 139 cepas, de las cuales se identificaron genéricamente 117 cepas. Entre los géneros que se aislaron estuvieron: *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium* y *Aspergillus* (Vilches, 2002).

En el Ecuador, se han encontrado escasos estudios significativos sobre hongos lignino-celulolíticos. Se destacan los trabajos de Uzcátegui, quien, en conjunto con investigadores de la Universidad de Uppsala, Suecia, encontró una glucano-hidrolasa y un sistema sinérgico de celobiohidrolasas obtenidas de *Phanerochaete chrysosporium*, homólogo al de *Trichoderma reesei*, así como una celobio oxidasa (Henriksson *et al.*, 1991; Uzcátegui *et al.*, 1991; Uzcátegui *et al.*, 1991).

Existen diferentes factores de los que depende la producción extracelular de celulasas microbianas, así por ejemplo se debe considerar el tamaño del inóculo, la fuente de carbono, el pH, la temperatura, la presencia de inductores y/o inhibidores, los aditivos del medio, el nivel de aireación y el tiempo de desarrollo. Debido a esto, se han realizado numerosas investigaciones para determinar la influencia que ejerce el medio, en el que se desarrollan los microorganismos celulolíticos, sobre la producción enzimática, por lo que se ha trabajado con diversas fuentes de carbono (CMC, Avicel, algodón), de nitrógeno (asparagina, urea, glicina) y surfactantes (Tween 80, Tergitol). De igual manera se ha variado el pH y la temperatura (Vilches, 2002).

Uno de los microorganismos más estudiados en la degradación de materiales lignino-celulósicos es el hongo *Trichoderma reesei*, un microorganismo que produce cuatro tipos de celulasas (1,4-beta-D-glucan celobiohidrolasas CBH I y CBH II, endo-1,4-beta-D-glucanasas EG I y EG II). Desde el punto de vista genético se han estudiado genes que codifican para las celulasas (cbh1, cbh2, egl1 y egl2), mediante sustitución por el marcador genético amds de *Aspergillus nidulans*. Estas investigaciones han sugerido que la CBH II y la EG II son las más importantes en la actividad enzimática de la celulosa, porque intervienen en la formación eficiente del inductor de estas en *Trichoderma reesei* y que la eliminación de ambas cadenas celobiohidrolasas (CBH II y EG II) impide que la enzima desdoble a la celulosa cristalina. Se ha observado que la celulosa microcristalina (10 g/L) es hidrolizada principalmente por dos de estas celulasas (CBH I y EG II) producidas por el hongo *Trichoderma reesei* (Sánchez, 2006).

En la degradación de la lignina, el hongo *Phanerochaete chrysosporium* ha demostrado gran eficiencia. *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo de la pudrición blanca que habita en el material putrefacto y es útil para la biorreparación. Esta especie pertenece a la familia de hongos que es la responsable de la putrefacción de la madera. La importancia de este hongo es que posee la capacidad de degradar la lignina en CO₂ y agua, sin embargo sus enzimas no son muy selectivas (Boyer, 2000). Entre las enzimas que produce este hongo se encuentra la lignino peroxidasa, capaz de oxidar y degradar moléculas de lignina (Vázquez, 2004).

1.4.2 Recolección de muestras, aislamiento y purificación de hongos

Cualquier parte de una especie vegetal (raíz, tallo, hojas o flores) puede ser útil para el aislamiento de hongos. La forma, tamaño y estado fisiológico de las partes de la especie vegetal, las condiciones de superficie y posición o exposición de la muestra sobre la planta o con el ecosistema podrían de forma parcial determinar las especies de hongos que se encontrarán (Icanaqué, 2010).

Para el aislamiento primario de los hongos, se pueden utilizar diversos medios de cultivo. Es importante seleccionar los medios en función del hongo que se sospeche y del tipo de muestra. Los medios más comúnmente empleados para el

aislamiento son el de agar dextrosa de sabouraud, papa dextrosa agar, malta agar y agar harina de maíz (Carrillo, 2003).

1.4.3 Actividad enzimática

Se conoce como actividad enzimática a la capacidad catalítica de una enzima cuando actúa sobre un determinado sustrato. Esta actividad se expresa en Unidades Internacionales (UI), donde UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto (Boyer, 2000; Villa, 2007).

La actividad de las enzimas puede verse afectada por a) la desnaturalización que implica una alteración de la estructura secundaria y terciaria de la proteína y puede evitarse al controlar el pH, la temperatura, la formación de espuma y el contacto con disolventes orgánicos; b) la inactivación del sitio catalítico que se puede dar por pérdida de los cofactores y de grupos protéticos dissociables y, c) por la proteólisis que se produce por acción de las proteasa (Villa, 2007).

Una de las técnicas más utilizadas para la determinación de la actividad enzimática es la espectrofotométrica, método de análisis óptico. Se utiliza el espectrofotómetro, instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución, preparada con una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Chávez *et al.*, 1990; Villa, 2007).

1.4.3.1 Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

Diferentes procedimientos han sido utilizados para identificar a los microorganismos capaces de degradar celulosa, estos se basan en la hidrólisis de sustratos celulósicos (Gaitán y Pérez, 2007).

Los medios líquidos que contienen celulosa permiten evaluar, de manera cualitativa y cuantitativa, a los microorganismos degradadores; no obstante, los medios sólidos han sido más utilizados, a pesar de que en estos las colonias microbianas que utilizan el sustrato son difíciles de diferenciar de otros que no lo

hacen, por tal motivo Teather y Wood, en 1982, realizaron estudios en los que se observó que el uso de rojo congo podía demostrar la hidrólisis de polisacáridos, ya que el colorante forma complejos con las moléculas no hidrolizadas.

De esta manera, por la formación de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias se pudo distinguir entre los microorganismos celulolíticos y no celulolíticos (Hendricks *et al.*, 1995; Gaitán y Pérez, 2007).

1.4.3.2 Determinación cuantitativa de la actividad lignino-celulolítica

1.4.3.2.1 Actividad celulolítica

La celulosa puede ser convertida a glucosa mediante la hidrólisis ácida o por un proceso enzimático. La estructura de la celulosa cristalina es resistente al ácido, por lo que la temperatura y las concentraciones de ácido necesarias para lograr la hidrólisis también causan la descomposición de los azúcares resultantes (Spano *et al.*, 1975). Por su parte, la hidrólisis enzimática necesita una serie de enzimas como endo-1,4 β -D-glucanasas, 1,4 β -D-glucano-celobiohidrolasas y β -glucosidasas, las cuales pueden ser expresadas, bajo condiciones específicas por algunos microorganismos (Caja *et al.*, 2003).

La hidrólisis de la celulosa con el uso de las enzimas se ha demostrado como un proceso más conveniente, para la obtención de glucosa, un carbohidrato que posee un grupo aldehído terminal, que le confiere características reductoras; dicha propiedad fue utilizada por Sumner, en 1921, para desarrollar una técnica analítica cuantitativa de azúcares reductores (Pedroza *et al.*, 2007).

La actividad enzimática celulolítica puede medirse con la determinación de la cantidad de glucosa liberada, mediante el método del ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS). En este método el ácido 3,5-dinitro-salicílico es reducido a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico de color amarillo, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos. La densidad óptica (D.O) del color es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la solución (Miller, 1959; Gaitán y Pérez, 2007; Pedroza *et al.*, 2007).

La lectura de la D.O. en presencia del DNS puede verse influenciada y alterada por las mismas condiciones de la prueba, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción y el tiempo de preparación del reactivo (Gaitán y Pérez, 2007).

1.4.3.2.2 Actividad lignino peroxidásica

Se conoce que la degradación de la lignina es catalizada por un complejo extracelular que producen algunos hongos, cuando han sido expuestos a condiciones de limitación de nutrientes en el medio de cultivo. Entre los componentes de este complejo se observan a las enzimas lignino (LiP, E.C. 1.11.1.14) y manganeso (MnP, E.C. 1.11.1.13) peroxidásicas y una enzima generadora de glioxal oxidasa (GLOX, E.C. 1.2.3.5) (Córdoba, 2009).

La enzima lignino peroxidásica (LiP) fue la primera en descubrirse, es oxidada por H₂O₂ y, al igual que otras peroxidadas contiene un grupo hemo-férrico, genera un intermediario deficiente de electrones, el cual regresa a su estado de oxidación inicial mediante oxidaciones posteriores (Quintero *et al.*, 2006; Moreno y Ospina, 2008). A diferencia de otras oxidoreductasas, la lignino peroxidasa posee un pH óptimo menor/igual a 3 y un alto potencial reductor.

La actividad lignino peroxidásica se determina por la oxidación del alcohol 3,4-dimetoxibencílico (alcohol veratrílico) a veratraldehído y es cuantificada por espectrofotometría a 330 nm. El coeficiente de extinción a absorbancia 330 nm es $\epsilon_{330} = 1.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Villa, 2007).

1.4.4 Caracterización morfológica de hongos

Hasta el año 2006, se habían descrito ya unas 100.000 especies de hongos, aunque la diversidad global no ha sido totalmente catalogada por los taxónomos (Mueller y Schmith, 2007). La micología, especialidad que estudia a los hongos, ha empleado diversas características para configurar el concepto de especie.

La clasificación morfológica, basada en aspectos como el tamaño y forma de las estructuras de fructificación y las esporas, ha sido predominante en la taxonomía tradicional. También se han empleado características bioquímicas y fisiológicas, como por ejemplo la reacción ante determinados metabolitos y métodos de taxonomía molecular, como el uso de marcadores moleculares y análisis filogenéticos que han permitido aumentar la discriminación entre variantes genéticas; lo que ha aumentado la resolución a la hora de separar especies (Hibbett *et al.*, 2007).

1.4.4.1 Morfología macroscópica

Las características físicas de las colonias son de gran ayuda en la identificación. Cada microorganismo crece de manera diferente, forman colonias de distinto color, forma, tamaño, textura, olor y brillo (Val, 2002). La textura de los hongos puede ser a) algodonosa: micelio denso y largo; b) de consistencia cérea (micelio no aéreo); c) aterciopelada: micelio aéreo corto y, d) pulverulenta: gran cantidad de esporas y conidias (Sánchez, 2007). El tiempo de incubación necesario para que aparezcan las colonias también puede tener valor en la identificación.

1.4.4.2 Morfología microscópica

En el caso de los hongos, la heterogeneidad estructural es grande, por esta razón la morfología microscópica constituye un arma potente de identificación. Las características a considerar dentro de esta identificación son: a) el tipo de hifa, estructura cilíndrica y delgada de 2 a 10 micrómetros de diámetro y hasta varios centímetros de longitud (Harris, 2008); b) la posición del o los esporóforos; c) la presencia de esporangióforo o conidióforo; d) la forma, tamaño y distribución de las esporas; e) la presencia o no de rizoides, que únicamente se presentan en hifas no septadas; y, f) pruebas de identificación bioquímica.

Existen diferentes técnicas para determinar estas características; sin embargo, son dos las más utilizadas para el microscopio:

- a) Técnica con cinta adherente y azul de lactofenol: consiste en colocar un pedazo de la cinta sobre la parte superior del hongo e inmediatamente ponerlo sobre un portaobjetos donde previamente se haya colocado una gota de azul de lactofenol.
- b) Examen de fragmentos de colonias al microscopio: para esta técnica se rompen los conidios y las esporas. Con un asa se corta un fragmento de la colonia y se deposita sobre un portaobjetos, que previamente contenga una gota de azul de lactofenol o KOH (Sánchez, 2007).

1.4.5 Volcán Pasochoa

En el volcán Pasochoa existe uno de los últimos remanentes de bosque andino, posee todavía flora y fauna características de este entorno (Jijón y Pazmiño, 1990). El volcán Pasochoa está ubicado en el sureste de la hoya de Guayllabamba, tiene una extensión de 500 hectáreas (1235 acres) (Ecuadoronline, 1999).

El interés sobre este bosque ha sido tal que se han realizado numerosas investigaciones científicas, especialmente las que tienen que ver con la ecología del bosque andino y con la avifauna, cuya abundancia y diversidad son uno de sus aspectos más destacados.

Gracias a estos estudios se han podido identificar más de 132 aves residentes en la zona, muchas de las cuales ya no existen en otras partes de la Hoya de Guayllabamba. Además, los estudios botánicos han permitido conocer e identificar a numerosas plantas con usos medicinales tradicionales, que forman parte de una cultura nativa, hoy un tanto perdida (Ministerio del Ambiente, 2009).

En cuanto a la flora, el bosque del Pasochoa ha sido la fuente principal de muchos estudios que buscan descifrar la composición vegetal de los ecosistemas originales, que cubrieron los Andes. En este sentido, árboles como el pumamaqui, el polylepis, el laurel y la palma de ramos han sido de interés científico (Ecuadoronline, 1999).

La hacienda El Suro, al igual que las haciendas de San Antonio y Rumipamba, forman parte de la parroquia rural de Rumipamba. La superficie total de la parroquia es de 36,72 km² y está formada por microcuencas. La geografía de la zona es muy desigual. La flora de la zona está compuesta por bosques de altura, vegetación de páramos y pastizales. Está cubierto por bosques siempre verdes, que varían sus características de acuerdo con la altura (Ministerio del Ambiente, 2009).

1.4.6 Aliso (*Alnus acuminata*)

El aliso es un árbol que crece con rapidez. Es utilizado para proteger cuencas, afirmar taludes, recuperar zonas quebradas y fijar nitrógeno. Su madera es liviana, se usa para construir muebles y utensilios. Crece en altitudes comprendidas entre 1500 y 4000 m s.n.m. (León y Ayala, 2007). En la figura 1.1, se observa una fotografía de las ramas de un árbol de la especie vegetal aliso.



Figura 1.1 Aliso (*Alnus acuminata*)

Fuente: Ulloa y Møller, 2008

1.4.7 Arrayán (*Myrcianthes hallii*)

El arrayán es un árbol nativo de los bosques andinos de Ecuador y Perú, que puede medir hasta 15 m, su crecimiento es lento. Sus hojas son utilizadas como condimento, principalmente en bebidas, por ejemplo en la colada morada. Sus frutos

son comestibles (Aguilar *et al.*, 2009). En la figura 1.2, se observa una fotografía de una rama de un árbol de la especie vegetal arrayán.



Figura 1.2 Arrayán (*Myrcianthes hallii*)

Fuente: Bustamante, 2010

1.4.8 Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*)

El pumamaqui es un árbol o arbusto que crece hasta los 10 m de alto, las hojas son alternas, de aproximadamente 15 cm, gruesas y de color verde olivo. Las flores son pequeñas, de color crema, con pelos gris-plateados y los frutos son redondos, de color negro. Generalmente, es usado en infusión como purga con un poco de licor. También se utiliza la planta entera como combustible y el tallo sirve para la construcción de viviendas, cercas, vigas, cucharas, bateas, entre otros (Aguilar *et al.*, 2009). En la figura 1.3, se observa una fotografía de la especie vegetal pumamaqui.



Figura 1.3 Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*)

Fuente: Aguilar *et al.*, 2009

1.4.9 Desechos sólidos orgánicos

Actualmente, la problemática ambiental es muy compleja de tratar; la principal preocupación de la humanidad está relacionada con el manejo, reciclaje, utilización y biorremediación de la basura.

En el año 2004, se producían en el mundo, unos 1.600 millones de toneladas, por año, de residuos sólidos; los que, además de generar problemas ambientales, estaban involucrados en problemas económicos relacionados, principalmente, con los costos de recolección, transporte y disposición final, que cada vez son mayores (Cardona *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Sauri y Castillo, en el 2002, se menciona que se ha desarrollado una jerarquía para el manejo de residuos sólidos, la cual ubica en la parte superior, la reducción de la fuente. En segundo lugar, se encuentra el reciclaje y, en la parte inferior, se habla de la disposición final que abarca al relleno sanitario, en el que se encuentran principalmente los residuos no reciclados ni tratados.

También se menciona, en el mismo estudio, que en México existe una generación anual nacional de 97'149.919 toneladas de residuos sólidos municipales. De estos residuos el 27,6% corresponden a residuos de alimentos y el 15% a residuos de jardinería. Debido a estos datos se puede asegurar que 41'385.865,5 ton/año son materiales orgánicos lo que en porcentaje corresponde a un 42,6% (Sauri y Castillo, 2002).

Cardona *et al.*, en el 2004, con cifras tomadas del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, afirman que en Colombia se produce en un día 27.300 toneladas de basura. De estas, el 65% corresponde a residuos orgánicos y el 35% a residuos inorgánicos. La fracción orgánica de basura colombiana está compuesta en su mayor parte por residuos de alimentos, papel, cartón, madera y residuos de jardín.

En el año 2005, en nuestro país se generaban en promedio 194.400 toneladas de desperdicios cada mes (Torres, 2005). De la basura producida en Quito, se calcula que 30 toneladas provienen de los mercados (El Universo, 2007) Datos de la ciudad de Otavalo revelan que por año se producen 9.855 toneladas métricas de basura, que son depositadas principalmente en quebradas, ríos y vías. La basura está compuesta casi en su totalidad de materia orgánica (71,4%) y de papel y cartón (10,5%) (CODELSPA, 2008).

Estudios relacionados con la degradación de compuestos orgánicos han demostrado que algunos microorganismos poseen la capacidad de catabolizar moléculas recalcitrantes, con este potencial sería posible degradar ciertos sistemas ambientales contaminados (Cardona *et al.*, 2004).

En la década de 1950, se inició una serie de investigaciones relacionadas con el empleo de las enzimas celulolíticas, que han servido de base para aplicaciones de interés industrial y ambiental (Vilches, 2002). En 1970, se utilizaron hongos para la descomposición de material orgánico, como se describe en el trabajo de Stutzenberger *et al.*, en el cual se investigaron microorganismos con actividad celulolítica durante el compostaje de residuos municipales sólidos.

1.5 Hipótesis

De la corteza de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) presentes en manchas de bosque nativo del Paschoa, se pueden aislar y caracterizar morfológica y enzimo-funcionalmente hongos lignino-celulolíticos.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

En esta investigación participaron, como directora, la Bs. Karina Ponce y, como codirectora, la Ing. Mariela Vera, docentes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE. Como biometrista participó el Ing. Pedro Romero, docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

Se contó también con la participación de Alma Koch MC., docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE; del Ing. Abraham Oleas MC., docente de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, ESPE; del Ing. Patricio Castillo MC. Ph. D. Subdecano de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional e Ing. Neyda Espín MC. Jefa del Laboratorio de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, como colaboradores científicos.

2.2 Zona de estudio

La recolección de las muestras vegetales aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) se efectuó en manchas de bosque nativo en la zona del Suro del volcán Pasochoa, ubicado al sureste de la hoya de Guayllabamba, cantón Mejía, provincia de Pichincha, a 0° 26' 0" (Sur) y 78° 29' 0" (Oeste) (GeoHack, 2010).

La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, ubicadas en la ciudad de Quito, cantón Quito, provincia de Pichincha; mientras que la caracterización morfológica preliminar y final se realizaron en el Laboratorio de Nematología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA) de la Escuela Politécnica del Ejército, en la hacienda El Prado (ESPE, 2010).

2.3 Procedimientos

La metodología fue dividida en dos fases. La fase de campo correspondió a la recolección de las cortezas de las especies vegetales; y, la de laboratorio, que abarcó el aislamiento, las resiembras y purificaciones de las cepas, la evaluación cualitativa y cuantitativa de la capacidad lignino-celulolítica y la caracterización morfológica de las tres cepas más eficientes.

2.3.1 Fase de Campo

Identificadas, dentro de la zona de recolección, las tres especies vegetales nativas del Ecuador (aliso, arrayán y pumamaqui), se tomaron de manera aleatoria pedazos de las cortezas de los tallos de diez árboles, de cada una de las especies.

Los pedazos de cortezas fueron recolectados manualmente, con ayuda de herramientas de jardinería, y depositados en fundas de papel etiquetadas.

Las fundas con las cortezas fueron llevadas al laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional y mantenidas a temperatura ambiente, hasta ser procesadas.

En la figura 2.1, se observa la recolección de la corteza del tallo de aliso.



Figura 2.1 Corteza de la especie vegetal aliso

2.3.2 Fase de laboratorio

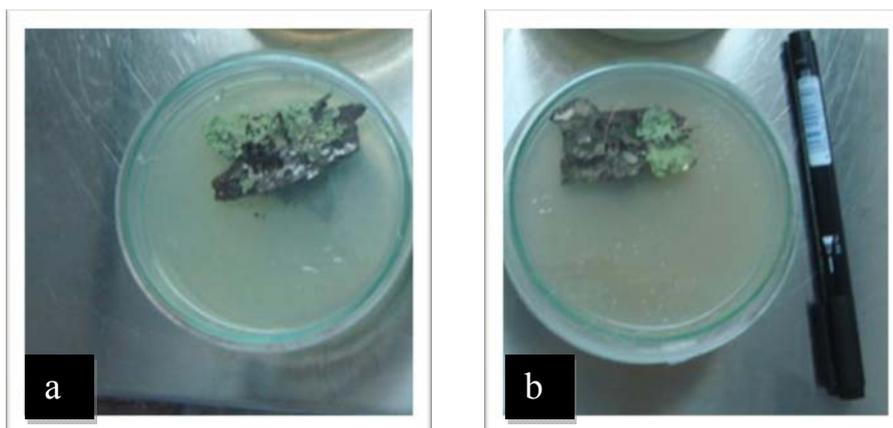
2.3.2.1 Aislamiento, resiembra y conservación de cepas lignino-celulolíticas

Con un bisturí estéril, se cortó un pedazo de aproximadamente 8×3 cm de cada una de las cortezas.

Para la siembra primaria se colocó, de manera superficial, cada uno de los pedazos de corteza sobre dos medios de cultivo sólidos papa dextrosa agar (PDA marca MERCK) y malta agar (MA marca DIFCO). Las cajas petri, al igual que los medios de cultivo, fueron esterilizados en una autoclave marca New Brunswick, modelo AE15-10, a 121 °C, durante 20 min.

Las cajas fueron codificadas según cada una de las especies vegetales e incubadas, a 30 °C, por 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una subcodificación por colores de cada uno de los microorganismos, que se visualizaron, en cada caja.

La figura 2.2 indica una de las cortezas sembradas en los dos medios de cultivo ensayados.



**Figura 2.2 a) Siembra de una corteza vegetal en medio de cultivo PDA y
b) Siembra en medio MA**

Posteriormente se prosiguió a realizar resiembras de purificación.

2.3.2.1.1 Resiembras de purificación

A partir de los microorganismos obtenidos en el aislamiento primario, se tomó, con ayuda de un sacabocado, un pedazo de micelio de cada hongo y se lo sembró en medio de cultivo sólido y estéril de PDA o MA, según correspondiera (Carrillo, 2003). En las figura 2.3 se muestran las resiembras de purificación.

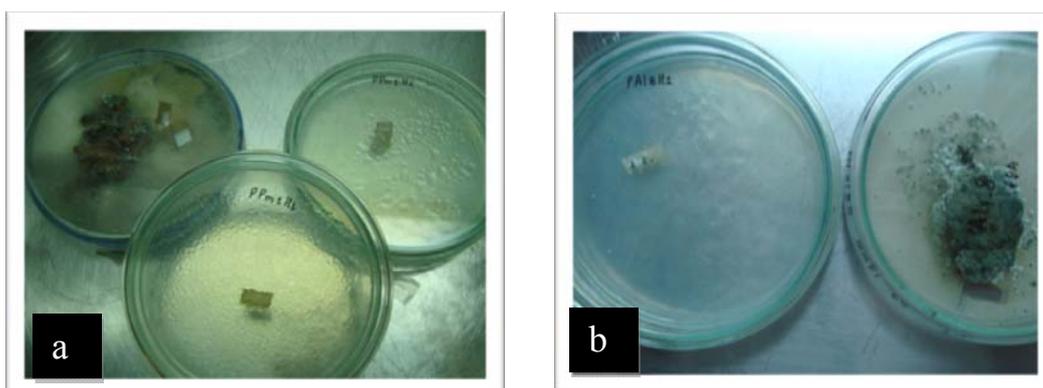


Figura 2.3 a) Resiembra de purificación de una cepa proveniente de la corteza de pumamaqui y b) Resiembra de purificación de una cepa obtenida de la corteza de aliso

Las cajas fueron incubadas a 30 °C, por 72 h. Una vez pasado este tiempo, se observó el crecimiento de los hongos, si la caja presentaba crecimiento homogéneo en cuanto a forma y color fue colocada en la refrigeradora a 5 °C.

Si, por el contrario, el crecimiento no era homogéneo se continuaba con el mismo procedimiento de resiembra anteriormente mencionado, las veces que fueran necesarias hasta obtener cepas puras.

2.3.2.1.2 Caracterización preliminar

Con la ayuda del Ing. Abraham Oleas, docente de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, ESPE, se identificaron las principales características macroscópicas y microscópicas de la mayoría de los hongos. Además, se estableció la familia o género de los mismos, con base en el Manual de hongos del suelo de Gilman (1957) y la ilustración de géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1972).

Para establecer la morfología microscópica de las cepas, con un asa, se realizó un raspado sobre la superficie del cultivo de cada uno de los hongos. Se realizó un frotis en un portaobjetos donde previamente se colocaron dos gotas de KOH 0,1 M, a continuación se observó bajo el microscopio en los lentes de 10x, 40x y 100x y se escribieron las características del micelio y de las esporas para determinar la familia o género del hongo (Sánchez, 2007).

En algunos casos, en los que se observó que los microorganismos no estaban desarrollados por completo, fue necesario dejarlos bajo luz durante dos semanas y después realizar nuevamente la técnica para la caracterización.

Sin embargo, al encontrar que algunas cepas, ya identificadas en su género, se mantenían contaminadas a pesar de las cuatro resiembras aplicadas, se utilizó la técnica basada en realizar diluciones sucesivas (Stainer *et al.*, 2005).

Para las diluciones fue necesario esterilizar portaobjetos y tubos con agua destilada. En el portaobjetos se colocaron cinco gotas del agua destilada con una jeringuilla. A continuación, con un asa estéril se raspó la superficie del hongo y se frotó sobre cada una de las gotas en el portaobjetos, la última gota fue vista bajo el microscopio para verificar que la población del microorganismo fuese en su mayoría la del género de hongo que se deseaba purificar. Una vez verificado esto, se tomó una muestra de esta última gota y se realizó una siembra en zigzag en un medio nutritivo pobre, de harina de maíz. Las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 48 h.

A los dos días, se observaron nuevamente las cajas bajo microscopio. Al encontrarse puras, se procedió a la siembra en tubos con medio PDA inclinado, para su conservación. Los tubos se incubaron a 30 °C, durante 72 h.

Finalizada esta caracterización, se codificaron las cepas en función de la división, familia o género, de cuyos nombres se tomaron las letras iniciales y junto a ellas se colocaron números para distinguirlas. Además se añadió la letra inicial del medio de cultivo en el que las cepas se desarrollaron y las iniciales de la especie

vegetal de la que provenían. A modo de ejemplo, en el cuadro 2.1 se indican algunos códigos establecidos. En el anexo A se encuentra la tabla completa.

Cuadro 2.1 Codificación de las cepas caracterizadas

Codificación	Descripción
MPm Vt	Cepa del género <i>Verticillium</i> , proveniente de la especie pumamaqui y desarrollada en medio MA.
PPm Fs 1	Cepa del género <i>Fusarium</i> , proveniente de la especie pumamaqui y desarrollada en medio PDA.
MAI As	Cepa de división Ascomycete, proveniente de la especie aliso y desarrollada en medio MA.
MAr Tc 3	Cepa del género <i>Trichoderma</i> , proveniente de la especie arrayán y desarrollada en medio MA.

2.3.2.1.3 Conservación del cepario

Al obtener todas las cepas puras y para su mejor conservación se prosiguió a replicar cada uno de los microorganismos en tubos de agar inclinado, en medio PDA o MA, según correspondiera. Los tubos fueron incubados a 30 °C, por 72 h. Una vez que los microorganismos crecieron, se colocaron los tubos en la refrigeradora a 5 °C. Las siembras se realizaron por triplicado.

En la figura 2.4 se observa el desarrollo de las cepas conservadas.



Figura 2.4 Conservación en tubos con agar inclinado de una cepa del género *Aspergillus*

2.3.2.2 Evaluación de la actividad enzimática

2.3.2.2.1 Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

A partir de los tubos de réplica, con un asa de punta, se realizó una siembra en punción, en agar carboximetilcelulosa (CMC marca HIMEDIA). En el Anexo B se describe la preparación del medio de cultivo. Las cajas fueron incubadas a 30 °C, por 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una tinción con la adición de 5 mL de rojo congo al 1%, como revelador. Se dejó actuar el colorante durante 15 min, se retiró el exceso y se lavó con 5 mL de una solución de NaCl 2 M, durante 15 min. La preparación del rojo congo y de la solución salina se encuentra en el Anexo C. Finalmente, se cerraron las cajas con parafilm y se llevó a refrigeración durante 12 h (Gaitán y Pérez, 2007; Valencia, 2009).

Después de las 12 h, la actividad celulolítica se determinó por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) debido a la hidrólisis de la celulosa, la que fue medida en centímetros, con un calibrador marca Drion.

Con las cepas que arrojaron resultados positivos en esta prueba, se realizaron los ensayos cuantitativos.

2.3.2.2.2 Actividad celulolítica

Para determinar la capacidad celulolítica de las cepas, se midió la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) y avicelasa. En los dos casos, se utilizó la misma técnica del ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), propuesta por Miller en 1959 y adaptada por Pedroza *et al.*, en el 2007, en cuanto a las concentraciones utilizadas para el ensayo, debido a que después de la degradación de la celulosa, se obtienen azúcares reductores. La metodología se aplicó a todas las cepas y se realizó por triplicado, luego de un tiempo apropiado de expresión enzimática.

Con el propósito de encontrar el tiempo adecuado para evaluar la expresión significativa de las enzimas secretadas por los hongos celulolíticos en estudio, se evaluó la cinética de expresión enzimática de una de las cepas

pertenecientes al género *Trichoderma*, que presentó el mayor diámetro de halo de hidrólisis.

A partir de un tubo de réplica de la cepa *Trichoderma*, se sembró el hongo en tres matraces de 250 mL, previamente esterilizados. Se colocó 60 mL de caldo nutritivo, que fue esterilizado por filtración al vacío con una bomba de vacío, marca ACR Source, modelo AVP501, y membranas de poro de 0,45 micrómetros. La preparación del caldo nutritivo se observa en el Anexo B.

Los matraces fueron llevados a incubación, a 30 °C. La actividad fue medida a las 24, 31, 48 y 96 h. Para cada una de las horas, se sacaron de todos los matraces 8.000 µL de extracto enzimático.

Para el caso de actividad CMCasa, se colocaron en tubos de ensayo 1.000 µL de solución al 1% de sustrato CMC, en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH=5 y 1.000 µL de extracto enzimático; mientras que, en el caso de la actividad avicelasa se colocaron en los tubos 1.000 µL de suspensión al 1% de sustrato avicel, en tampón de acetato de sodio 50 mM a pH=5 y 1.000 µL de extracto enzimático. Los tubos fueron mantenidos a baño maría, a 50 °C, por 30 min. La preparación del tampón de acetato de sodio y de la solución y suspensión, se describe en el Anexo C (Pedroza *et al.*, 2007).

Transcurrido este tiempo, los tubos se enfriaron en un recipiente que contenía agua con hielo, durante 5 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 5.000 rpm, durante 10 min. Después, se recuperó el sobrenadante para los ensayos de la cuantificación de la actividad celulolítica.

En el sobrenadante se determinó la concentración de azúcares reductores, para lo cual en tubos, previamente envueltos con papel aluminio, se colocaron 250 µL de la muestra (sustrato + enzima) y 250 µL del reactivo-DNS. Luego, los tubos fueron llevados a ebullición, durante 5 min. Pasado este tiempo, fueron sumergidos, rápidamente, en un baño de hielo, durante 5 min, para frenar la reacción. A continuación, se adicionaron 2.500 µL de agua destilada, en cada tubo.

Para preparar los blancos, se utilizaron 125 μL de solución de sustrato CMC o avicel, según correspondiera, 125 μL de extracto enzimático, colocados antes de que los tubos sean llevados a ebullición y 250 μL del reactivo-DNS. Los volúmenes requeridos se tomaron con una micropipeta marca Oxford, volumen de 100 – 1000 μL .

Finalmente, se procedió a leer la D.O. de las soluciones a 540 nm, en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic, modelo Genesys 20. Se utilizaron celdas de volumen reducido de marca Fisherbrand®, de 1 cm de paso.

Para cuantificar los azúcares reductores producidos por la actividad celulolítica, se realizó una curva patrón con soluciones de 0,5 a 2,0 g/L de glucosa. Las soluciones se prepararon a partir de una solución madre de glucosa de concentración 2g/L. En el Anexo D se describe la preparación de las soluciones y se muestra la curva patrón utilizada para la investigación.

Después de terminar la cinética de expresión enzimática de la cepa de *Trichoderma*, se aplicó el mismo procedimiento a todas las cepas, a un tiempo de 31 h. Excepto para las dos cepas de *Aspergillus* aisladas, que por su rápida expresión enzimática, fue necesario realizar la cinética particular y cuantificar la actividad solamente a las 6 h.

Una unidad (U) de actividad celulolítica se definió como 1 μmol de glucosa liberada por minuto a las condiciones del ensayo (Pedroza *et al.*, 2007).

2.3.2.2.3 Actividad lignino peroxidásica

Para determinar la capacidad ligninolítica, se midió la actividad lignino peroxidásica de las cepas, con la metodología propuesta por Tien y Kirk (1984) y adaptado por Villa (2007), en cuanto a las concentraciones de alcohol veratrílico y H_2O_2 . Todo el procedimiento se realizó por triplicado.

Se sembraron los hongos en matraces de Erlenmeyer de 250 mL, autoclavados con 4,0 g de aserrín. Posteriormente, se agregaron 60 mL de caldo

nutritivo, el mismo que fue previamente esterilizado por filtración al vacío. Los matraces fueron llevados a incubación a 30 °C, por 72 h. Transcurrido este tiempo, se extrajeron 5.000 µL de extracto enzimático de cada matraz.

En tubos de ensayo, se colocaron 9,6 mL de tampón de tartrato de sodio 0,1 M a pH=3, 250 µL de extracto enzimático, 100 µL de Tween 80, 15 µL de alcohol veratrílico 2 mM y 20 µL de peróxido de hidrógeno 4 mM, para iniciar la reacción enzimática. De esta manera se obtuvo un volumen total de 10 mL (Tien y Kirk, 1984 y Villa, 2007).

Posteriormente, los tubos fueron mantenidos a baño maría a 30 °C, por 1 h. Después fueron enfriados en agua con hielo e inmediatamente se leyó la absorbancia a 330 nm.

Para preparar el blanco, se colocaron 9,62 mL de tampón de tartrato de sodio 0,1 M a pH=3, 250 µL de extracto enzimático, 100 µL de Tween 80 y 15 µL de alcohol veratrílico 2 mM. Los volúmenes fueron tomados con micropipetas marca Oxford, volumen de 100 – 1000 µL y marca Accumax, volumen de 10 – 100 µL.

La actividad enzimática lignino peroxidásica, se calculó a partir de las lecturas de la D.O.₃₃₀ mediante la siguiente ecuación adaptada de Betancourt (2001) y de Granda (2009):

$$AE = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{1.000 \times (V_T)}{\epsilon \times L \times (V_{ENZ})} \quad [\text{EC. 2.1}]$$

Donde:

AE: Actividad enzimática en unidades internacionales por litro de disolución de enzima (U/L_{ENZ}).

ΔDO: Diferencia de la densidad óptica.

Δt: Tiempo de la reacción de hidrólisis (minutos).

V_T: Volumen total de la solución (mL).

V_{ENZ}: Volumen de la solución de enzima usada (mL).

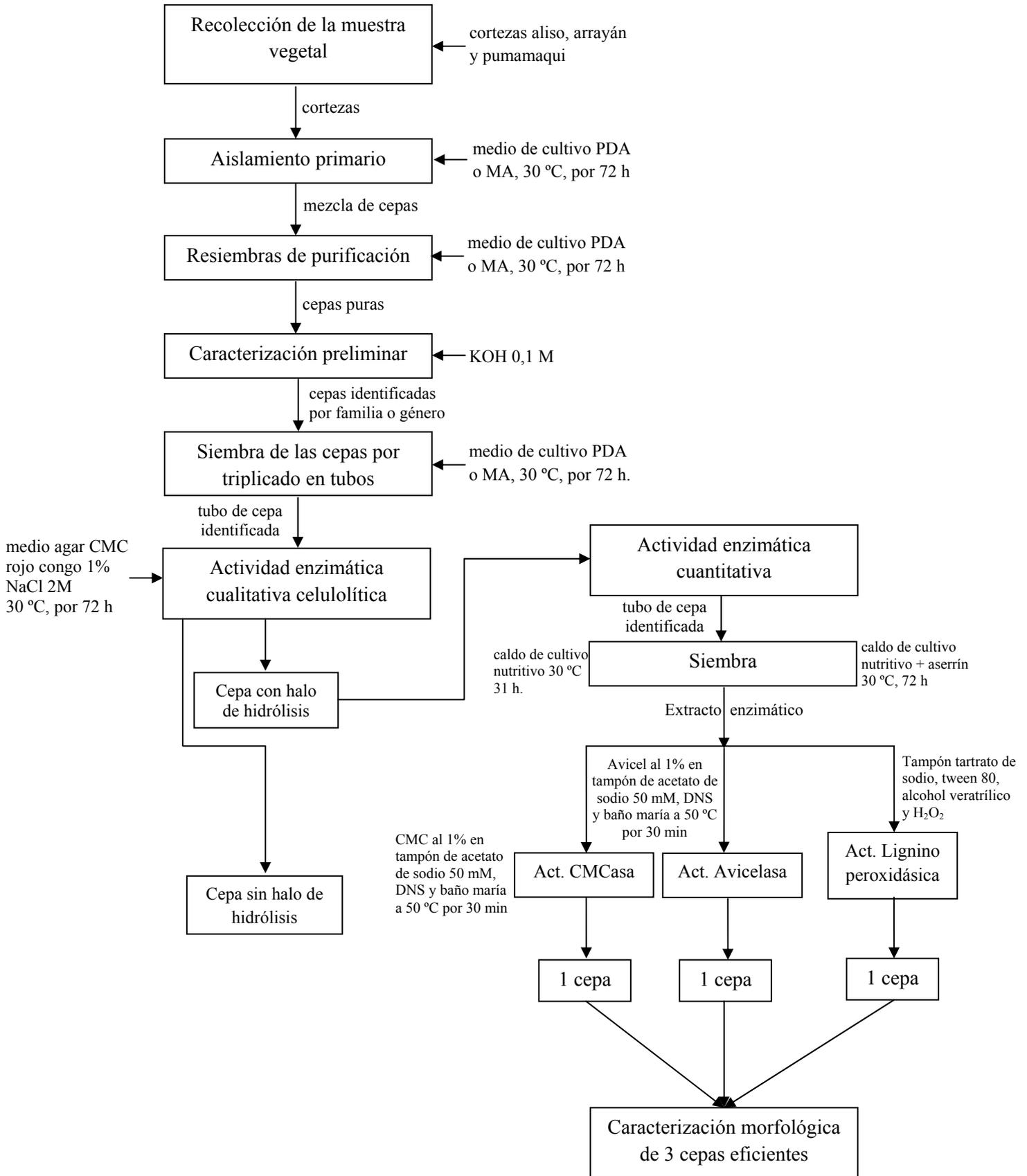
- ϵ : Coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{330}=1,9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para alcohol veratrílico) (Villa, 2007)
- L: Longitud de la celda (cm)
- 1.000: Factor de conversión de μL a mL.

Una unidad (U) de actividad lignino peroxidásica se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de alcohol veratrílico, por minuto, a pH=3 y a 30 °C.

2.3.2.3 Caracterización morfológica de tres cepas eficientes

La caracterización morfológica macro y microscópica de la cepa con mayor eficiencia en cada una de las actividades enzimáticas a evaluarse, fue realizada con la colaboración de la Lic. Verónica Luna, del laboratorio DISerLAB de la Pontificia Universidad Católica, de acuerdo con una técnica basada en el desarrollo de los microorganismos en medio papa dextrosa agar (PDA), durante 5 días, seguida de la observación bajo el microscopio.

Diagrama de flujo del proceso



2.4 Tiempo de investigación

Este proyecto de investigación se inició en marzo del 2010 y finalizó en octubre 2010.

2.5 Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) unifactorial (Mendenhall y Sincich, 1997; Gutiérrez y de la Vara, 2008), con tres repeticiones. La variable independiente estuvo constituida por las cepas fúngicas aisladas, durante la investigación. Mientras que las variables dependientes fueron el diámetro del halo de hidrólisis y las actividades enzimáticas CMCasa, avicelasa y lignino peroxidásica.

2.6 Análisis de datos

El análisis de los resultados y la discusión se realizó mediante el método analítico-sintético.

Para evaluar el efecto individual y en conjunto de las variables, que presentó este estudio, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y para identificar las diferencias estadísticamente significativas, entre las variables establecidas se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey, al 95% de confianza (Martínez de Lejarza, 2004).

Los resultados fueron procesados en los programas estadísticos Excel, Windows vista 2007 y SPSS versión 15.0. 2006.

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Aislamiento, purificación y caracterización preliminar de cepas ligninolíticas

Durante la fase preliminar de esta investigación, se aislaron 57 cepas de hongos, a partir de las cortezas de las tres especies vegetales, recolectadas en las faldas del volcán Pasochoa. En la Tabla 3.1, se indican la frecuencia y el porcentaje de hongos desarrollados en los dos medios de cultivo de crecimiento empleados para el estudio.

Tabla 3.1 Frecuencia y porcentaje de hongos desarrollados según los medios de cultivo

Medio de cultivo	Frecuencia	Porcentaje
Malta agar	38	66,7
Papa dextrosa agar	19	33,3
Total	57	100,0

Como se observa, los microorganismos crecieron de forma preferencial en el medio malta agar. Según el análisis estadístico de la frecuencia de los medios de cultivo, el 67% de los microorganismos aislados crecieron en medio malta agar (MA), mientras que el 33% crecieron en medio papa dextrosa agar (PDA).

En la Tabla 3.2, se muestran la frecuencia y el porcentaje de los hongos aislados en el medio de MA, codificados según la especie vegetal de la cual procedieron: aliso; arrayán y pumamaqui. Estas siglas se utilizaron para identificar a los hongos, según su procedencia, durante toda esta investigación.

De los 38 hongos, que crecieron en el medio de cultivo MA, 23 hongos fueron aislados de la especie vegetal pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*), 11 de aliso (*Alnus acuminata*) y 4 de arrayán (*Myrcianthes hallii*).

Tabla 3.2 Frecuencia y porcentaje de las especies fúngicas aisladas en medio

MA

Especie vegetal	Frecuencia	Porcentaje
Aliso	11	28,9
Arrayán	4	10,5
Pumamaqui	23	60,5
Total	38	100,0

Mientras que, en la Tabla 3.3, se presenta la frecuencia y el porcentaje de hongos que se desarrollaron en el medio PDA, según la especie vegetal de procedencia, como se indicó para el medio MA.

Tabla 3.3 Frecuencia y porcentaje de las especies fúngicas aisladas en medio

PDA

Especie vegetal	Frecuencia	Porcentaje
Aliso	7	36,8
Arrayán	6	31,6
Pumamaqui	6	31,6
Total	19	100,0

De los 19 hongos que se desarrollaron en el medio PDA, 7 procedieron de las cortezas de aliso, 6 de arrayán y 6 de pumamaqui.

En la tabla 3.4, se muestran las frecuencias y el porcentaje con que las especies vegetales aportaron cepas fúngicas.

Tabla 3.4 Frecuencia y porcentaje de las especies vegetales

Especie vegetal	Frecuencia	Porcentaje
Aliso	18	31,6
Arrayán	10	17,5
Pumamaqui	29	50,9
Total	57	100,0

Estos resultados se relacionan con el total de las 57 cepas obtenidas, a partir de los dos medios de cultivo empleados. La especie vegetal pumamaqui aportó con el 50,9%; la especie vegetal aliso, con el 31,6%; y, finalmente, la especie vegetal

arrayán con el 17,5%. A partir de dicha frecuencia estadística, se determinó que de la especie vegetal pumamaqui se obtuvo la mayoría de microorganismos aislados.

En la figura 3.1 y 3.2, se indican dos fotografías, la primera del crecimiento de hongos a partir de la corteza de la especie vegetal arrayán, del árbol #3 sembrada en los dos medios de cultivo. La segunda del crecimiento de hongos procedentes de una corteza de aliso, del árbol #10 sembrada en medio MA.



Figura 3.1 a) Hongos de la corteza vegetal de arrayán sembrada en medio PDA. b) Hongos de la corteza de arrayán sembrada en medio MA



Figura 3.2 Hongos de la corteza, de aliso, sembrada en medio PDA

Para la obtención de estas cepas viables, se realizaron resiembras de purificación. En la tabla 3.5 se indica, de manera global, la frecuencia y porcentaje de las resiembras que se realizaron a las 57 cepas, durante la investigación.

Tabla 3.5 Frecuencia y porcentaje del número de las resiembras de purificación

Resiembras		Frecuencia	Porcentaje
H1	0	23	40,4
H2	1	19	33,3
H3	2	14	24,6
H4	3	1	1,8
Total		57	100,0

De las 57 cepas encontradas 23 cepas (H1) no fueron resembradas, 19 cepas (H2) fueron resembradas por una ocasión, 14 cepas (H3) fueron resembradas por dos ocasiones y tan solo 1 cepa (H4) se resembró por tres ocasiones.

En el figura 3.3, se indican una fotografía de la resiembra de purificación de una cepa proveniente de la especie vegetal aliso, del árbol #1 sembrada en medio PDA y en la figura 3.4 se muestra una fotografía de una cepa obtenida pura a partir de la corteza de pumamaqui, árbol #8.



Figura 3.3 Primera resiembra de purificación, cepa procedente de la corteza de la especie vegetal pumamaqui, árbol #8

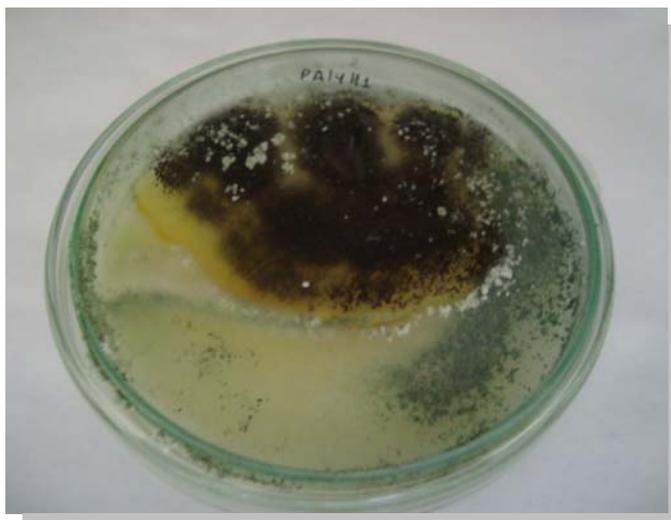


Figura 3.4 Primera resiembra de purificación, mezcla de dos cepas procedentes de la corteza de la especie aliso, árbol #4

A continuación, en las tablas 3.6 y 3.7 se observa la frecuencia y el porcentaje del número de resiembras realizadas, según el medio de cultivo en el que los hongos fueron sembrados MA o PDA.

Tabla 3.6 Frecuencia y porcentaje del número de resiembras realizadas en medio MA

Resiembras		Frecuencia	Porcentaje
H1	0	19	50,0
H2	1	10	26,3
H3	2	9	23,7
Total		38	100,0

El 50% de las cepas aisladas de MA se obtuvieron puras desde el aislamiento primario (H1), el 26% de las cepas fueron resembradas por una ocasión (H2) y al 24% de las cepas fue necesario resembrar por dos ocasiones (H3).

En el caso de los microorganismos aislados en medio PDA, se encontró que fue necesario realizar más veces las resiembras de purificación. El 21,1% no fueron resembradas (H1), el 47,4% fueron resembradas por una ocasión (H2), el 26,3% fueron resembradas por dos ocasiones (H3) y únicamente el 5,3% de las cepas fueron resembradas por tres ocasiones (H4).

Tabla 3.7 Frecuencia y porcentaje del número de resiembras realizadas en medio PDA

Resiembras		Frecuencia	Porcentaje
H1	0	4	21,1
H2	1	9	47,4
H3	2	5	26,3
H4	3	1	5,3
Total		19	100,0

Se obtuvieron 57 cepas como resultado de las resiembras realizadas, se determinaron las características macro y microscópicas y, en consecuencia, la familia o el género, de 37 cepas. Las 20 cepas restantes no se pudieron purificar, por lo cual fue imposible identificarlas.

En la figura 3.5, se observan dos fotografías que muestran la morfología macro y microscópica de una cepa.

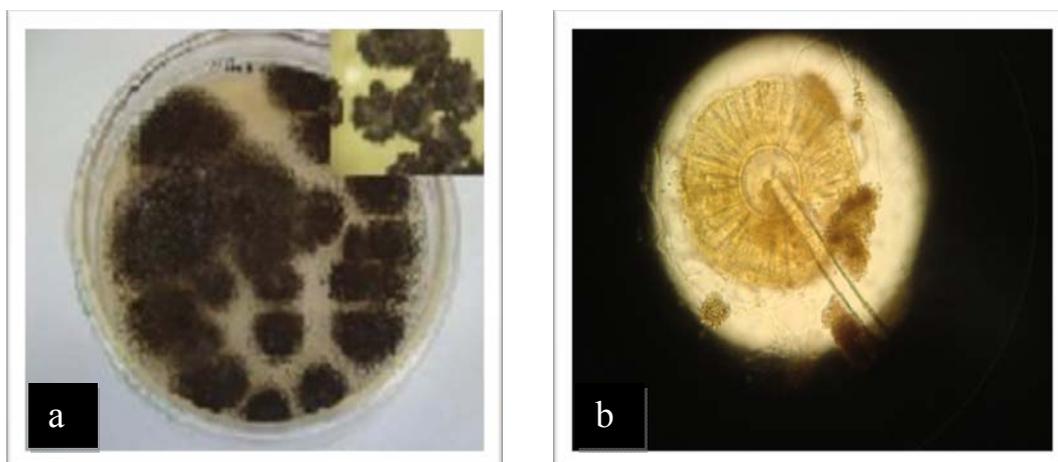


Figura 3.5 Izquierda, a) Visión macroscópica y derecha, b) Visión microscópica de una cepa del género *Aspergillus*

A continuación, en la tabla 3.8, se indican las características microscópicas de algunas de las cepas. En el Anexo E, se encuentra la tabla completa.

Tabla 3.8 Características microscópicas

Código	Familia o Género	Características microscópicas
MPm Fm	<i>Fusarium</i>	Micelio septado, rico en clamidósfora intermicelial y terminal. No presencia de macroconidia. Esporas bicelulares pequeñas.
PAI Ap	<i>Aspergillus</i>	Conidióforo liso, cabeza conidial café, parte sexual Ascomycete.
PAr Tt	<i>Trichothecium</i>	Desarrollo apical, conidióforos que se ramifican, conidias bicelulares.
PAI Sd	<i>Sordaria</i>	Micelio muy septado con constricción a la altura de las septas, hifas oscuras, cuerpo infértil.

En la tabla 3.9, se indica la frecuencia y el porcentaje de las divisiones o géneros de las cepas que fueron purificadas.

Entre los géneros, que poseen mayor frecuencia, se encontraron *Trichoderma* con 12 veces, *Fusarium* con 10 veces y *Aspergillus* con 6 veces. La familia Zygomycete presentó una frecuencia de 3 veces. Los valores de frecuencia más bajos los presentan los géneros *Trichothecium*, *Verticillium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Sordaria* y la familia Ascomycete con una vez.

Tabla 3.9 Familias o géneros de las cepas purificadas

División o género del hongo	Frecuencia	Porcentaje
<i>Trichoderma</i>	12	32,4
<i>Fusarium</i>	10	27,0
<i>Aspergillus</i>	6	16,2
<i>Trichothecium</i>	1	2,7
<i>Verticillium</i>	1	2,7
Zygomycete	3	8,1
<i>Diplodia</i>	1	2,7
<i>Drechslera</i>	1	2,7
<i>Sordaria</i>	1	2,7
Ascomycete	1	2,7
Total	37	100,0

En la figura 3.6 se muestra, en porcentaje, la incidencia de cada uno de los géneros y las divisiones de las cepas fúngicas encontradas durante esta investigación.

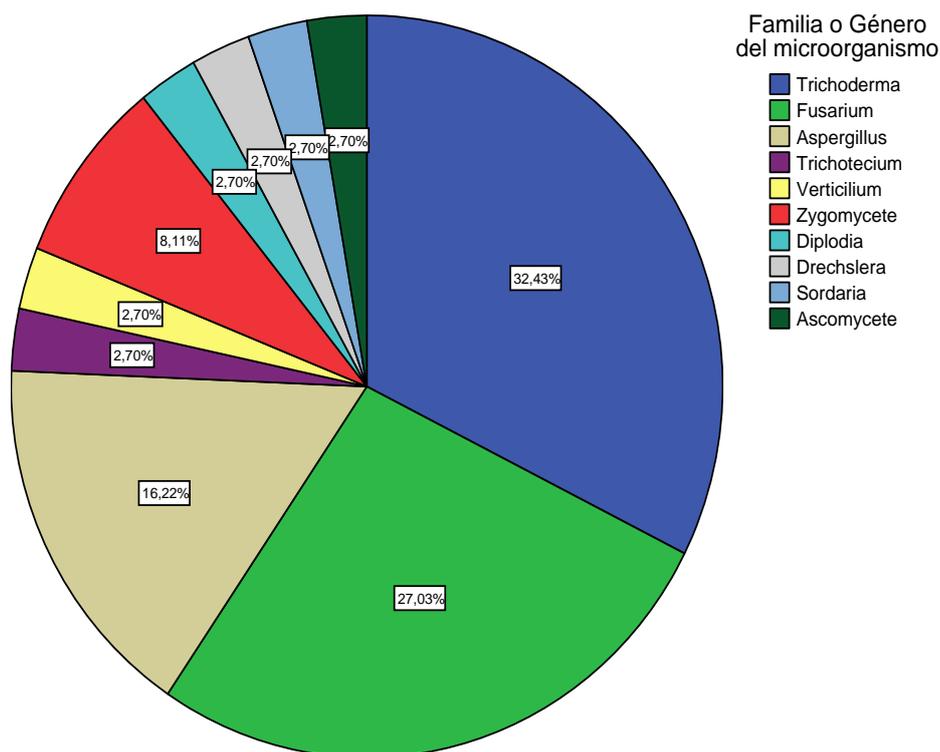


Figura 3.6 Porcentajes de la incidencia de los géneros y las divisiones de las cepas fúngicas purificadas

De las cepas analizadas, se encontró que el 32,43% pertenecen al género *Trichoderma*, el 27,03% al género *Fusarium*, el 16,22% al género *Aspergillus*, el 8,11% a la familia Zygomycete. El 16,21% restante corresponde a las especies de los géneros *Trichotecium*, *Verticillium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Sordaria* y la familia Ascomycete.

3.2 Evaluación de la actividad enzimática

3.2.1 Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

Como se indicó en la sección 2.3.2.2.1, en las 37 cepas puras se determinó la actividad enzimática cualitativa, mediante la medición de los diámetros de los halos de hidrólisis, finalizada la siembra en agar CMC al 1% y transcurridas las 72 h de incubación.

En las figuras 3.7 y 3.8, se muestran fotografías de la formación de halos de hidrólisis de dos cepas fúngicas, sembradas en agar CMC al 1% y reveladas con rojo congo.

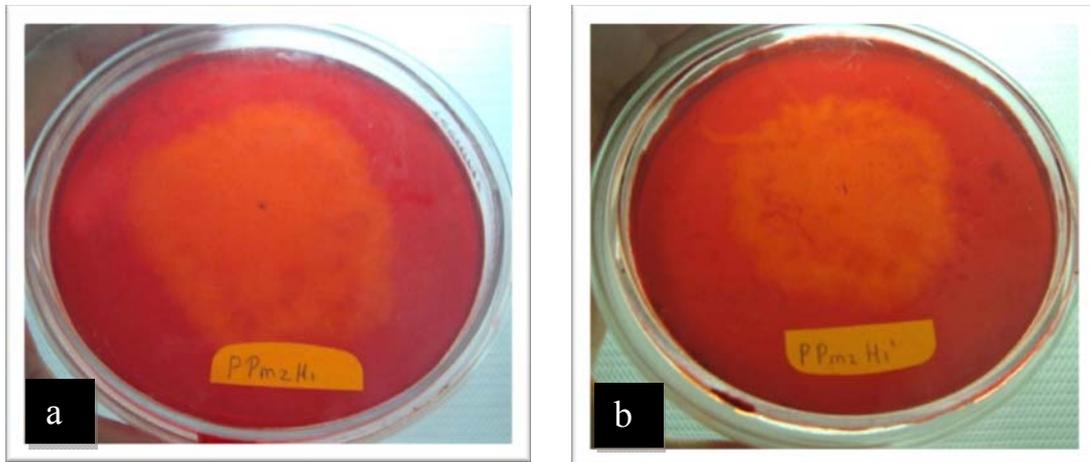


Figura 3.7 a) Resultados de la actividad enzimática cualitativa positiva de una cepa de *Trichoderma* a las 72 h de incubación y b) Verificación del resultado de la actividad enzimática de la misma cepa

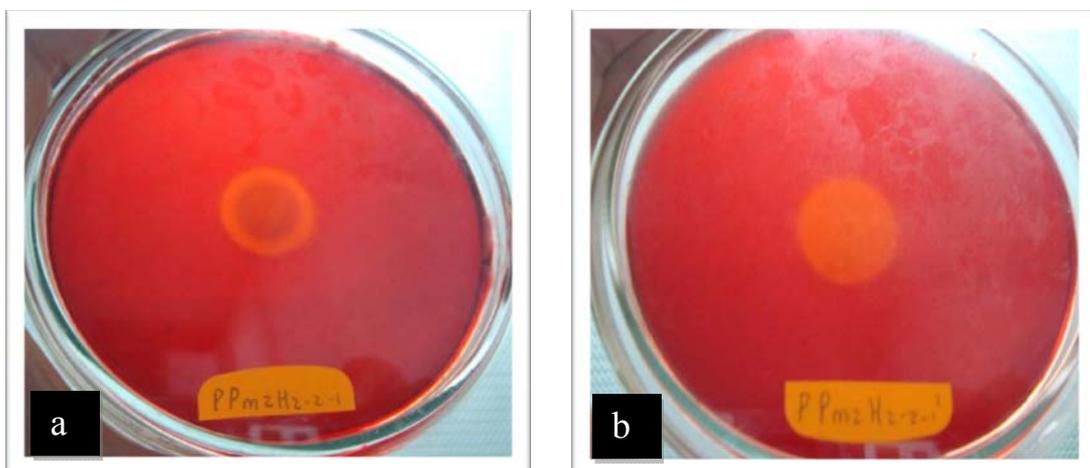


Figura 3.8 a) Resultados de la actividad enzimática cualitativa positiva de una cepa de *Fusarium* a las 72 h de incubación y b) Verificación del resultado de la actividad enzimática de la misma cepa

La figura 3.10 muestra dos fotografías de una cepa de *Aspergillus*, sembrada en agar CMC al 1% y revelada con rojo congo, donde no hubo aparición de halos de hidrólisis.

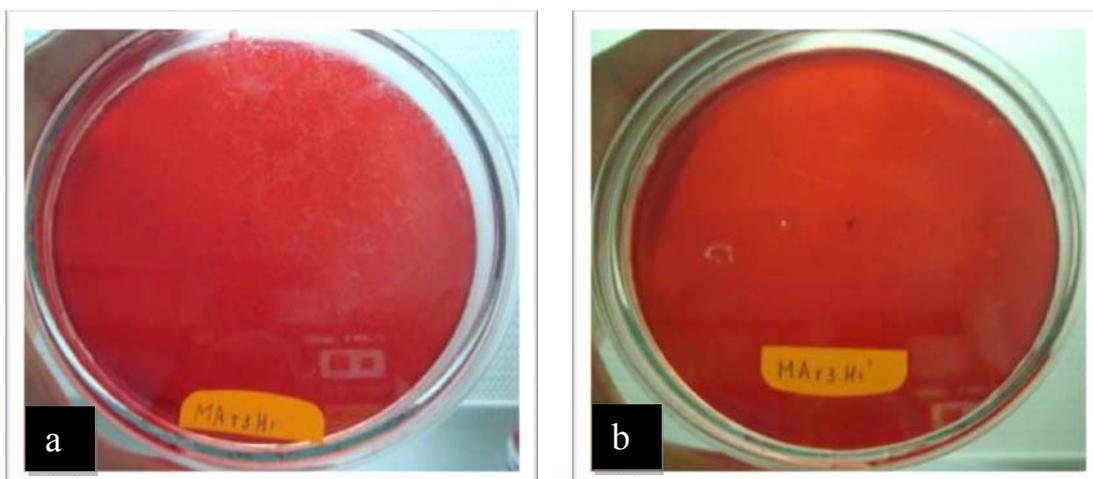


Figura 3.9 a) Resultados de la actividad enzimática cualitativa negativa de una cepa de *Aspergillus* a las 72 h de incubación y b) Verificación del resultado de la misma cepa

De las 37 cepas puras, únicamente los diámetros de los halos de hidrólisis de 22 cepas de resultado positivo se determinaron. De estas, 6 pertenecían al género *Trichoderma*, 10 al género *Fusarium*, 2 al género *Aspergillus*. De los géneros *Trichotecium*, *Verticillium* y *Diplodia* se analizó solo una cepa, al igual que de la familia Ascomycete. Las tres cepas de la familia Zygomycete presentaron halos de hidrólisis, sin embargo estos no pudieron ser cuantificados. Las cepas restantes no presentaron halos de hidrólisis.

La tabla 3.10 presenta los resultados obtenidos del ANOVA realizado para los diámetros de los halos de hidrólisis en dependencia de la cepa fúngica.

Tabla 3.10 Resultados del análisis de varianza (ANOVA)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Tratamientos	818,86	21	38,99	647,57	7,479E-139
Error	9,27	154	0,06		
Total	828,13	175			

El valor de $\rho < 0,05$ ($\rho = 7,479E-139$) indica que, en una o más cepas fúngicas, las medias de los diámetros de los halos de hidrólisis son significativamente diferentes. Debido a estas diferencias significativas encontradas, se realizó la prueba de Tukey. En la tabla 3.11, se muestran los subconjuntos

homogéneos formados para la variable cepa fúngica, según el tamaño del halo de hidrólisis.

Tabla 3.11 Subconjuntos homogéneos de las cepas fúngicas, según la prueba DHS de Tukey, para diámetros de los halos de hidrólisis (cm)

Cepa fúngica	N	Subconjunto para alfa = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PAr Tt	8	1,39									
MPm Ap 1	8	1,43									
MPm Ap 2	8	1,43									
MPm Vt	8	1,57	1,57								
MPm Fs 5	8	1,58	1,58								
MPm Fs 6	8	1,59	1,59								
MPm Fs 7	8	1,60	1,60								
PPm Fs 2	8	1,64	1,64	1,64							
MAI As	8		1,91	1,91	1,91						
PPm Fs 1	8			2,05	2,05						
MPm Fs 4	8				2,17	2,17					
MPm Fs 9	8				2,23	2,23					
MPm Fs 10	8				2,28	2,28					
MPm Fs 8	8					2,59	2,59				
MPm Fs 3	8						2,88				
MAI Tc 2	8							4,68			
PPm Tc 4	8								5,35		
MAr Tc 1	8								5,46		
MAr Tc 6	8									6,28	
PAI Dp	8									6,62	
MAr Tc 3	8										7,50
PAI Tc 5	8										7,92

En la tabla, se muestran 10 subconjuntos homogéneos, establecidos por el grado de similitud existente entre las medias de sus diámetros de halo. En el subgrupo 1 se encuentra el mayor número de cepas fúngicas (8), mientras que en el subgrupo 7 se encuentra el menor número de cepas (1). Algunas cepas se encuentran en dos grupos ya que estadísticamente no existe diferencia significativa en las medias de los tamaños de los halos de hidrólisis y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

Se observa además, que las cepas con mayor media de tamaño de halo de hidrólisis se encuentran en el subgrupo 10, estas cepas son *Trichoderma* 3 (MAr Tc 3) con un tamaño de halo de 7,50 cm y *Trichoderma* 5 (PAI Tc 5) con un

halo de 7,93 cm. Entre las medias de estas dos cepas no existe diferencia significativa, por lo que se unifican en el mismo subgrupo.

En la tabla 3.121 se observan los límites inferior y superior entre los que se encuentran las medias de los diámetros de los halos de hidrólisis, con el 95% de confianza.

Tabla 3.12 Intervalos generales de confianza, al 95%, de los diámetros de los halos de hidrólisis

Cepas fúngicas	Media (cm)	Error típico (cm)	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior (cm)	Límite superior (cm)
MPm Vt	1,57	0,04	1,47	1,66
PPm Fs 1	2,05	0,04	1,93	2,17
PPm Fs 2	1,64	0,02	1,59	1,68
MPm Ap 1	1,43	0,03	1,36	1,50
MPm Ap 2	1,43	0,02	1,38	1,48
MAr Tc 1	5,46	0,16	5,07	5,84
PAr Tt	1,39	0,04	1,30	1,49
MAI Tc 2	4,68	0,06	4,52	4,83
MAI As	1,91	0,03	1,83	1,99
MAr Tc 3	7,50	0,21	6,98	8,01
PPm Tc 4	5,35	0,14	5,00	5,69
PAI Tc 5	7,92	0,08	7,73	8,11
MPm Fs 3	2,88	0,01	2,86	2,89
MAr Tc 6	6,28	0,18	5,84	6,71
MPm Fs 4	2,17	0,09	1,95	2,39
PAI Dp	6,62	0,03	6,53	6,70
MPm Fs 5	1,58	0,03	1,50	1,65
MPm Fs 6	1,59	0,02	1,53	1,64
MPm Fs 7	1,60	0,01	1,57	1,63
MPm Fs 8	2,59	0,05	2,46	2,71
MPm Fs 9	2,23	0,03	2,16	2,30
MPm Fs 10	2,28	0,03	2,19	2,36

Los límites inferior y superior, con un nivel de confianza del 95%, para la cepa *Trichoderma* 5 (PAI Tc 5) que presenta el mayor diámetro de halo de hidrólisis

se encuentran entre $7,73 \leq \mu \leq 8,11$ cm. En el caso de la cepa *Trichothecium* (PAr Tt), que presenta el menor diámetro de halo, los límites están entre $1,30 \leq \mu \leq 1,49$ cm.

A continuación, en la figura el 3.10 se indican las medias del diámetro de los halos de hidrólisis con relación a las cepas fúngicas.

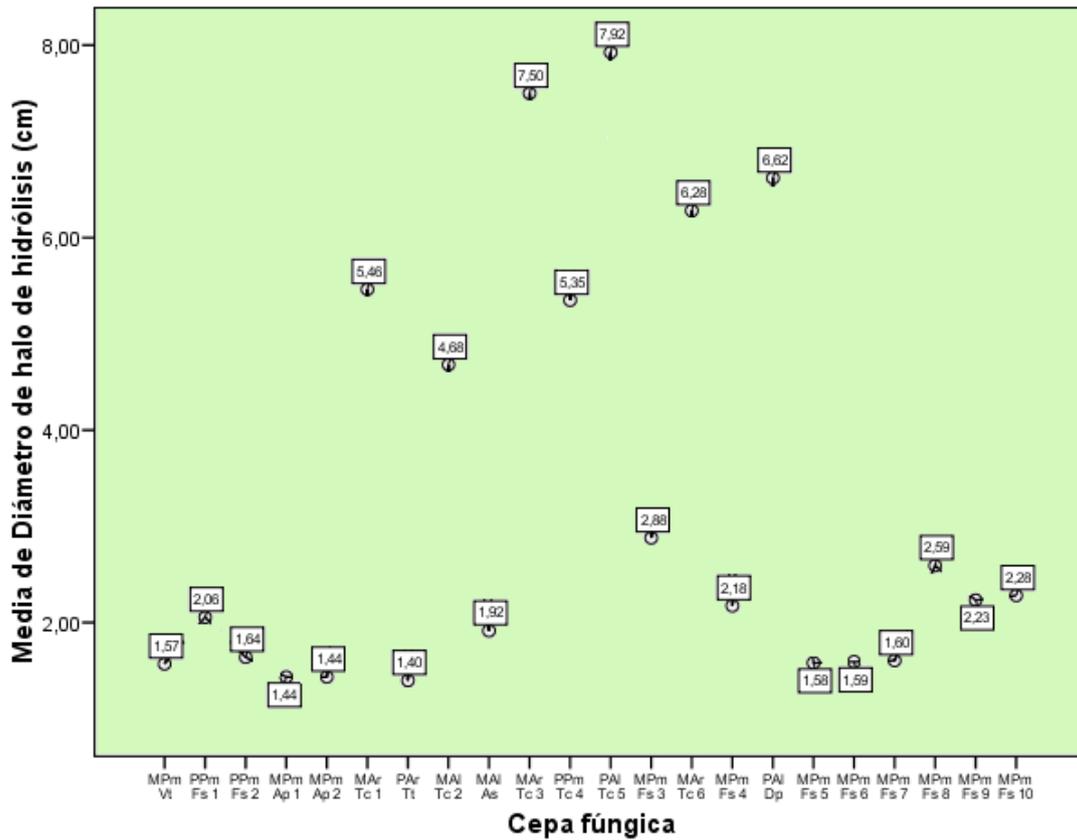


Figura 3.10 Medias del diámetro de los halos de hidrólisis en relación con las cepas fúngicas

En esta figura se confirma lo indicado por la prueba de subconjuntos homogéneos de Tukey. Las medias del diámetro de halo de hidrólisis son mayores en las cepas fúngicas *Trichoderma* 3 (MAr Tc 3) y *Trichoderma* 5 (PAI Tc 5).

En la figura 3.11, se presenta el diagrama de cajas de la variabilidad de los diámetros de los halos de hidrólisis, determinados con respecto a la cepa fúngica.

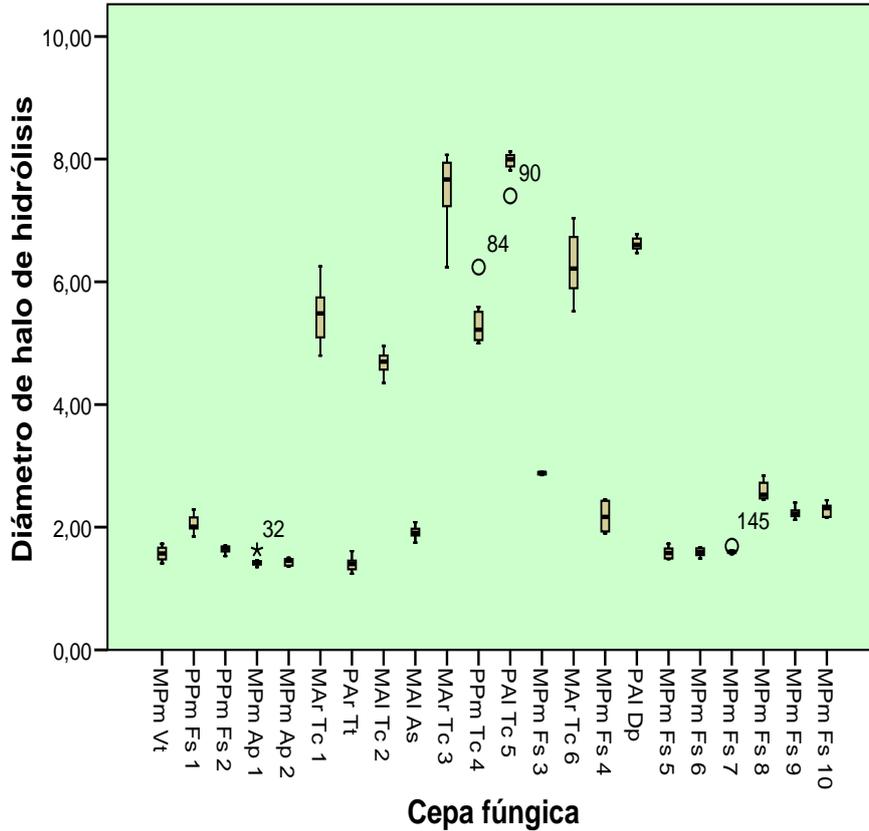


Figura 3.11 Variabilidad de los diámetros de los halos de hidrólisis por cepa fúngica

Con respecto a las dos cepas de mayor diámetro de halos de hidrólisis se observa, en la figura, que la cepa *Trichoderma* 5 tiene mejor simetría en la distribución de los datos; mientras que, la cepa *Trichoderma* 3 tiene más variabilidad en los datos que se consideraron para este análisis.

3.2.2 Actividad enzimática cuantitativa

3.2.2.1 Actividad CMCasa

En la tabla 3.13, se observan los resultados del ANOVA realizado para la actividad enzimática CMCasa.

Debido a que el valor de significancia $p = 3,342E-71$, se puede afirmar que la media de los valores de la actividad CMCasa es diferente para una o más cepas fúngicas. Por la presencia de estas diferencias en las tablas 3.14 y 3.15 se encuentran

los resultados de la prueba de Tukey, subconjuntos homogéneos e intervalos de confianza, al 95%, respectivamente.

Tabla 3.13 ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad CMCasa generados por las cepas fúngicas seleccionadas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Tratamientos	460261,02	24	19177,54	49,88	3,342E-71
Error	76893,55	200	384,46		
Total	537154,57	224			

Tabla 3.14 Subconjuntos homogéneos de cepas fúngicas, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad CMCasa (U/L_{ENZ})

Cepa fúngica	N	Subconjunto para alfa = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
MAI As	9	0,67						
MAI Zg 3	9	7,24	7,24					
MAr Tc 3	9	8,37	8,37					
MAI Zg 1	9	8,60	8,60					
MAI Zg 2	9	11,77	11,77	11,77				
MAI Tc 2	9	17,77	17,77	17,77	17,77			
MAr Tc 1	9	17,77	17,77	17,77	17,77			
MAr Tc 6	9	18,11	18,11	18,11	18,11			
MPm Ap 1	9	19,81	19,81	19,81	19,81			
MPm Fs 3	9	24,23	24,23	24,23	24,23	24,23		
MPm Fs 4	9	25,70	25,70	25,70	25,70	25,70		
PPm Tc 4	9	31,70	31,70	31,70	31,70	31,70		
MPm Fs 6	9		37,70	37,70	37,70	37,70		
MPm Vt	9		39,17	39,17	39,17	39,17		
MPm Fs 5	9		41,44	41,44	41,44	41,44		
MPm Ap 2	9			43,47	43,47	43,47		
PAr Tt	9			43,93	43,93	43,93		
PAI Tc 5	9				47,55	47,55		
PPm Fs 1	9					55,48		
MPm Fs 8	9						101,11	
MPm Fs 9	9						101,11	
MPm Fs 10	9						104,84	
MPm Fs 7	9						114,35	
PAI Dp	9						126,47	
PPm Fs 2	9							183,08

En el caso de las cepas fúngicas y su relación con las medias de los valores de la actividad CMCasa, se observa que según la similitud existente entre estas se han formado 7 subconjuntos. En el subgrupo 1 hay 12 cepas, entre estas se encuentra

la cepa de la división Ascomycete (MAI As) que posee la menor media con respecto a la actividad enzimática CMCasa. En el subgrupo 7 solo está la cepa *Fusarium 2* (PPm Fs 2), que es la que tiene la mayor media con respecto a la actividad enzimática (183,08 U/L_{ENZ}).

Tabla 3.15 Intervalos generales de confianza, al 95%

Cepa fúngica	Media (U/L _{ENZ})	Error típico (U/L _{ENZ})	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior (U/L _{ENZ})	Límite superior (U/L _{ENZ})
MPm Vt	39,17	2,96	32,34	46,00
PPm Fs 1	55,48	14,55	21,91	89,04
PPm Fs 2	183,08	14,77	149,00	217,16
MPm Ap 1	19,81	4,95	8,39	31,23
MPm Ap 2	43,47	6,42	28,65	58,29
MAr Tc 1	17,77	2,76	11,41	24,14
PAr Tt	43,93	4,97	32,47	55,39
MAI Tc 2	17,77	3,69	9,26	26,28
MAI As	0,67	0,56	0,61	1,97
MAr Tc 3	8,37	2,13	3,45	13,29
PPm Tc 4	31,70	5,15	19,80	43,59
PAI Tc 5	47,55	2,70	41,32	53,78
MPm Fs 3	24,23	5,13	12,38	36,07
MAr Tc 6	18,11	3,58	9,85	26,37
MPm Fs 4	25,70	1,99	21,10	30,29
PAI Dp	126,47	10,09	103,19	149,75
MPm Fs 5	41,44	8,63	21,53	61,34
MPm Fs 6	37,70	5,49	25,02	50,38
MPm Fs 7	114,35	5,60	101,42	127,28
MPm Fs 8	101,11	4,97	89,64	112,58
MPm Fs 9	101,11	7,14	84,63	117,59
MPm Fs 10	104,84	10,72	80,11	129,58
MAI Zg 1	8,60	1,95	4,10	13,10
MAI Zg 2	11,77	1,30	8,76	14,78
MAI Zg 3	7,24	0,80	5,39	9,10

Los límites encontrados para la cepa *Fusarium 2* (PPm Fs 2), que presenta la mayor actividad CMCasa están entre $149,00 \leq \mu \leq 217,16$ U/L_{ENZ}; mientras que, los límites para la cepa de la división Ascomycete (MAI As) que tiene la menor actividad, están entre $0,61 \leq \mu \leq 1,97$ U/L_{ENZ}.

En la figura 3.12 se observan las medias de los valores de la actividad CMCasa, en función de la cepa fúngica.

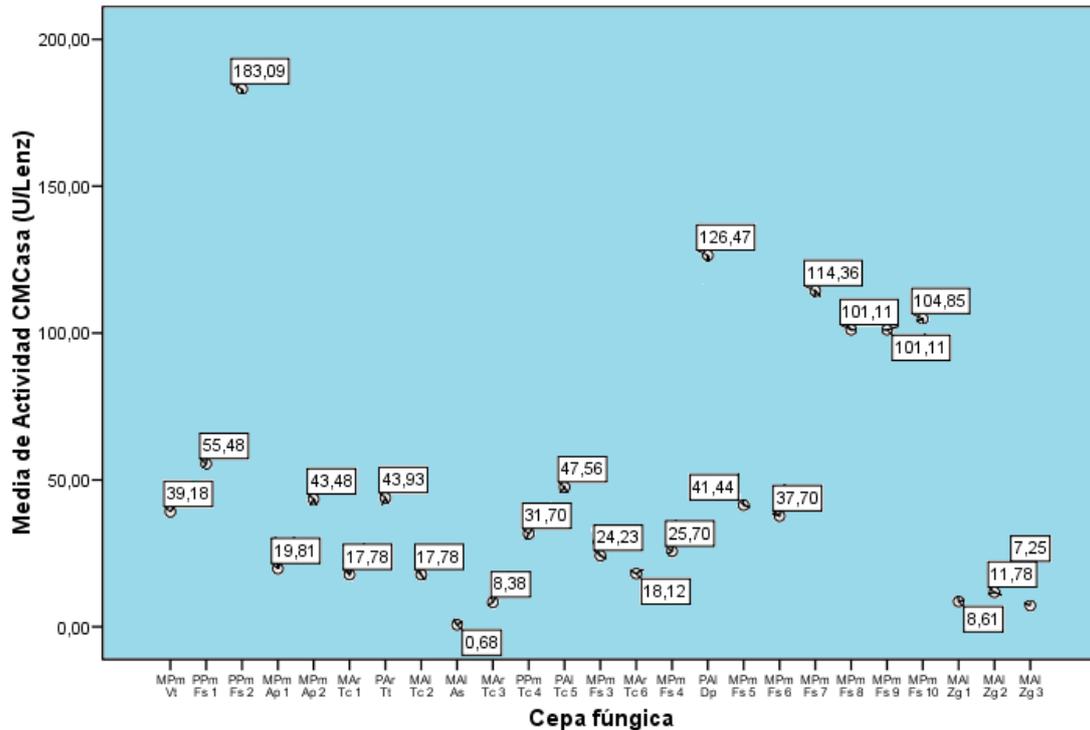


Figura 3.12 Medias de los valores de la actividad CMCasa en relación con la cepa fúngica

Esta figura muestra que la cepa con mayor actividad enzimática CMCasa es *Fusarium 2* (PPm Fs 2); mientras que, la cepa de la división Ascomycete (MAI As), posee una mínima actividad enzimática CMCasa. Las cepas de *Aspergillus 1* y *2* muestran una actividad CMCasa de 19,81 y 43,48 U/L_{ENZ}, respectivamente, a las 6 h de incubación, a diferencia de las otras cepas, cuya actividad se determinó a las 31 h, como se indicó en el apartado 2.3.2.2.2.

En la figura 3.13 se indica el diagrama de cajas de la variabilidad de los valores de la actividad CMCasa, determinados con respecto a la cepa fúngica.

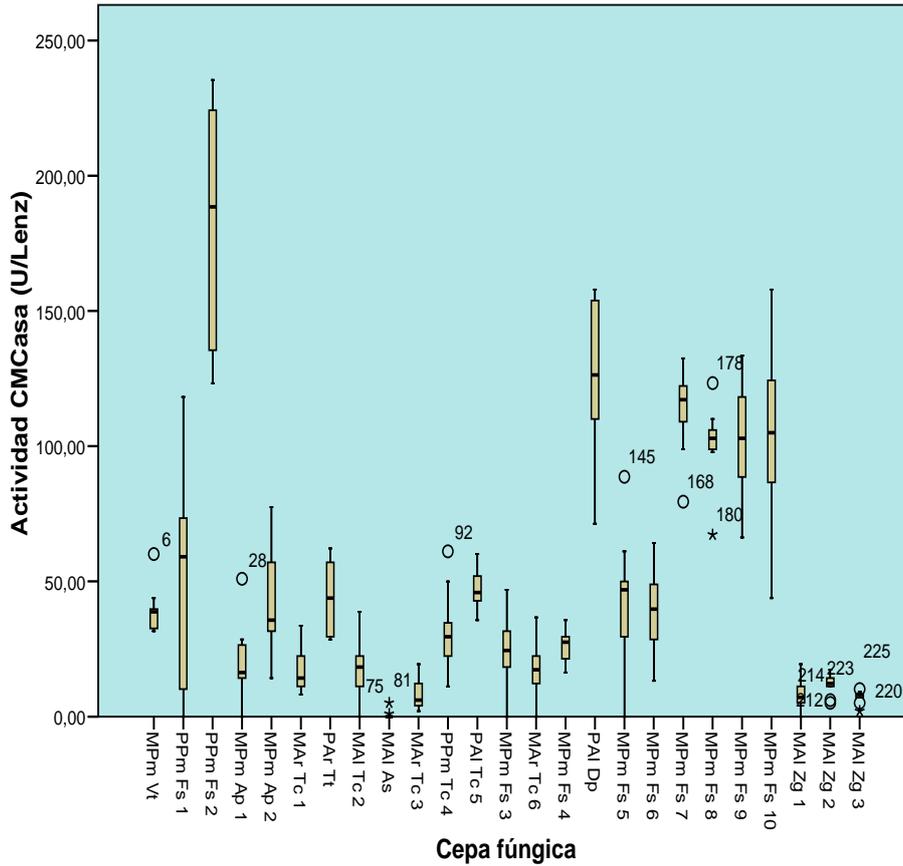


Figura 3.13 Variabilidad de los valores de la actividad CM Casa por especie fúngica

Si bien es cierto, la cepa *Fusarium* 2 (PPm Fs 2) presenta la mayor actividad enzimática, en la figura se observa que los datos analizados poseen una alta variabilidad.

3.2.2.2 Actividad avicelasa

En la tabla 3.16, se visualizan los resultados obtenidos del ANOVA realizado para los valores de la actividad enzimática avicelasa en dependencia de la cepa fúngica.

Tabla 3.16 ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad avicelasa generados por la cepa fúngica

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Tratamientos	5885637,02	24	245234,87	122,75	4,902E-106
Error	399556,13	200	1997,78		
Total	6285193,16	224			

Por el valor de p observado se determina que la media de los valores de la actividad avicelasa es diferente en una o más cepas fúngicas. Por estas diferencias en las tablas 3.17 y 3.18 se observan los resultados de la prueba de Tukey.

Tabla 3.17 Subconjuntos homogéneos de la cepa fúngica, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad avicelasa (U/L_{ENZ})

Cepa fúngica	N	Subconjunto para alfa = .05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MAI Zg 3	9	23,21									
MAI Zg 2	9	23,21									
MAI Zg 1	9	24,68									
MAI As	9	28,41	28,41								
MAr Tc 6	9	36,57	36,57	36,57							
MAI Tc 2	9	53,44	53,44	53,44	53,44						
PAI Tc 5	9	60,34	60,34	60,34	60,34	60,34					
MAr Tc 3	9	68,84	68,84	68,84	68,84	68,84	68,84				
MAr Tc 1	9	71,44	71,44	71,44	71,44	71,44	71,44	71,44			
PPm Tc 4	9	77,78	77,78	77,78	77,78	77,78	77,78	77,78			
MPm Fs 4	9	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12	78,12			
MPm Fs 3	9	80,16	80,16	80,16	80,16	80,16	80,16	80,16			
MPm Ap 2	9	93,07	93,07	93,07	93,07	93,07	93,07	93,07	93,07		
MPm Fs 6	9	99,63	99,65	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63		
MPm Fs 5	9		103,94	103,94	103,94	103,94	103,94	103,94	103,94		
MPm Fs 9	9		105,41	105,41	105,41	105,41	105,41	105,41	105,41		
MPm Fs 7	9			110,96	110,96	110,96	110,96	110,96	110,96		
MPm Ap 1	9				120,81	120,81	120,81	120,81	120,81		
PAI Dp	9				126,70	126,70	126,70	126,70	126,70		
MPm Fs 10	9					137,23	137,23	137,23	137,23		
MPm Fs 8	9						141,98	141,98	141,98		
MPm Vt	9							148,89	148,89		
PAr Tt	9								160,32		
PPm Fs 2	9									598,29	
PPm Fs 1	9										722,04

Según la similitud existente entre los valores de las medias de la actividad avicelasa se han formado 10 subconjuntos. Las dos cepas con mayor actividad enzimática *Fusarium 2* (PPm Fs 2) y *Fusarium 1* (PPm Fs 1) se encuentran en el subconjunto 9 y 10 respectivamente. Los valores de actividad expresados por estas

cepas 598, 29 y 722,04 (U/L_{ENZ}) son mayores con respecto a los expresados por las otras 23 cepas.

Tabla 3.18 Intervalos generales de confianza, al 95%

Cepa fúngica	Media (U/L _{ENZ})	Error típico (U/L _{ENZ})	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior (U/L _{ENZ})	Límite superior (U/L _{ENZ})
MPm Vt	148,89	6,62	133,61	164,16
PPm Fs 1	722,04	59,50	584,83	859,25
PPm Fs 2	598,29	33,77	520,40	676,17
MPm Ap 1	120,81	4,74	109,88	131,74
MPm Ap 2	93,07	5,90	79,44	106,69
MAR Tc 1	71,44	3,23	63,98	78,90
PAR Tt	160,32	4,65	149,58	171,06
MAI Tc 2	53,44	2,58	47,48	59,39
MAI As	28,41	7,61	10,86	45,97
MAR Tc 3	68,84	1,46	65,47	72,21
PPm Tc 4	77,78	3,34	70,07	85,50
PAI Tc 5	60,34	7,87	42,18	78,51
MPm Fs 3	80,16	6,87	64,31	96,01
MAR Tc 6	36,57	3,49	28,51	44,63
MPm Fs 4	78,12	5,27	65,95	90,29
PAI Dp	126,70	12,58	97,67	155,72
MPm Fs 5	103,94	5,69	90,81	117,06
MPm Fs 6	99,63	11,46	73,20	126,07
MPm Fs 7	110,96	4,41	100,78	121,14
MPm Fs 8	141,98	5,30	129,76	154,20
MPm Fs 9	105,41	8,90	84,87	125,95
MPm Fs 10	137,23	6,41	122,44	152,02
MAI Zg 1	24,68	2,57	18,74	30,62
MAI Zg 2	23,21	2,23	18,04	28,37
MAI Zg 3	23,21	2,40	17,66	28,76

Los límites inferior y superior en los que se encuentra la media de la actividad avicelasa para la cepa *Fusarium* 1 están entre $584,83 \leq \mu \leq 859,25$ U/L_{ENZ} y para la cepa *Fusarium* 2 están entre $520,40 \leq \mu \leq 676,17$ U/L_{ENZ}. Las dos cepas presentan los valores mayores en cuanto a esta actividad enzimática.

En la figura el 3.14 se observan las medias de los valores de la actividad avicelasa expresada en U/L_{ENZ}.

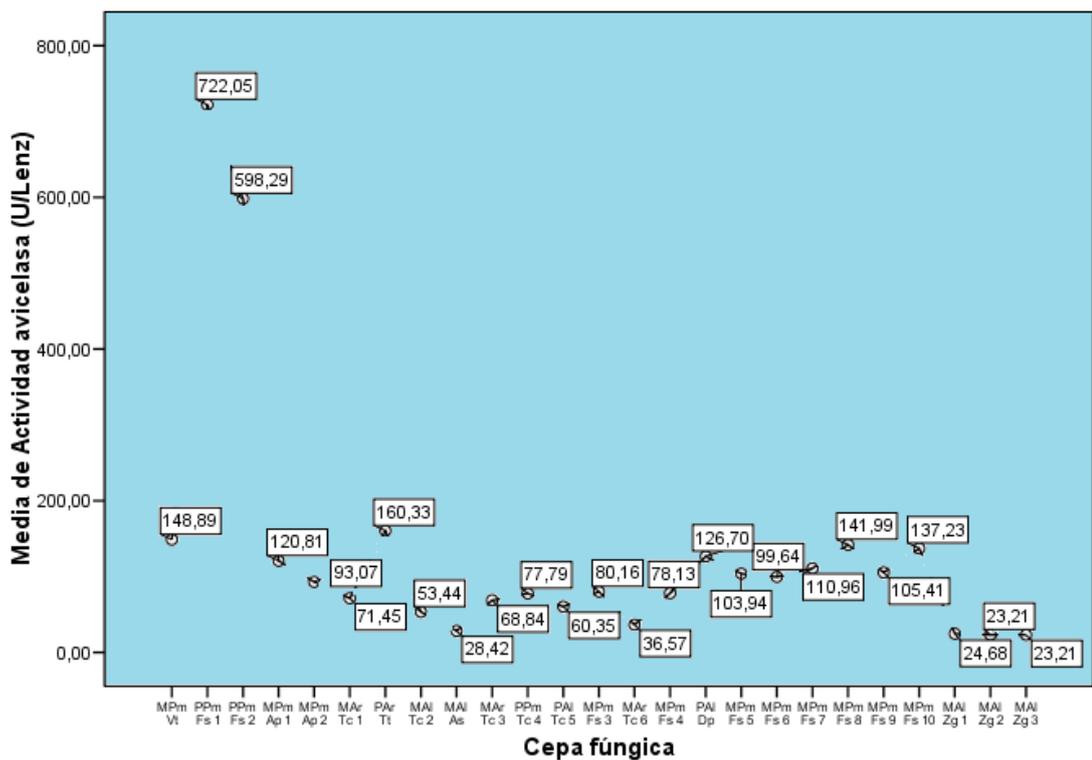


Figura 3.14 Medias de los valores de la actividad avicelasa en relación con la cepa fúngica

Mediante la figura se corrobora lo expresado en las pruebas de Tukey, donde existen dos cepas *Fusarium* 1 (PPm Fs 1) y *Fusarium* 2 (PPm Fs 2) que poseen la mayor actividad enzimática, de igual manera se observa que las tres cepas pertenecientes a la división Zygomycete (MAI Zg 1, MAI Zg 2 y MAI Zg 3), presentan la menor actividad avicelasa.

En la figura 3.15 se indica el diagrama de cajas de la variabilidad de los valores de la actividad avicelasa, determinados con respecto a la cepa fúngica.

La variabilidad de los datos de las dos cepas con mayor actividad enzimática es mayor. Existen cepas que presentan mejor simetría en la distribución de los datos; sin embargo, la expresión enzimática es pequeña o poseen valores atípicos y extremos, que tienen influencia directa sobre la distribución de los mismos.

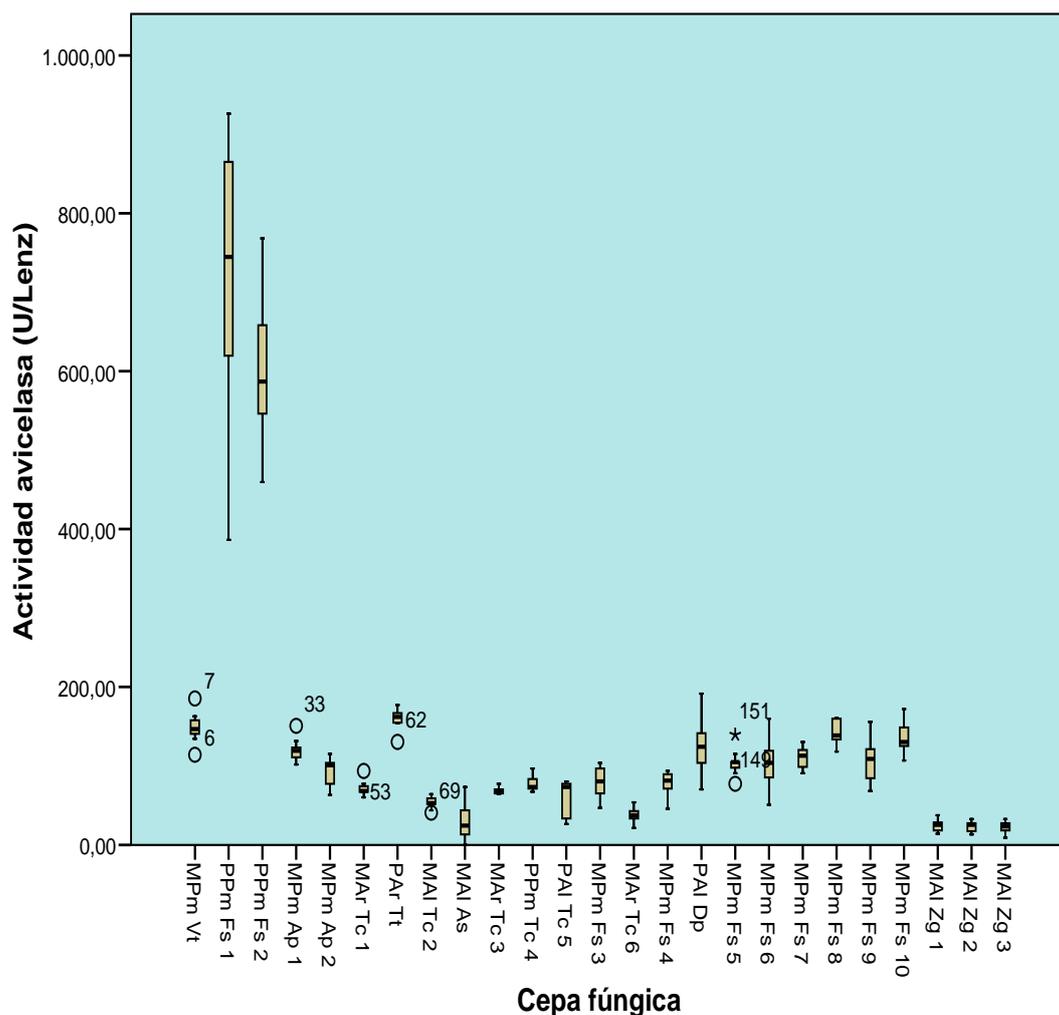


Figura 3.15 Variabilidad de los valores de la actividad avicelasa por cepa fúngica

3.2.2.3 Actividad enzimática lignino peroxidásica

En la tabla 3.19 se visualizan los resultados obtenidos del ANOVA realizado para los valores de la actividad enzimática lignino peroxidásica en función de la cepa fúngica.

Tabla 3.19 ANOVA de los resultados obtenidos para la actividad lignino peroxidásica generados por la cepa fúngica

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Tratamientos	4279,54	24	178,31	7,08	1,972E-16
Error	5032,96	200	25,16		
Total	9312,50	224			

Debido a que el valor de p es igual a $1,972E-16$, la media de los valores de la actividad lignino peroxidásica es diferente en una o más cepas fúngicas. Debido a estas diferencias se realizó la prueba de Tukey, los resultados se encuentran en las tablas 3.20 y 3.21.

Tabla 3.20 Subconjuntos homogéneos de la cepa fúngica, según la prueba DHS de Tukey, para la actividad lignino peroxidásica (U/L_{ENZ})

Cepa fúngica	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
MAI Zg 3	9	0,35				
MAI Zg 1	9	0,46				
MAI Zg 2	9	0,97				
MPm Vt	9	1,71	1,71			
MAr Tc 6	9	1,75	1,75			
PPm Fs 1	9	1,94	1,94			
MPm Fs 9	9	1,98	1,98			
PPm Tc 4	9	2,06	2,06			
MAr Tc 3	9	2,22	2,22			
PAI Tc 5	9	2,72	2,72			
PPm Fs 2	9	3,35	3,35			
MAI Tc 2	9	3,58	3,58			
MPm Fs 3	9	3,93	3,93			
MPm Fs 10	9	4,40	4,40			
MPm Fs 4	9	4,48	4,48			
MPm Fs 5	9	5,61	5,61	5,61		
PAI Dp	9	5,96	5,96	5,96	5,96	
MPm Fs 6	9	6,12	6,12	6,12	6,12	
PAr Tt	9	6,78	6,78	6,78	6,78	
MAI As	9	7,17	7,17	7,17	7,17	
MPm Fs 8	9	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77
MAr Tc 1	9		9,90	9,90	9,90	9,90
MPm Ap 2	9			14,23	14,23	14,23
MPm Fs 7	9				14,46	14,46
MPm Ap 1	9					16,29

Existen 5 subconjuntos, entre los subgrupos formados por la similitud de las medias de cada cepa no existen diferencia significativa, por esta razón hay cepas que se encuentran en todos los subconjuntos. La cepa con mayor actividad enzimática lignino peroxidásica es *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1) con un valor de 16, 29 U/L_{ENZ}.

Sin embargo no existe diferencia significativa entre esta cepa y las cepas *Fusarium* 7 (MPm Fs 7), *Aspergillus* 2 (MPm Ap 2), *Trichoderma* 1 (MAr Tc 1) y *Fusarium* 8 (MPm Fs 8) que tienen medias de 14,46; 14,23; 9,90 y 8,77 (U/L_{ENZ}) respectivamente. Las cepas de la división Zygomycete (MAI Zg 1, MAI Zg 2 y MAI Zg 3) presentaron menor actividad.

Tabla 3.21 Intervalos generales de confianza, al 95%

Cepa fúngica	Media (U/L _{ENZ})	Error típico (U/L _{ENZ})	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior (U/L _{ENZ})	Límite superior (U/L _{ENZ})
MPm Vt	1,71	0,88	0,31	3,74
PPm Fs 1	1,94	1,13	0,67	4,57
PPm Fs 2	3,35	1,24	0,47	6,22
MPm Ap 1	16,29	5,77	2,98	29,60
MPm Ap 2	14,23	2,51	8,43	20,02
MAr Tc 1	9,90	1,49	6,44	13,36
PAr Tt	6,78	1,09	4,25	9,31
MAI Tc 2	3,58	1,07	1,11	6,06
MAI As	7,17	1,46	3,80	10,54
MAr Tc 3	2,22	1,11	0,35	4,80
PPm Tc 4	2,06	0,90	0,01	4,14
PAI Tc 5	2,72	1,15	0,07	5,38
MPm Fs 3	3,93	1,27	0,99	6,88
MAr Tc 6	1,75	0,90	0,32	3,83
MPm Fs 4	4,48	0,80	2,63	6,33
PAI Dp	5,96	1,23	3,12	8,80
MPm Fs 5	5,61	1,46	2,23	8,99
MPm Fs 6	6,12	1,41	2,85	9,38
MPm Fs 7	14,46	1,54	10,90	18,02
MPm Fs 8	8,77	1,46	5,40	12,14
MPm Fs 9	1,98	0,78	0,18	3,79
MPm Fs 10	4,40	1,36	1,25	7,55
MAI Zg 1	0,46	0,46	0,61	1,54
MAI Zg 2	0,97	0,66	0,55	2,50
MAI Zg 3	0,35	0,35	0,45	1,16

Los límites entre los que se encuentra la media de la cepa *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1), que posee la mayor actividad lignino peroxidásica, son

$2,98 \leq \mu \leq 29,60$ U/L_{ENZ}. La cepa con menor actividad enzimática es de la división Zygomycete (MAI Zg 3) y su media se encuentra entre $0,45 \leq \mu \leq 1,16$ U/L_{ENZ}.

En el figura el 3.16 se observan las medias de los valores de la actividad lignino peroxidásica expresada en U/L_{ENZ}.

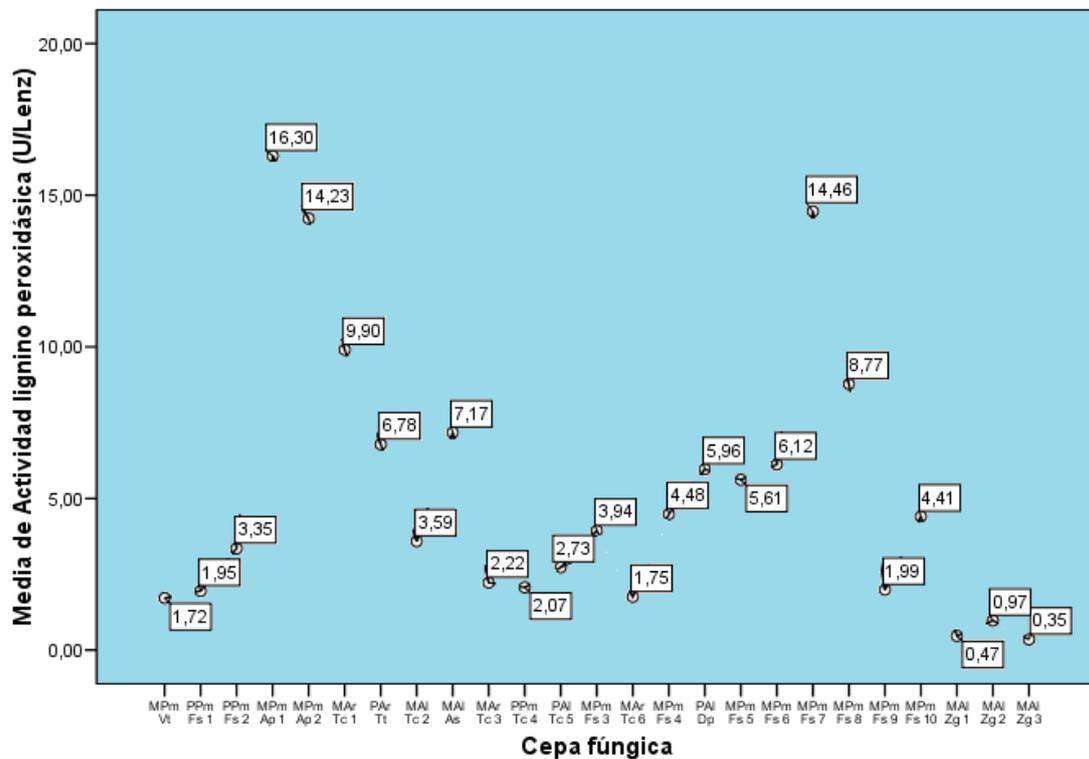


Figura 3.16 Medias de los valores de la actividad lignino peroxidásica en relación con la cepa fúngica

Existen tres cepas que poseen valores de actividad lignino peroxidásica mayores, sin embargo entre los valores no hay diferencia significativa. Las mejores cepas son *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1), *Fusarium* 7 (MPm Fs 7) y *Aspergillus* 2 (MPm Ap 2).

En la figura 3.17 se indica el diagrama de cajas de la variabilidad de los valores de la actividad lignino peroxidásica.

La variabilidad de los datos analizados es grande en todas las cepas, en referencia a las tres cepas con mayor actividad se observa que la cepa con mejor simetría en sus datos es *Fusarium* 7 (MPm Fs 7) ya que las otras dos cepas poseen valores atípicos y extremos.

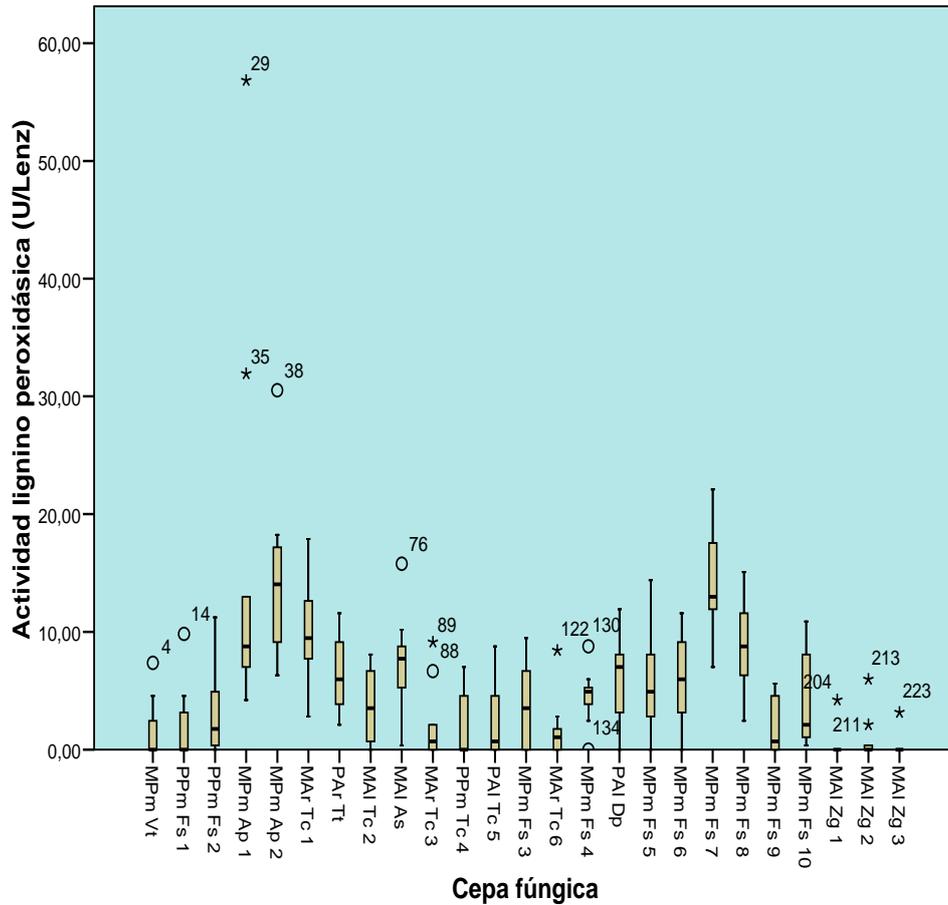


Figura 3.17 Variabilidad de los valores de la actividad lignino peroxidásica por cepa fúngica

A continuación en las figuras 3.18, 3.19 y 3.20 mediante gráficos de barras se observan, en resumen, las actividades enzimáticas analizadas.

Existen tres cepas fúngicas que presentaron los mayores valores de actividad enzimática CMCasa. La cepa *Fusarium* 2 (PPm Fs 2) fue obtenida de la especie vegetal pumamaqui y fue sembrada en medio PDA, presentó un valor de la actividad enzimática de 183,09 U/L_{ENZ}; la cepa *Diplodia* (PAI Dp), fue aislada a partir de la especie vegetal aliso y fue sembrada en medio PDA, tuvo un valor de actividad de 126,47 U/L_{ENZ}; y, la cepa *Fusarium* 7 (MPm Fs 7), fue obtenida de la especie vegetal pumamaqui y fue sembrada en medio MA, posee un valor de actividad de 114,36 U/L_{ENZ}.

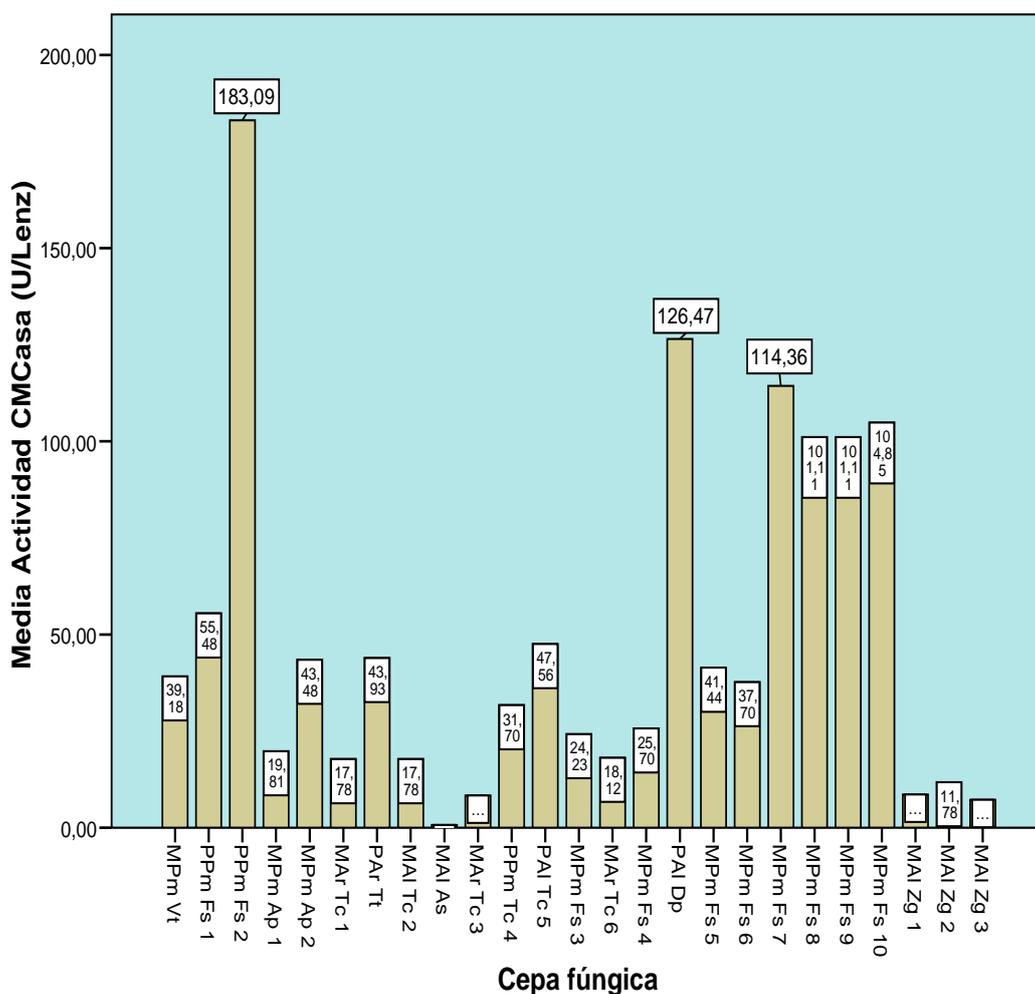


Figura 3.18 Diagrama de barras de la actividad CM Casa para cada cepa fúngica

En cuanto a la actividad enzimática avicelasa, la cepa *Fusarium* 1 (PPm Fs 1), proveniente de la especie vegetal pumamaqui y sembrada en medio PDA, presentó un valor de 722,05 U/L_{ENZ}; la cepa *Fusarium* 2 (PPm Fs 2), aislada también de la especie pumamaqui y sembrada en medio PDA, de 598,28 U/L_{ENZ}; y, la cepa *Trichothecium* (PAR Tt), obtenida de la especie arrayán y sembrada en medio PDA, de 160,33 U/L_{ENZ}.

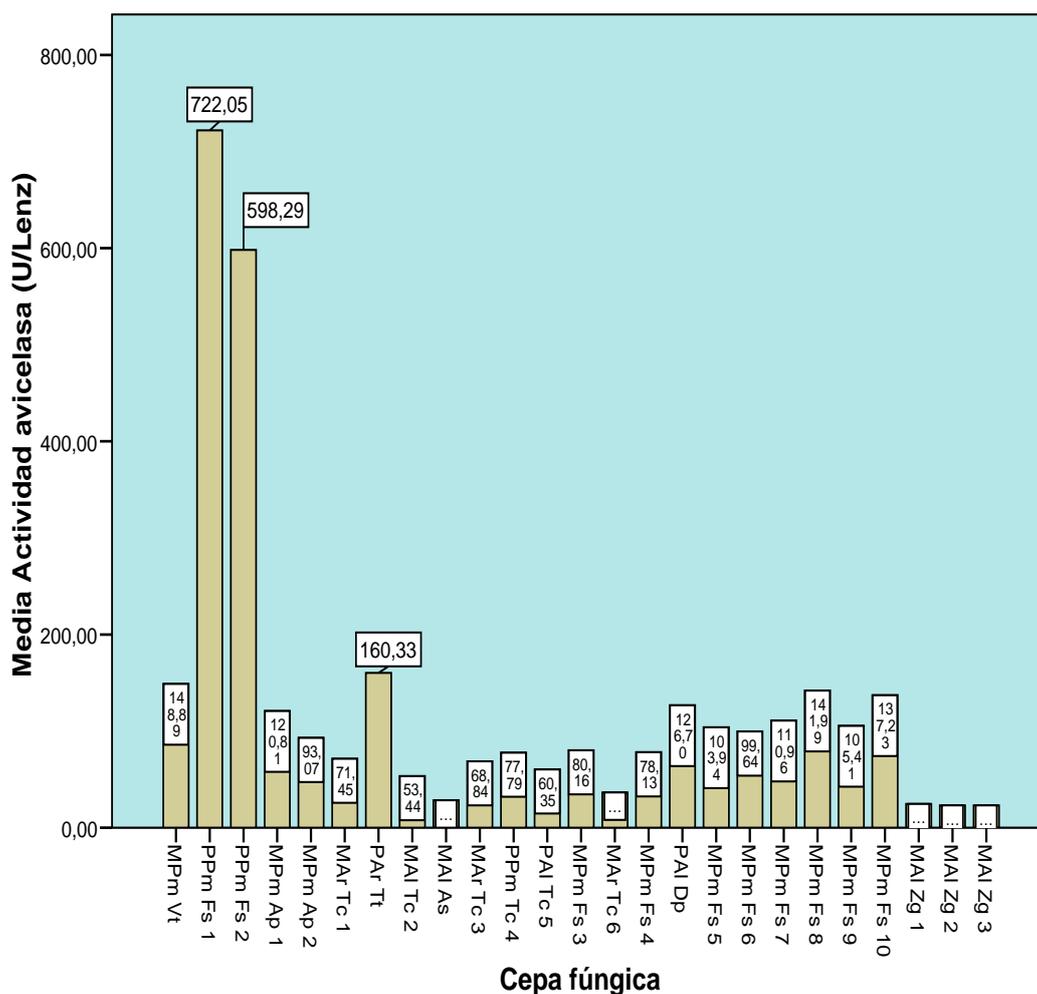


Figura 3.19 Diagrama de barras de la actividad avicelasa para cada cepa fúngica

Con relación a la actividad enzimática lignino peroxidásica, los mayores valores los presentaron 5 cepas fúngicas; sin embargo, 3 de estas obtuvieron valores mayores a 10 U/L_{ENZ}. Las tres cepas fueron extraídas de las cortezas de pumamaqui y fueron sembradas en medio MA. La cepa *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1) expresó un valor de 16,30 U/L_{ENZ}, la cepa *Aspergillus* 2 (MPm Ap 2) de 14,23 U/L_{ENZ} y la cepa *Fusarium* 7 (MPm Fs 7) de 14,46 U/L_{ENZ}.

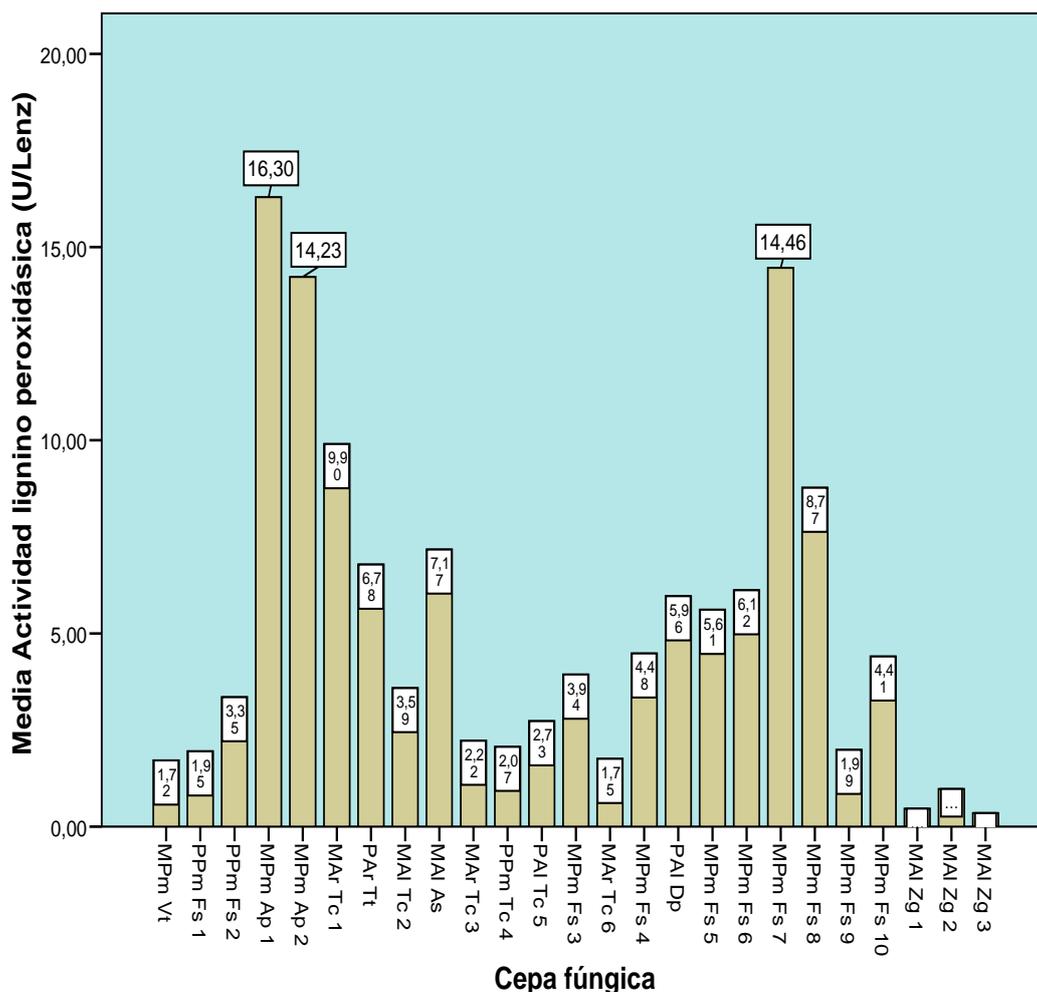


Figura 3.20 Diagrama de barras de la actividad lignino peroxidásica para cada cepa fúngica

Para la caracterización morfológica se escogió a la mejor cepa de cada una de las actividades enzimáticas analizadas. Las cepas escogidas fueron *Fusarium 2* (PPm Fs 2), *Fusarium 1* (PPm Fs 1) y *Aspergillus 1* (MPm Ap 1).

3.3 Caracterización morfológica de las tres cepas fúngicas más eficientes

El cuadro 3.1, indica las principales características macro y microscópicas de las tres cepas seleccionadas para la caracterización, obtenidas del informe entregado por la Lic. Verónica Luna.

Cuadro 3.1 Características macro y microscópicas de las tres cepas más eficientes

Cepa fúngica	Morfología macroscópica de la colonia	Morfología microscópica
<p><i>Fusarium 2 (PPm Fs 2)</i> División: Ascomycete Género: <i>Fusarium</i> Especie: <i>Fusarium semitectum</i></p>	<p>Blanca algodonosa y posteriormente se torna de color rosa-salmón. El reverso es de color salmón. Micelio flocooso.</p>	<p>Los conidióforos poseen ramas en fiálides cortas. Las conidias son septadas de 17 a 28 x 2,5 a 4 μm. Tiene clamidosporas hialinas con pared lisa globosa de 5 a 10 μm simples o en cadenas.</p>
<p><i>Fusarium 1 (PPm Fs 1)</i> División: Ascomycete Género: <i>Fusarium</i> Especie: <i>Fusarium oxysporum</i></p>	<p>Blanca algodonosa, el reverso posee un tinte ligeramente púrpura. El micelio es aéreo flocooso, blanco y algodonoso.</p>	<p>Las microconidias son abundantes de forma variable ovoide o elipsoidal ligeramente curvadas de 5 a 12 x 2,2 a 3,5 μm. Las macroconidias están septadas de 3 a 5 septos fusiformes, ligeramente curvados con terminaciones en forma de péndulo.</p>
<p><i>Aspergillus (MPm Ap 1)</i> División: Ascomycete Género: <i>Aspergillus</i> Especie: <i>Aspergillus flavus</i></p>	<p>Amarilla verdosa, el reverso es amarillento. Al transcurrir los días la colonia se vuelve verde oscura. Su aspecto es polvoriento.</p>	<p>Exhibe conidióforos hialinos. Las vesículas son globosas a subglobosas de 25-45 μm de diámetro. Las fiálides crecen de las vesículas o de la métula (6,5 a 10,0 x 3 5 μm). Las conidias miden de 3 a 6 μm, globosas a subglobosas.</p>

En la figura 3.21 se observan las fotografías de las tres cepas, caracterizadas morfológicamente.

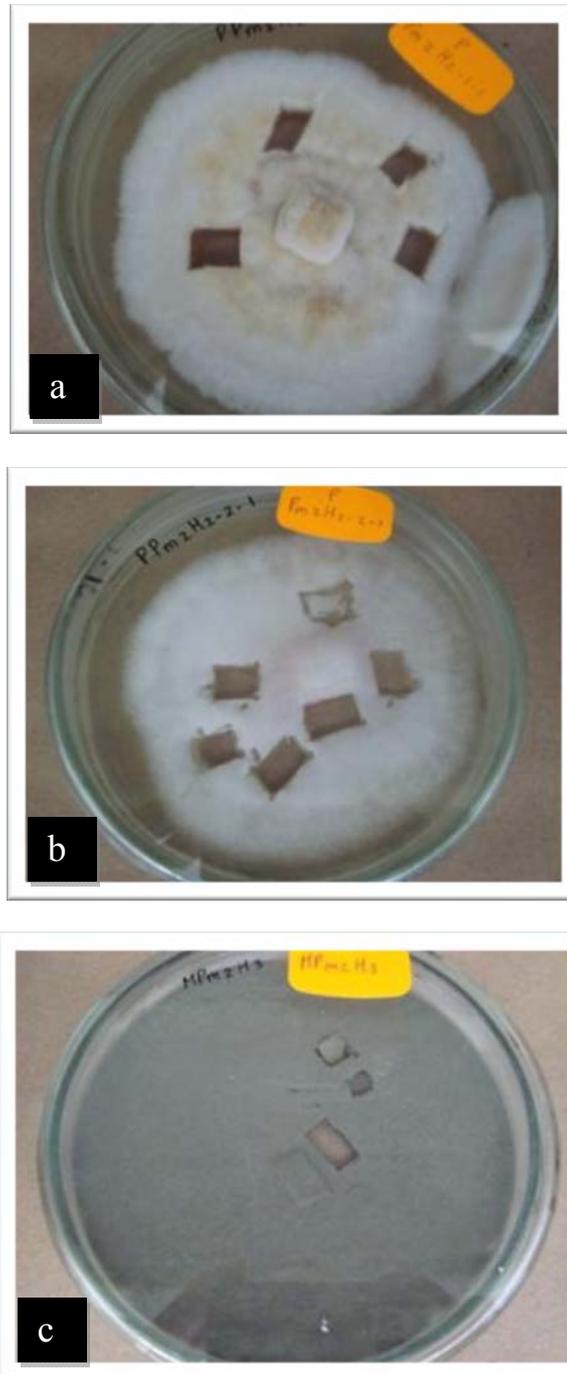


Figura 3.21 Fotografías de a) Cepa *Fusarium semitectum* (PPm Fs 2), b) Cepa *Fusarium oxysporum* (PPm Fs 1) y c) Cepa *Aspergillus flavus* (MPm Ap 1)

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento, purificación y caracterización preliminar de las cepas lignocelulolíticas

Con el propósito de obtener una muestra representativa, en manchas de bosque nativo del volcán Pasochoa, se seleccionaron 10 árboles de cada una de las 3 especies vegetales nativas estudiadas, que fueron escogidas porque representan a las pocas especies endémicas, que aún forman parte de los bosques nativos de nuestro país (Villacrés, 1995; Jørgensen y León, 1999; Ministerio del Ambiente, 2009).

De esta manera, se recolectaron 10 cortezas vegetales de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*). En todos los casos, a partir del mismo pedazo de corteza, se desarrollaron varias cepas en cada uno de los medios de cultivo, diferenciadas visualmente por su color. Para su identificación inicial se utilizó una codificación por colores de las cepas, de modo que por ejemplo, 2 cepas provenientes de la corteza de la especie vegetal aliso del árbol 4, sembrada en medio malta agar fueron identificadas de la siguiente manera MA1 hongo de color salmón peludo y MA1 hongo blanco-negro.

Finalizada la siembra primaria, se encontraron cajas con un elevado grado de contaminación, por un hongo verde, que posteriormente, finalizada la caracterización preliminar, se supo que pertenecía al género *Trichoderma*, que invadió totalmente las cajas y el medio de cultivo. Por esta razón, no pudieron ser consideradas para las etapas siguientes de la investigación. En las 57 cajas, que fueron consideradas como viables, se encontraron 4 cepas, en promedio por caja.

En la tabla 3.1, se observa que el 66,7% de las 57 cepas fúngicas puras se desarrollaron, preferentemente, en el medio de cultivo MA. Esta diferencia en el crecimiento de los hongos podría deberse a que se adaptaron mejor al medio MA,

además es necesario considerar el hecho de que este medio incluía, como parte de su formulación, un antibiótico, mientras que en el PDA, de manera externa, se agregó amoxicilina, que pudo ser menos eficiente para evitar la contaminación con bacterias, que compiten con los hongos por los nutrientes (Val, 2002; Díaz, 2009-2010).

También, está el hecho de que las cajas con medio PDA, durante las 72 h de incubación, se contaminaron en su mayoría con *Trichoderma*, un hongo oportunista que crece de manera rápida, con lo que impide que las técnicas de purificación sean efectivas (Ibarra *et al.*, 2009; Cervantes, 2010 y Sánchez, 2006).

En el medio MA se aislaron 23 cepas fúngicas, a partir de la especie vegetal pumamaqui, 11 de aliso y 4 de arrayán; en el medio PDA, se aislaron 7 de aliso, 6 de arrayán y 6 de pumamaqui, como se indica en las tablas 3.2 y 3.3. Durante la investigación se encontró que las cepas provenientes de arrayán fueron las más perjudicadas por la contaminación, esto se relacionó con el hecho de que la mayoría de cepas provenientes de esta especie vegetal pertenecían al género *Trichoderma*.

En general, se puede decir que las cepas fúngicas aisladas de la especie vegetal pumamaqui, que en su mayoría pertenecen al género *Fusarium*, se adaptaron mejor a los medios de cultivo. Se mostraron más fuertes y, al invadir la especie vegetal, pudieron aprovechar alguna posible afinidad con la composición de la especie pumamaqui. No se ha encontrado un estudio en el que se haya analizado esta especie vegetal pumamaqui y se pueda confirmar lo expuesto.

Con relación a las técnicas de resiembra, se encontró que para obtener cepas puras hubo la necesidad de aplicarlas en varias ocasiones. En cuanto al medio de cultivo utilizado para las resiembras, que se realizaron a las cepas, se halló que las cepas provenientes de PDA fueron resembradas en más ocasiones, de esta manera se observa que el 47,4% de las cepas fueron resembradas por una ocasión, el 26,3% por dos ocasiones y el 5,3% por una ocasión; mientras que, en el medio MA únicamente se realizaron resiembras hasta por dos ocasiones (tablas 3.6 y 3.7).

Las cepas sembradas en medio PDA fueron más vulnerables y sensibles frente a la contaminación, por esta razón fue necesario hacer más resiembras de purificación con estas cepas.

Las resiembras también pudieron verse afectadas por la técnica de sacabocados, que fue utilizada en esta fase. Para esta investigación se sacaron pedazos rectangulares del medio, con hojas de bisturí estériles; sin embargo, debido a la amplia superficie del pedazo pudieron trasladarse esporas de los otros hongos de la misma caja (Medina, 2006).

La caracterización morfológica preliminar se inició con las 57 cepas fúngicas consideradas puras. El objetivo fue determinar la familia, el género o la especie de las cepas para facilitar la identificación de posibles hongos lignino-celulolíticos. Las cepas fueron analizadas con la colaboración del ingeniero Abraham Oleas, del laboratorio de nematología del IASA. De estas cepas únicamente se pudieron caracterizar 37.

De las 20 cepas restantes, 9 cepas no pudieron ser identificadas debido a que las características observadas en el microscopio no eran suficientes para determinar la familia, el género o la especie. Las cepas no se habían desarrollado por completo y no se pudo observar la parte sexual, una característica fundamental para la caracterización (Pontón *et al.*, 2002 y Medina, 2006), a pesar de que las cepas MA11, MA16, MA17, MPm3, MPm4, MPm8, PAr7, PA15 y PA11 fueron expuestas a la luz, durante dos semanas.

Las 11 cepas restantes permanecieron contaminadas y, aunque, se utilizó adicionalmente una técnica de diluciones sucesivas, la purificación fue imposible, luego de cuatro ensayos. Al parecer, la interacción entre las cepas fúngicas presentes fue tan fuerte, que no se pudo separar ninguna de ellas, ya que siempre se desarrollaron de manera combinada (Manacorda y Cuadros, 2005).

En resumen, se debe indicar que de las divisiones Zygomycete se encontraron 3 cepas y de Ascomycete se encontró 1 cepa; mientras que, del género

Trichoderma fueron 12 cepas, de *Fusarium* 10, de *Aspergillus* 6, de *Trichotecium* 1 cepa, al igual que de los géneros *Verticillium*, *Diplodia*, *Sordaria* y *Drechslera*.

Algunas cepas pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus* han sido estudiadas como potenciales hongos lignino-celulolíticos (Cariello *et al.*, 2007; Munero *et al.*, 2005; Valencia, 2009 y Márquez *et al.*, 2007). Hongos pertenecientes a las divisiones Zygomycete y Ascomycete, de igual manera, han sido aislados y evaluados enzimáticamente en investigaciones previas como hongos degradadores de celulosa y lignina (Calle *et al.* 2008 y Córdoba, 2009). De los otros géneros no se encontró información.

4.2. Evaluación de la actividad enzimática de las cepas fúngicas aisladas e identificadas

4.2.1. Prueba semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

A las 37 cepas identificadas se les aplicó la prueba cualitativa de celulosa. Esta prueba permitió eliminar 12 cepas que, en las condiciones establecidas del ensayo, no expresaron resultados positivos. Entre estas cepas, se encontraron 6 pertenecientes al género *Trichoderma*, 4 al *Aspergillus*, 1 al *Sordaria* y 1 *Drechslera*. Aunque algunas especies de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* si han sido considerados como degradadoras eficientes de material lignino-celulósico (Delfín y Durán, 2003; Méndez *et al.*, 2007 y Vilches, 2002), no todas las especies de estos géneros deberán serlo.

Adicionalmente, se debe considerar que los resultados dependen, como se demostró al determinar la cinética de la expresión enzimática de *Trichoderma* y *Aspergillus*, del tiempo que necesite cada microorganismo para expresar las enzimas degradadoras (Gómez, 2005), que directamente refleja la adaptabilidad del hongo al medio de cultivo y a las condiciones de la prueba (Vilches, 2002). Sobre las especies de los géneros *Sordaria* y *Drechslera* no se encontró información relacionada con la investigación.

De las 22 cepas, las que presentaron los mayores diámetros de halo de hidrólisis pertenecieron al género *Trichoderma*, estos valores fluctuaron entre 4,68

y 7,92 cm, lo que probablemente significaría que las cepas aisladas pertenecen a diferentes especies de *Trichoderma*. Las cepas de *Fusarium* presentaron diámetros de halo de hidrólisis comprendidos entre 1,57 y 2,88 cm, lo que también implicaría que existen diferencias entre las especies obtenidas. Otro género que ha sido ampliamente estudiado es el *Aspergillus*, cuyos halos de hidrólisis de las dos cepas encontradas presentaron diámetros de 1,43 cm, con lo que se podría afirmar que la especie es la misma, dado que las condiciones de los ensayos fueron equivalentes

Adicionalmente a las cepas que han sido ampliamente estudiadas, se destaca la cepa del género *Diplodia* que presentó un diámetro de halo de hidrólisis de 6,62 cm; aunque, en la bibliografía no se ha encontrado información que lo relacione con investigaciones previas sobre actividad lignino-celulolítica. De igual manera sucedió con los géneros *Trichotecium* y *Verticillium*, lo que implicaría novedad y oportunidad de encontrar nuevas y posiblemente mejores fuentes de géneros de hongos degradadores de desechos lignino-celulolíticos.

A esto se suma el hecho de que las cepas fueron extraídas de las cortezas de especies vegetales endémicas del Ecuador, lo que abre el camino a futuras investigaciones sobre las potencialidades de la riqueza de nuestra megadiversidad; a la vez que, la formación de ceparios fúngicos lignino-celulolíticos nativos que estén conformados por especies poco estudiadas y adaptados a las condiciones ambientales extremas, del Pasochoa, cuyo bosque húmedo posee una ubicación geográfica privilegiada, en la zona ecuatorial.

Las tres cepas pertenecientes a la división Zygomycete también fueron evaluadas en esta prueba; sin embargo, debido a la forma de crecimiento de estos microorganismos fue imposible la medición de los diámetros de los halo de hidrólisis. Durante la caracterización preliminar, estas cepas se clasificaron en el género *Rhizopus*, cuyo crecimiento se produce también en forma de raíces, sin embargo, luego se decidió clasificar solamente su división, en la cual es típico el desarrollo en forma de raicillas (Ayala, 2002). Esta forma de crecimiento imposibilitó la definición y medición de las zonas de aclaramiento.

4.2.2. Actividad enzimática cuantitativa

4.2.2.1. Actividad CMCasa

Para optimizar las condiciones del ensayo para la actividad celulolítica CMCasa, fue necesario determinar la cinética de expresión enzimática de una de las cepas fúngicas, con lo que se estandarizó el tiempo de crecimiento para todas las cepas. Se escogió la cepa del género *Trichoderma* porque presentó el diámetro de halo de hidrólisis mayor.

La evaluación enzimática del ensayo fue realizada a las 24, 31, 48 y 96 h. El tiempo seleccionado fue el de 31 h, ya que se observó que a 24, 48 y 96 h los valores expresados fueron considerablemente menores.

Las demás cepas fueron cuantificadas bajo las mismas condiciones que la cepa de *Trichoderma* y los extractos enzimáticos fueron tomados a las 31 h. Se encontró que a ese tiempo todas las cepas presentaron actividad celulolítica.

Al contrario de lo esperado, las cepas del género *Trichoderma* revelaron valores bajos de esta actividad enzimática (*Trichoderma* 3 = 8,37; *Trichoderma* 2 = 17,77; *Trichoderma* 1 = 17,77; *Trichoderma* 6 = 18,11; *Trichoderma* 4 = 31,70 y *Trichoderma* 5 = 47,55 en U/L_{ENZ}), lo que de cierta manera parece contradecir otras investigaciones que se han realizado con cepas de este género, como es el caso de *Trichoderma viride*, investigado por Rodríguez y Piñeros (2007), que determinaron una actividad de 776 U/L. De la revisión bibliográfica se puede establecer que existen varias razones que pudieron influir sobre estos resultados, la principal está relacionada con el hecho de que, en este trabajo, únicamente se definió el género de la cepa y no la especie en particular. Además, las condiciones de la prueba varían, como por ejemplo el tiempo para la toma del extracto enzimático, el medio de cultivo en el que se desarrolló el hongo, la técnica utilizada para la determinación enzimática, entre otras.

Una de las cepas del género *Fusarium* 2 (PPm Fs 2) presentó la mayor actividad CMCasa (183,08 U/L_{ENZ}). En general las cepas de este género aportaron con los valores más altos en cuanto a esta actividad, lo que concuerda con estudios

realizados anteriormente como el de Vilches en el 2002, que evalúa la actividad enzimática de varias especies celulolíticas entre ellas de *Fusarium* y reporta actividades enzimáticas comprendidas entre 16 U/L y 137 U/L.

Por otra parte, se debe destacar que al evaluar las cepas *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1) y *Aspergillus* 2 (MPm Ap 2) a las 31 h, se encontró que las lecturas de absorbancia fueron superiores al rango de lectura del espectrofotómetro. Por esta razón, como se mencionó en el apartado 2.3.2.2 fue necesario definir la cinética particular de expresión enzimática de estas cepas. Se encontró que a las 6 h del ensayo la cepa alcanzó valores parecidos a los expresados en la cinética enzimática de *Trichoderma*. Por este motivo, las lecturas para estas cepas se hicieron a las 6 h por lo que se puede considerar que estas cepas, del género *Aspergillus*, poseen la mayor actividad enzimática, ya que necesitaron 5 veces menos tiempo, para expresar su actividad.

Al suponer que existe una relación lineal entre la actividad enzimática y el tiempo de incubación, la actividad de las cepas de *Aspergillus* serían de 102,35 y 224,65 U/L_{ENZ}, con lo que este último valor estaría por encima de la actividad de *Fusarium* 2 (PPm Fs 2).

La cepa del género *Diplodia* (PAI Dp) presentó un valor de actividad enzimática CMCasa de 126,47 U/L_{ENZ}, que tiene relevancia porque confirma el resultado cualitativo descrito anteriormente y no se han encontrado investigaciones relacionadas con el estudio de la actividad enzimática de las cepas pertenecientes a este género. Sin embargo, existen investigaciones donde se la asocia, con frecuencia, a enfermedades de diversas especies vegetales (Peláez y Fernández, 1985; Oliva y Molinas de Ferrer, 1986 y Luque, 1989) por lo que no es extraña la elevada actividad que muestra, ya que podría ser parte del mecanismo de su acción biológica. Los estudios más recientes que se encontraron son los de Timmer, en el 2002, donde considera al género como un microorganismo causante de la podredumbre del péndulo de los cítricos.

4.2.2.2. Actividad avicelasa

La cepa con mayor actividad avicelasa fue *Fusarium* 1 (PPm Fs 1), seguida por la cepa que presentó mayor actividad CMCasa *Fusarium* 2 (PPm Fs 2). Como se mencionó anteriormente estos resultados tienen coherencia ya que actualmente estas cepas son utilizadas dentro de las investigaciones enzimáticas sobre actividad lignino-celulolítica. Los valores expresados fueron mayores, con respecto a las otras cepas, lo que puede deberse a que sus enzimas poseen más afinidad con el sustrato avicel.

En la evaluación de esta actividad se observa que las cepas *Trichothecium* (PAr Tt) y *Verticillium* (MPm Vt), también presentan actividades enzimáticas elevadas; lo que es importante por su novedad, ya que no se ha encontrado información científica que las vincule con otras investigaciones, respecto a la capacidad degradadora de material lignino-celulósico. La información encontrada referente al género *Trichothecium* lo clasifica como un microorganismo productor de micotoxinas, patógeno de algunos animales y especies vegetales (Borrell y Gimeno, 2005). En el caso del género *Verticillium* se han hecho investigaciones para medir su actividad enzimática α -L-ramnosidasa y β -glucosidasa (Blanco, 2007) y en otro estudio se analizó su actividad quitinolítica y proteolítica (Barranco *et al.*, 2002); además, en el 2004, se realizó un estudio sobre los metabolitos producidos por la cepa *Verticillium lecanii* (Gómez *et al.* 2004), pero no se ha encontrado un trabajo equivalente relacionado con la actividad lignino-celulolítica.

4.2.2.3. Actividad lignino peroxidásica

La cepa *Aspergillus* 1 (MPm Ap 1), expresó la mayor actividad lignino peroxidásica; sin embargo, estadísticamente no existió diferencia significativa con los valores expresados por las cepas *Fusarium* 7 (MPm Fs 7) y *Aspergillus* 2 (MPm Ap 2). Se conoce que los dos géneros han sido de gran importancia en la degradación de material lignino-celulósico, de igual manera varios trabajos han descrito sus actividades enzimáticas (Gómez, *et al.*, 2008 y Valencia, 2009).

Las cepas que presentaron los menores valores de actividad ligninolítica pertenecen a la división Zygomycete (MAI Zg 1, MAI Zg 2 y MAI Zg 3). En la investigación realizada por Valenzuela *et al.* (2001), sobre los géneros *Rhizopus* y *Mucor*, de igual manera se reportan valores bajos de esta actividad enzimática.

4.3. Caracterización morfológica de las tres cepas más eficientes

Con los resultados encontrados en la caracterización morfológica, se ratificó el género de las cepas y se estableció su especie. Como se puede observar en el cuadro 3.1, los resultados de las características macro y microscópicas expuestas coinciden con las mencionadas en el Manual de hongos del suelo de Gilman (1957), donde se menciona que *Fusarium semitectum* (PPm Fs 2) es un hongo de color blanco a rosa o café, su micelio es aéreo flocoso y las conidias son septadas de 17 a 28 x 2,5 a 4 μm .

Las características macro y microscópicas encontradas para el hongo *Fusarium oxysporum* (PPm Fs 1) concuerdan con las expuestas por Valencia, en el 2009. Este hongo se caracteriza por presentar un color blanco, algodonoso, con tintes púrpuras. Las microconidias son ovaladas y las macroconidias son terminales o intercalares, generalmente de forma redonda.

Por su parte, el estudio realizado por Abarca, en el 2000, muestra la concordancia con las principales características macro y microscópicas del hongo *Aspergillus flavus* (MPm Ap 1). Es un hongo de micelio blanco, que cuando madura se torna de color verde oliváceo a verde amarillento. La cabeza de los conidióforos está localizada en el extremo de la hifa. La vesícula es esférica. Las métulas ocupan prácticamente toda la superficie de la vesícula. Los conidios son globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- 5.1.** A partir de las cortezas de los árboles de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*), se obtuvieron 57 cepas fúngicas, después del aislamiento. De estas, 37 cepas finalizaron satisfactoriamente la fase de purificación.
- 5.2.** De las 37 cepas evaluadas semi-cuantitativamente, solamente 25 arrojaron resultados positivos en esta prueba, las especies del género *Trichoderma* presentaron los diámetros de halo de hidrólisis mayores. *Trichoderma* 1 (MAr Tc 1) presentó un diámetro de 5,46 cm; *Trichoderma* 2 (MAI Tc 2) de 4,68 cm; *Trichoderma* 3 (MAr Tc 3) de 7,50 cm; *Trichoderma* 4 (PPm Tc 4) de 5,35 cm; *Trichoderma* 5 (PAI Tc 5) de 7,92 cm y *Trichoderma* 6 (MAr Tc 6) de 6,28 cm.
- 5.3.** Las tres cepas que presentaron la mayor actividad carboximetilcelulasa fueron *Fusarium* 2 (183,08 U/L_{ENZ}), *Fusarium* 7 (114,35 U/L_{ENZ}) y *Diplodia* (126,47 U/L_{ENZ}). La mayor actividad avicelasa la presentaron las cepas *Fusarium* 1 (722,04 U/L_{ENZ}), *Fusarium* 2 (598,29 U/L_{ENZ}) y la cepa *Trichothecium* (160,32 U/L_{ENZ}). Las cepas con mayor actividad lignino peroxidásica fueron *Aspergillus* 1 (16,29 U/L_{ENZ}), *Aspergillus* 2 (14,23 U/L_{ENZ}) y *Fusarium* 7 (14,46 U/L_{ENZ}).
- 5.4.** Las cepas de *Aspergillus* 1 y *Aspergillus* 2, además, se mostraron como unas de las más activas frente al CMC y avicel, ya que fueron capaces de desarrollar niveles de actividad comparables con las otras cepas más activas, en apenas 6 h.
- 5.5.** Para la caracterización morfológica se seleccionaron las tres cepas que tuvieron la mayor eficiencia enzimática en cada tipo de actividad analizada. La cepa *Fusarium semitectum* (*Fusarium* 2), se presentó como un hongo blanco con tintes color durazno que expresó una actividad CMCasa de 183,08 U/L_{ENZ}, la cepa *Fusarium oxysporum* (*Fusarium* 1), se mostró como un hongo blanco con tintes rosados, expresó un valor de actividad avicelasa de 722,04 U/L_{ENZ} y la cepa *Aspergillus*

flavus (*Aspergillus* 1), se reveló como un hongo verde oliváceo a verde amarillento y expresó un valor de actividad lignino peroxidásica de 16,29 U/L_{ENZ}.

5.6. Las cepas novedosas, en cuanto a la actividad enzimática, que se aislaron en esta investigación pertenecen a los géneros *Diplodia*, *Verticillium* y *Trichothecium* y constituyen fuentes promisorias de cepas fúngicas con potencial capacidad degradadora de materiales lignino-celulósicos.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- 6.1. Establecer la cinética de expresión enzimática de cada una de las cepas aisladas, para conocer el tiempo en el cual la expresión enzimática es óptima.
- 6.2. Realizar la prueba de la actividad enzimática ligninolítica, pasadas las 72 h de incubación y verificar si los valores de dicha actividad incrementan después de este tiempo.
- 6.3. Se podría complementar el estudio con la determinación de la cinética de crecimiento de las tres cepas que presentaron mayor eficiencia, en la actividad enzimática.
- 6.4. Estudiar las diferentes aplicaciones en las que se podrían utilizar las cepas encontradas, para su uso en biorremediación, obtención de glucosa, producción de bioetanol, degradación de residuos sólidos orgánicos, entre otras.
- 6.5. Aplicar la metodología desarrollada en esta investigación para estudiar la cepa del género *Diplodia* y complementarla con la cinética de crecimiento y con otras pruebas ligninolíticas (MnP y lacasas), ya que por los valores expresados podría ser un hongo importante con gran potencial lignino-celulolítico.
- 6.6. Caracterizar molecularmente las tres cepas que presentaron la mayor eficiencia en cada una de las pruebas enzimáticas evaluadas.
- 6.7. Diseñar un biorreactor, a escala semi-industrial o industrial, para aplicar las propiedades fúngicas encontradas y así degradar desechos sólidos orgánicos.
- 6.8. Extender esta investigación con muestras de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hallii*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) de otras manchas de bosques nativos del área andina, para establecer la influencia de las condiciones privilegiadas, en las que se han desarrollado estas especies nativas.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M. (2000) “Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial” Rev. Iberoam Micol. 17: S79-S84.

Aguilar, Z., Ulloa, C. e Hidalgo, P. (2001) “Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador”. Programa de Apoyo a la Gestión Descentralizada de los Recursos Naturales en las Tres Provincias del Norte del Ecuador. www.guia_plantas-091128.pdf

Atkinson, C., Jones, D. y Gauthier, J. (1997) “Microbial activities during composting of pulp and paper-mill primary solids” W J. Microbiol Biotechnol. 13: 519-525.

Ayala, N. (2000) “Citología de los hongos”
<http://alpha.rec.uabc.mx/matdidac/micologa/citologia.htm>

Awafo, A., Chahal, D., Simpson, B. y Le, G. (1996) “Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. Appl Biochem Biotechnol. 57/58: 461-470.

Barnet, H. y Hunter, B. (1972) “Illustrated genera of imperfect fungi” Tercera edición. Burgess publishing company. Minneapolis. Estados Unidos. pp. 88, 90, 104, 188, 186, 126.

Barranco, E., Alatorre R., y Saucedo G. (2002) “Caracterización parcial de las enzimas degradadoras de la cutícula *Verticillium lecanii* en cultivo sólido”.
http://www.smbb.com.mx/congresos20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_II/CARTEL/CII-56.pdf

Blanco, M. (2007) “Ramnosidasa alcalina de *Verticillium tenerum*: Producción y caracterización parcial”. Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/ARG-UNLP-TDG-0000000253/3331.pdf>

Betancourt, E. (2000) “Estudio del proceso de inmovilización de la enzima aminoacilasa I de riñón porcino (ARP) en sepharosa mediante enlace covalente”. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico. Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador. pp. 50-51.

Borrell, J. y Gimeno, G. (2005) “Micotoxicosis presentes en avicultura y ganado porcino”.

<http://albeitar.portalveterinaria.com/3461/ARTICULOS-PORCINO-ARCHIVO/.html>

Boyer, R. (2000) “Conceptos en Bioquímica” International Thomson Editores. México. pp. 166-168 y 444.

Bustamante, M. 2010 “Especies quiteñas”

http://terraecuador.net/revista_65/especies_quitenas.html

Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M., Albanell, E. (2003) “Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos”.

http://agro.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP_IX.pdf

Calle, C., Ramírez, A., León, Y., Correa, L. y Erazo, P. (2008) “Producción de enzimas a partir de microorganismos: Aplicaciones de los microorganismos”.

<http://enzimamicro.blogspot.com/>

Cardona, C., Sánchez, O., Ramírez, J. y Alzate, L. (2004) “Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado”. Revista colombiana de biotecnología. Vol. VI. No. 2. pp. 78-89.

Cariello, M., Castañeda, L., Riobo, I. y González, J. (2007) “Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos”. Suelo Nutr. Veg. vol.7, n.3. pp. 26-35.
<http://www.scielo.cl/pdf/rcsuelo/v7n3/art03.pdf>

Carrillo, L. (2003) “Los hongos de los alimentos y forrajes”. pp. 31-43.
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf>

Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C. y Luque, M. (2005). “Biotecnología Ambiental”. Editorial Tebar. Madrid. España. pp. 403-404.
http://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&printsec=frontcover&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Cervantes, M. (2010) “Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos”
http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm

Chávez, M., Brito, J., Pérez, U. y Delfín, J. (1990) “Temas de enzimología”. La Habana. Cuba.

CODELSPA (2008) “Basura”
<http://abyayala.nativeweb.org/ecuador/otavalo/codelspa/basura.html>

Córdoba, K. (2009) “Resistencia natural de *Guadua angustifolia* kunth. al ataque de hongos ligninolíticos como alternativa hacia nuevas posibilidades de uso”. Trabajo de

grado para optar al título de Maestra en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. p. 21.

Delfín, I. y Durán, C. (2003) “Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*”. Rev. Int. Contam. Ambient. 19 (1) 37-45.

<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=37019104>

Díaz, G, (2009, 2010) “Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos”

<http://pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT191.pdf>

Diorio, L., Forchiassin, F., Papinutti, V. y Sueldo, D. (2003) “Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina)”. Rev Iberoam Micol. 20: 11-15.

www.reviberoammicol.com/2003-20/011015.pdf

Ecuadoronline, (1999) “R.V.S. Pasochoa”. www.explored.com.ec/ecuador/guia/sierra/pasonatu.htm

Gaitán, D. y Pérez, L (2007) “Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)”. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp. 15, 16, 19, 21, 22 y 23.

GeoHack (2010) “Pasochoa”

http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Pasochoa&language=es¶ms=0_26_S_78_29_W_region:EC_type:mountain_source:GNS-enwiki

Gilman, J. (1957) “A manual of soil fungi”. Segunda edición. Iowa State University Press. Estados Unidos. pp. 212, 214, 302, 310 y 357.

Gómez, E., Álvarez, R., Fraga, R., Reyes, I., Hernández, J., Lemes, T. y San Juan, A. (2004) “Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*”. *Biotecnología Aplicada*. 21:92-95.

<http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2004/21/2/BA002102OC092-095.pdf>

Gómez, L. y Martínez, X. (2005) “Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* – clavel”. *Rev. Colomb. Quim.* vol.34 no.1.

Gómez, S., Amaya, D., Maldonado, C., Martínez, M., Quevedo, B., Soto, A. y Pedroza, A. (2008) “Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles”. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (3) 93-106.

<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=37011662001>

Granda, F. (2009) “Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*)”. Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja. Ecuador. p. 35

Gutiérrez, H. y de la Vara, R. (2008) “Análisis y diseño de experimentos”. Segunda edición. McGraw Hill. México. pp. 59-98 y 128-164.

Harris, S. (2008) “Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems” *Mycologia* 50 (6): pp. 823–32.

Hendricks, C., Doyle, J. y Hugley, B. (1995) “A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil”. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2016-2019.

Henriksson, G., Pettersson, G., Johansson, G., Ruiz, A. y Uzcátegui, E. (1991) “Cellobiose-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains”. *Eur. J. Biochem. /FEBS*; 196(1):101-6.

Hibbett, D., Greg Thorn, R., Tibell, L., Untereiner, W., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M., Winka, K., Yao, Y. y Zhang, N. (2007) “A higher level phylogenetic classification of the Fungi” *Mycological Research* 111 (5): pp. 509–47.
<http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/AFTOL/documents/AFTOL%20class%20mss%2023,%2024/AFTOL%20CLASS%20MS%20resub.pdf>

Ibarra E., Téllez, R., Soto, M., Martínez, M., García, R. y San Miguel, R. (2009) “Actividad antimicótica *in vitro* de ERISOVINA” *Revista Fitotécnica Mexicana*, Vol. 32, Núm. 4. México. pp. 327-330.
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61011789010>

Icanaqué, J. (2010) “Aislamiento de hongos y bacterias del suelo”.
<http://www.slideshare.net/JuanIcanaqué/biotecnology-hongos-y-bacterias-suelo>

Jijón, C. y Pazmiño, X. (1990) “Plan de manejo del bosque protector Pasochoa”. *Fundación Natura*. pp. 14.
http://www.ambiente.gob.ec/paginas_espanol/4ecuador/docs/Planes/Pasochoa.pdf

Jørgensen, P. y León, S (1999) “Catalogue of the vascular plants of Ecuador”. *Missouri Botanical Garden Press*. p. 621.

Laura, J. y Castellanos, P. (2009) “Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg”. *Rev. peru. biol.* 16(1): 125- 128.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v16n1/a18v16n1.pdf>

León, S. y Ayala, M., 2007. “Flores nativas de Quito, guía fotográfica”. Primera edición. Imprenta Mariscal. Quito. Ecuador. pp. 30, 44 y 79.

Luque, J. (1989). “Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de *Diplodia mutila* Fr. apud Mont”. *Anales Jará. Bot.* 46(1): 21S-221.
http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1989/Anales_46%281%29_215_221.pdf

Manacroda, A. y Cuadros, D. (2005) “Interacciones microbianas”.
http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/interacciones_microbianas.pdf

Márquez, A., Mendoza, G., González, S., Buntinx, S. y Loera, O. (2007) “Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida”. *INCI.* vol.32. no.11. pp. 780-785. ISSN 0378-1844.
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442007001100012&script=sci_arttext

Martínez de Lejarza, J. (2004) “Análisis de varianza por un factor”
<http://www.docstoc.com/docs/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-DE-LA-VARIANZA-POR-UN-FACTOR-JUAN>

Medeiros, R., Soffner, M. y Thome, J. (2000) “The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate”. *Biotechnol Prog.* 16: 522-324

Medina, A. (2006) “Influencia del mantenimiento de la cadena de frío controlada en la vida útil, calidad microbiológica, físico química y organoléptica en fresas tipo

exportación” Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp. 50

Méndez, C., Vergaray, G., Béjar, V. y Cárdenas, K. (2007) “Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno”. Rev. peru biol. v.13 n.3. pp. 203-206. ISSN 1727-9933.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332007000100008&script=sci_arttext

Mendenhall, W. y Sincich, T. (1997) “Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias”. Cuarta edición. Prentice Hall. México.

Miller, G. (1959) “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar”. Analytical chemistry. 31:426-428.

Ministerio del Ambiente, 2009. “Refugio de Vida Silvestre Pasochoa”

www.ambiente.gov.ec/paginas_espanol/4ecuador/docs/areas/pasochoa.htm

Moreno, N. y Ospina, X. (2008) “Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique”. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. p.28

Mueller, G. y Schmith, J. (2007) “Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?” Biodivers Conserv 16:1–5.

<http://www.springerlink.com/content/b317255081040764/>

Munero, P., González, L., Pérez, C., Manso, M. y Díaz, F. (2005) “Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de *Hyphomycetes* nativos de la provincia de Villa Clara”. *Revista Centro Agrícola*, vol 32. no. 3. pp. 21-24.

http://rca.fca.uclv.edu.cu/index.php?option=com_content&task=view&id=40&Itemid=113

Oliva, M. y Molinas de Ferrer, M. (1986) “Participación de *Diplodia sp.* En el escalado del alcornoque”. *SCIENTIA gerundensis*, 12:123-130.

<http://www.raco.cat/index.php/Scientia/article/viewFile/45193/54901>

Pedroza, A., Quevedo, B. y Matiz, A. (2007) “Manual de laboratorio de procesos biotecnológicos”. Primera edición. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp. 17-20, 42 y 44-46.

Peláez, I. y Fernández, A. (1985) “Determinación de relaciones antigénicas entre los hongos *Diplodia natalensis* y *Phomopsis citri*”. *Ciencias de la Agricultura*. no. 23. pp. 8-13. ISSN 0138-7251.

<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2010/CU/CU1022.xml;CU2010100123>

Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J. y Quindós, G. (2002) “Hongos y actinomicetos alergénicos”. *Revista Iberoamericana de Micología*. ISBN: 84-607-5370-0

<http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/001.PDF>

Quintero, J., Feijoo, G. y Lemar, J. (2006) “Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos”. *Vitae*, Vol. 13, Núm. 2. pp. 61-67. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169813258008>

Rodríguez, I. y Piñeros, Y. (2007) “Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* sobre los racimos vacíos de palma

de aceite como sustrato”. Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Volumen 14. Número 2. pp. 35-42. ISSN 0121-4004.

<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/606/516>

Sánchez, V., Hernández, F. y Samuels, G. (2006) “Aislamiento y caracterización de *Trichoderma spp.* de diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan”.

http://www.unpa.edu.mx/investigacion/Proyecto_Promep_UNPA.pdf

Sauri, M. y Castillo, E. (2002) “Utilización de la composta en procesos para la remoción de contaminantes” Ingeniería revista académica. Año/vol. 6. No. 003. pp. 55-60.

Spano, L., Medeiros, J. y Mandels, M. (1975) “Enzymatic hydrolysis of cellulosic wastes to glucose”. Resource Recovery and Conservation. 1: 279-294.

Stainer, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. (2005) “Microbiología”. Segunda edición. Editorial Reverté, S.A. España. p. 21.

Teather, R. y Wood, P. (1982) “Use of congo red – polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ. Microbiol. 43:777-780.

Tien, M. y Kirk, K. (1984) “Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxigenase”. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 81. pp. 2280-2284.

Timmer, L., Garnsey, S. y Graham, J. (2000) “Plagas y Enfermedades de los Cítricos”. Segunda edición. Mundi-Prensa.

Torres, G. (2005) “Calentamiento global es problema de todos”.

www.acjecuador.org/portal/sakudt5.html#11

Ulloa, C. y Møller, P. (2008) “Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador”.

http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=201

Uzcátegui, E., Ruiz, A., Montesino, R., Johansson, G. y Pettersson, G. (1991). “The 1, 4-b-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*”. *J. biotechnol.* 19(2-3):275-85.

Uzcátegui, E., Johansson, G., Ek, B. y Pettersson, G. (1991). “The 1, 4-b-D-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Re-assessment of their significance in cellulose degradation mechanisms”. *J. Biotechnol.* 21(1-2):143-59.

Vaca, R. (1998) “Técnicas para la preservación de maderas”

http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACD119.pdf

Val, D. (2002) “Medios de cultivo”.

<http://www.danival.org/600microbio/6000notasmicro/medioscult/medios.html>

Valencia, M. (2009) “Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas”. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. pp. 23, 37, 38, 49, 51 y 52.

Valenzuela, E., Leiva, S. y Godoy, R. (2001) “Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*” Revista chilena de historia natural. 74:737-749.
<http://www.scielo.cl/pdf/rchnat/v74n4/art01.pdf>

Vázquez, R. (2004) “Detoxificación de contaminantes por actividad peroxidásica”.
www.microbiologia.org.mx/CONAMI/Resumenes-Simposios/

Vilches, L. (2002) “Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz”.
www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2002/vilchez_pl/pdf/vilchez_pl-TH.front.3.pdf

Villa, Y. (2007) “Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica en el sustrato a escala de laboratorio”. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniera Química. Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador. pp. 22-27 y 41-42.

Villacrés, V. (1995) “Bioactividad de plantas amazónicas”. Ediciones ABYA-AYALA.

Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. y Schrempf, H. (1989) “Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*”. Appl. Environ. Microbiol. 55. pp. 2653-2657.

Zaid, L. (2004) “Estudio del biodeterioro en madera de *Eucalyptus globulus* Lab. por método gravimétrico”. Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero de la Madera. Santiago. Chile. pp. 1-70.

Anexo A

Codificación de las cepas caracterizadas

Codificación	Descripción		
	Medio de cultivo	Especie Vegetal	División/Género
MPm Vt	MA	pumamaqui	<i>Verticillium</i>
PAr Tt	PDA	arrayán	<i>Trichothecium</i>
PAI Dp	PDA	aliso	<i>Diplodia</i>
MAI As	MA	aliso	Ascomycete
PPm Fs 1	PDA	pumamaqui	<i>Fusarium</i>
MPm Fs 3	MA	pumamaqui	<i>Fusarium</i>
MPm Ap 1	MA	pumamaqui	<i>Aspergillus</i>
MAr Tc 1	MA	arrayán	<i>Trichoderma</i>
MAI Tc 2	MA	arrayán	<i>Trichoderma</i>
MAI Zg 1	MA	arrayán	Zygomycete
MAI Zg 1	MA	arrayán	Zygomycete
MAI Zg 1	MA	arrayán	Zygomycete

Anexo B

Medios de cultivo

Los procedimientos para preparar los medios de cultivo se tomaron de Pedroza *et al.*, 2007 y Villa, 2007 respectivamente.

1. Agar Carboximetilcelulosa

Carboximetilcelulosa	1% (p/v)
Nitrato de potasio	0,5 g/L
Cloruro de calcio	0,5 g/L
Fosfato monobásico de potasio	0,1 g/L
Fosfato dibásico de potasio	0,1 g/L
Agar-agar	18 g/L

2. Caldo nutritivo

Azúcar morena	8%
Nitrato de amonio	8,92 g/L
Fosfato monobásico de potasio	4,00 g/L
Sulfato de magnesio hépta-hidratado	0,92 g/L

En el caso de los ensayos para cuantificar la actividad lignino peroxidásica se agregó al caldo nutritivo 66,67 g/L de aserrín.

Anexo C

Preparación de reactivos y tampón de acetato de sodio

El procedimiento para preparar los reactivos de la prueba semi-cuantitativa fueron tomados de Gaitán y Pérez, 2007; Valencia, 2009 y para la solución tampón y los sustratos de carboximetilcelulosa y avicel, de Pedroza *et al.*, 2007.

1. Rojo congo 1% (p/v)

En un vaso de precipitación pesar 1 g del indicador rojo congo, añadir 100 mL de agua destilada y mantener en agitación hasta que el color se homogenice. Colocar la solución en un balón aforado de 100 mL.

2. Solución de NaCl 2M

En un vaso de precipitación pesar 11,69 g de NaCl, colocar 100 mL de agua destilada y mantener en agitación hasta que el NaCl se encuentre totalmente disuelto. Colocar la solución en un balón aforado de 100 mL.

3. Tampón de acetato de sodio 50 mM a pH=5

En un vaso de precipitación colocar 100 mL de agua destilada y agregar 0,41 g de Acetato de sodio. Mantener la solución en agitación hasta que el acetato de sodio se disuelva por completo. Ajustar el pH a 5. Envasar en un balón aforado de 500 mL.

4. Carboximetilcelulosa al 1% en tampón acetato de sodio 50 mM

Pesar 1 g de carboximetilcelulosa, disolver lentamente en 80 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM a pH=5 y mantener en agitación durante 45 min. Ajustar el pH a 5. Colocar la solución en un balón de 100 mL y aforar con la misma buffer.

5. Avicel al 1% en tampón acetato de sodio 50 mM

Pesar 1 g de avicel, disolver en 80 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM a pH=5 y mantener en agitación durante 30 min. Ajustar el pH a 5. Colocar la solución en un balón de 100 mL y aforar con la misma buffer.

Anexo D

Determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

La medición de azúcares reductores se realizó con la técnica propuesta por Miller, 1959 y adaptada por Pedroza *et al.*, 2007.

Preparación del reactivo DNS

Colocar en un vaso de precipitación de 250 mL envuelto en papel aluminio, 50 mL de agua destilada, agregar 1,6 g de hidróxido de sodio y disolver mediante agitación continua a temperatura ambiente, en plancha magnética. Posteriormente adicionar lentamente 43,8 g de tartrato de sodio y potasio. Una vez disuelto el tartrato, agregar 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Colocar la solución en un balón aforado de 100 mL y completar con agua destilada. Cambiar la solución a un frasco ámbar y dejarlo en agitación durante 12 h.

Preparación de la solución madre de glucosa (2 g/L)

Pesar 2 g de glucosa anhidra y disolver en 500 mL de agua destilada. Colocar la solución en un balón aforado de 1000 mL, mezclar hasta que esté completamente homogénea y aforar con agua destilada.

Preparación de las soluciones de concentración conocida (0,5 a 2,0 g/L)

Preparar 6 soluciones que tengan un volumen final de 5 mL, utilizando la siguiente fórmula:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Donde V_1 : volumen de la solución concentrada.

V_2 : volumen del solvente.

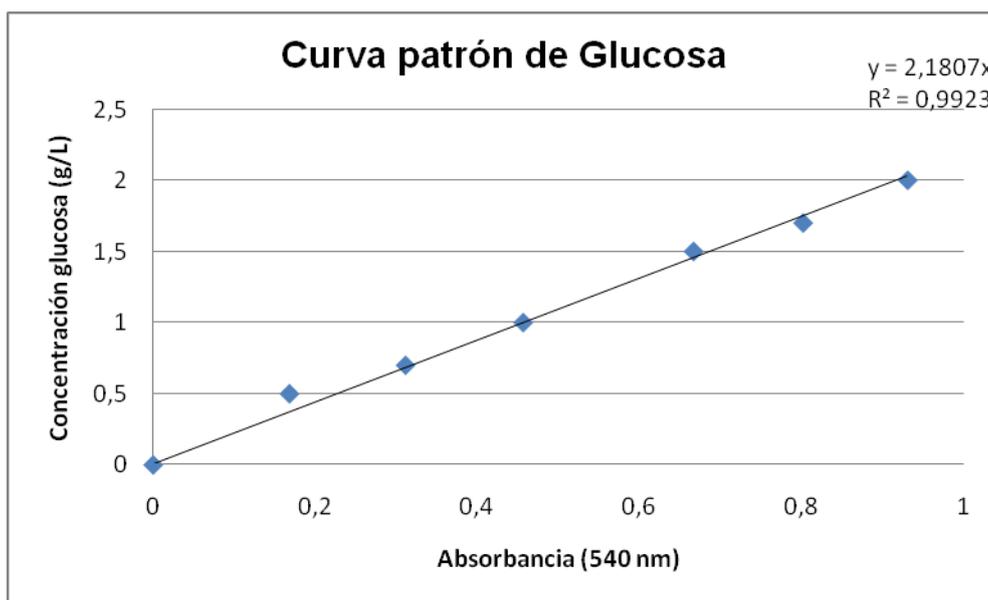
C_1 : concentración de la solución concentrada.

C_2 : concentración de la solución diluida.

Concentración (g/L)	Vol. de la solución de glucosa 2 g/L (mL)	Vol. de agua destilada (mL)
0,5	1,25	3,75
0,7	1,75	3,25
1,0	2,50	2,50
1,5	3,75	1,25
1,7	4,25	0,75
2,0	5,00	0,00

Curva Patrón

Concentración (g/L)	Absorbancia (540 nm)
0,5	0,168
0,7	0,311
1,0	0,456
1,5	0,666
1,7	0,801
2,0	0,930



Anexo E

Características microscópicas de las cepas fúngicas aisladas

La identificación preliminar de las cepas se realizó con la colaboración del Ing. Abraham Oleas y de las características establecidas por Barnet y Hunter, 1972; Gilman, 1975.

Código	Familia o Género	Características microscópicas
MPm4H1-2	<i>Fusarium</i>	Micelio septado, rico en clamidósfora intermicelial y terminal. No presencia de macroconidia. Esporas bicelulares pequeñas.
PAI4H1-1	<i>Aspergillus</i>	Conidióforo liso, cabeza conidial café, parte sexual Ascomycete.
PAr1H2-1	<i>Trichotecium</i>	Desarrollo apical, conidióforos que se ramifican, conidias bicelulares.
PAI5H1-1-1-1	<i>Sordaria</i>	Micelio muy septado con constricción a la altura de las septas, hifas oscuras, cuerpo infértil.
PPm8H1-1	-----	Micelio desarrollado, ligeramente hendido a la altura de las septas y ramificaciones con frecuencia en ángulo recto. Hifas que forman cordones.
PAr4H1-1-1	-----	Clamidósfora intermicelial y terminal. Desarrollo en conidios en cadenas.
MAI10H3-2	“Zygomycete”	Hifas cenocíticas, vesícula grande terminal, <i>zygosporangioforo</i> .
PAr7H1-1-1	-----	Hifas septadas con presencia de clamidósfora alta.
PAI5H3-1	<i>Trichoderma?</i>	Clamidósfora escasa. Masa conidial muy gruesa.
PAr1H1	-----	Micelio septado. “LUZ”
MPm1H1-1	“Basidiomycete”	Micelio septado, conexión en grapa. “LUZ”
MPm7H2-1	-----	Micelio fino no hay evidencia de esporulación.
MPm4H1-1	-----	Micelio septado, rico en clamidósfora.
PAr1H2-1	-----	Micelio negro septado, esporas no alternarias

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, ERIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO

Declaro que:

La tesis de grado titulada “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ENZIMO-FUNCIONAL DE HONGOS LIGNINO-CELULOLÍTICOS PROCEDENTES DE LA CORTEZA DE ALISO (*Alnus acuminata*), ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) Y PUMAMAQUI (*Oreopanax heterophyllum*) PRESENTES EN MANCHAS DE BOSQUE NATIVO DEL PASOCHOA, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 25 de marzo de 2011

Erika Cristina Castillo Tamayo

ALUMNA

CERTIFICACIÓN

Bs. Karina Ponce

Ing. Mariela Vera

Certifican:

Que el trabajo titulado **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ENZIMO-FUNCIONAL DE HONGOS LIGNINO-CELULOLÍTICOS PROCEDENTES DE LA CORTEZA DE ALISO (*Alnus acuminata*), ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) Y PUMAMAQUI (*Oreopanax heterophyllum*) PRESENTES EN MANCHAS DE BOSQUE NATIVO DEL PASOCHOA, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**, realizado por la Srta. **ERIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a la Srta. Erika Cristina Castillo Tamayo que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 25 de marzo de 2011

Bs. Karina Ponce

DIRECTORA

Ing. Mariela Vera

CODIRECTORA

AUTORIZACIÓN

Yo, Erika Cristina Castillo Tamayo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada: “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ENZIMO-FUNCIONAL DE HONGOS LIGNINO-CELULOLÍTICOS PROCEDENTES DE LA CORTEZA DE ALISO (*Alnus acuminata*), ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) Y PUMAMAQUI (*Oreopanax heterophyllum*) PRESENTES EN MANCHAS DE BOSQUE NATIVO DEL PASOCHOA, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 25 de marzo de 2011

Erika Cristina Castillo Tamayo

ALUMNA