



**Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) recolectado en el área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte**

Castillo Avilez, Fabricio Antonio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Trujillo Toledo, Luis Enrique PhD.

28 de enero de 2022

## Resultados de Análisis de Copyleaks



P\_titulacion\_Castillo TESIS FINAL A REVISAR - copyleaks.docx

Scanned on: 12:39 January 24, 2022 UTC



LUIS ENRIQUE  
TRUJILLO  
TOLEDO



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	220
Words with Minor Changes	99
Paraphrased Words	198
Ommited Words	0



Website | Education | Businesses



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) recolectado en el área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte**” fue realizado por el señor **Castillo Avilez, Fabricio Antonio** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de enero del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**LUIS ENRIQUE  
TRUJILLO  
TOLEDO**

.....  
**Dr. Luis E. Trujillo, Ph.D.**

**C.C.: 1755850276**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Castillo Avilez Fabricio Antonio**, con C.C. 1726845454, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) recolectado en el área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de enero de 2022

Castillo Avilez Fabricio Antonio

C.C.: 1726845454



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Castillo Avilez Fabricio Antonio**, con C.C. 1726845454, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Aislamiento e identificación molecular de mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) recolectado en el área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de enero de 2022

Castillo Avilez Fabricio Antonio

C.C.: 1726845454

## **Dedicatoria**

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente al idealismo humano, por ser capaces de crear, inspirar y dar fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi madre, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ella he logrado llegar hasta aquí y convertirme en la persona que aporta a la sociedad. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser su hijo, es la mejor madre. A mis amigos por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial al Ingenio Azucarero del Norte que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

## **Agradecimiento**

Agradecemos a los videojuegos por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a mi madre: Luz Avilez, por ser la principal promotora de mis anhelos, por confiar y creer en mis metas, por los consejos, valores y principios que me ha inculcado.

Agradecemos a los desarrolladores de la industria de videojuegos, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi vida, de manera especial, aquellas historias a quien ha guiado, y forjado mis valores.

## Índice de Contenido

Resultados de Análisis de Copyleaks.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas .....	12
Índice de Figuras .....	13
Abreviaturas .....	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Justificación e Importancia .....	18
Objetivos del Trabajo de Titulación.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
Hipótesis .....	20
Capítulo II: Marco Referencial .....	21
Ingenio Azucarero del Norte Compañía de Economía Mixta.....	21



Biología de los Hongos.....	21
Mohos .....	22
Levaduras .....	23
Filogenia de los Hongos .....	24
Material Lignocelulósico de la Caña de Azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) ...	25
Plan de Muestreo de Campo para Análisis Microbiológico .....	27
Muestreo Aleatorio Simple .....	28
Muestra Compuesta .....	29
Técnicas para Detectar y Enumerar Levaduras y Mohos .....	29
Medios de Cultivo y Extensión en Placa.....	29
Condiciones de Incubación y Conteo de UFC .....	30
Técnicas de Identificación Molecular .....	30
Reacción en Cadena de Polimerasa .....	32
Capítulo III: Metodología .....	33
Localización y Tiempo del Ensayo.....	33
Verificación de Equipos y Reactivos.....	33
Prueba Ambiental del Laboratorio .....	33
Trabajo en Campo.....	33
Muestreo .....	35
Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones Seriadas .....	36
Procesamiento de la Muestra.....	36

	10
Extensión en Placa.....	37
Incubación y Conteo de Colonias .....	37
Aislamiento y Purificación de Cepas Mohos y Levaduras.....	38
Colonias Puras de Levaduras.....	38
Cultivo Monoespórico de Mohos .....	39
Caracterización Morfológica de Cepas de Levaduras.....	40
Caracterización Morfológica de Cepas de Mohos.....	41
Clave Dicotómicas para Identificación de Mohos.....	41
Identificación Molecular de Mohos y Levaduras .....	42
Extracción de ADN .....	42
Amplificación de Secuencias .....	43
Electroforesis y Secuenciación.....	44
Diseño Estadístico.....	45
Mohos y Levaduras Aislados por Medios de Cultivo. ....	45
Identificación Molecular de Especies de Mohos y Levaduras.....	45
Capítulo IV: Resultados.....	46
Pruebas de Ambiente de Laboratorio .....	46
Muestreo del Material Lignocelulósico.....	47
Mohos y Levaduras Aislados por Medios de Cultivo.....	50
Análisis Estadístico de UFC Presentes en Diluciones Seriadas .....	50
Aislamiento de Levaduras.....	52

Aislamiento y Caracterización Morfológica de Mohos .....	55
Identificación Molecular de Mohos y Levaduras .....	59
Extracción de ADN.....	59
Amplificación del Espaciador Interno Transcrito.....	61
Ensamblaje de Secuencias y Búsqueda BLAST .....	62
Análisis Estadístico .....	64
Capítulo V: Discusión .....	65
Pruebas Ambientales y Carga Microbiana.....	65
Plan de Muestro de Material Lignocelulósico.....	66
Aislamiento con Técnicas Dependientes de Cultivo .....	67
Extracción de ADN de Cepas Fúngicas.....	68
Identificación Molecular de Cepas de Levaduras.....	69
Identificación Molecular de Cepas de Mohos .....	70
Ensamblaje de Secuencias y Búsqueda BLAST.....	72
Capítulo VI: Conclusión .....	73
Capítulo VII: Recomendación .....	75
Bibliografía .....	76

## Índice de Tablas

Tabla 1. Reactivos empleados para la reacción de amplificación de la secuencia ITS por PCR .....	44
Tabla 2. Secuencias de iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS ..	44
Tabla 3. Programa de amplificación en el termociclador.....	44
Tabla 4. Análisis de UFC en pruebas ambientales en escala logarítmica. ....	47
Tabla 5. Parámetros físicos de la toma del material lignocelulósico. ....	49
Tabla 6. Diseño de estudio para determinar el medio de cultivo y el factor de dilución de trabajo .....	50
Tabla 7. Descripción de levaduras aisladas mediante técnica de estría en placa y observación en el microscopio .....	53
Tabla 8. Descripción macroscópica y microscópica de los hongos asilado del material lignocelulósico. ....	57
Tabla 9. Valores de la absorbancia obtenido por el nanodrop. ....	61
Tabla 10. Secuencias de microorganismos fúngicos y su identificación mediante búsqueda BLAST .....	63

## Índice de Figuras

Figura 1. Morfología y principales estructuras de una hifa de mohó .....	23
Figura 2. Morfología y principales estructuras de una célula de levadura .....	24
Figura 3. Árbol filogenético del reino Fungi.....	25
Figura 4. Estructura y biodegradación del material lignocelulósico. ....	27
Figura 5. Representación gráfica de las regiones ribosomales internas ITS para identificación de hongos. ....	32
Figura 6. Ubicación geográfica del área de estudio en Ibarra y el área de los molinos del IANCEM. ....	34
Figura 7. Área de la picadora de caña para la recolección muestral.....	35
Figura 8. Procedimiento para el análisis de hongos y levadura del material lignocelulósico. ....	38
Figura 9. Procedimiento de estriado en placa para el aislamiento de levaduras .....	39
Figura 10. Procedimiento para la obtención de cultivos monoespóricos de mohos.....	40
Figura 11. Puntos de muestreo para análisis de pruebas ambientales y esterilidad de la cámara de flujo. ....	46
Figura 12. Temperatura promedio de la localización de campo Ibarra, Ecuador en los meses de estudio .....	48
Figura 13. Recolección de muestras de material lignocelulósico en el área de los molinos del IANCEM. ....	49
Figura 14. Gráfico de cuartiles para visualizar la normalidad de los datos. ....	51
Figura 15. Gráfico de caja y bigote para visualizar la homogeneidad de los tratamientos. .....	52

Figura 16. Aislamientos de cepas de levaduras en SDA y visualización en el microscopio. ....	53
Figura 17. Visualización macroscópica y microscópica de cepas de mohos obtenidas del material lignocelulósico. ....	56
Figura 18. Espectro de absorción obtenido mediante espectrofotometría de las muestras de ADN de las cepas de levaduras y mohos. ....	60
Figura 19. Visualización en gel de agarosa 1% en el transiluminador UV de la del amplicón ITS1-ITS4. ....	62
Figura 20. Análisis estadístico de prueba de la interacción entre el microorganismo y su identificación. ....	64

### **Abreviaturas**

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**DSP:** Diluyente Salino Peptonado

**IANCEM:** Ingenio Azucarero de Norte Compañía de Economía Mixta

**ITS:** Espacios Interno Transcrito

**PCR:** Reacción en Cadena de Polimerasa

**PDA:** Papa Dextrosa Agar

**RBA:** Rosa de Bengala Agar

**SDA:** Sabouraud Dextrosa agar

**UFC:** Unidad Formadora de Colonias

## Resumen

En la provincia de Imbabura la empresa IANCEM se considera como la principal productora de azúcar en la región, pero presenta un problema con la generación de subproductos como miel de caña y material lignocelulósico que no son aprovechados en su totalidad debido a sus grandes producciones. Se sabe que los organismos asociados a procesos industriales presentan características que permiten ser objetivos de bioprocesos en la utilización de residuos de industria abriendo la brecha para la aplicación de la biotecnología blanca. En el presente proyecto de titulación se realizó el aislamiento de cepas de levaduras y mohos mediante técnicas dependientes de cultivo microbiológicos y su identificación molecular mediante la amplificación de la región del espaciador interno transcrito (ITS, siglas en inglés). Las muestras fueron recolectas por un plan de muestreo en que se estableció de manera aleatoria cinco puntos a nivel de la picadora y una muestra compuesta. Cada cultivo puro se lo realizó por técnica de estría en placa para levaduras y cultivo monoespórico para hongos filamentosos. La identificación molecular permitió encontrar ocho cepas de levaduras de las cuales se destaca la *Torulaspota delbrueckii*. En el caso de estudio de mohos se identificaron cuatro cepas con la presencia de un *Trichoderma* sp. Se han identificado varias levaduras y mohos de patógenos humanos conocidos por ser causantes de infecciones. En el trabajo se buscó establecer si existe alguna relación entre los microorganismos presentes en el material lignocelulósico y su capacidad de ser aislados e identificados por técnicas microbiológicas y moleculares.

Palabras claves:

- **ESPACIADOR INTERNO TRANSCRITO**
- **MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**
- **HONGOS FILAMENTOSOS**



### Abstract

In the province of Imbabura, the company IANCEM is considered the main sugar producer in the region, but it presents a problem with the generation of by-products such as sugarcane honey and lignocellulosic material that are not fully exploited due to their large productions. It is known that organisms associated with industrial processes present characteristics that allow them to be targets for bioprocesses in the utilization of industrial waste, opening the gap for the application of white biotechnology. In the present titration project, yeast and mold strains were isolated by microbiological culture-dependent techniques and molecularly identified by amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region. Samples were collected by a sampling plan in which five points were randomly established at the grinder level and one composite sample. Each pure culture was performed by streak-plate technique for yeasts and monospore culture for filamentous fungi. Molecular identification allowed finding eight yeast strains of which *Torulaspota delbrueckii* stands out. In the case of the study of molds, four strains were identified with the presence of *Trichoderma* sp. Several yeasts and molds of human pathogens known to cause infections have been identified. The work sought to establish whether there is any relationship between the microorganisms present in the lignocellulosic material and their ability to be isolated and identified by microbiological and molecular techniques.

Keywords:

- **INTERNAL TRANSCRIBED SPACER**
- **FILAMENTOUS FUNGI**
- **INDUSTRIAL MICROBIOLOGY**

## Capítulo I: Introducción

### Justificación e Importancia

El impacto que tiene el uso de mohos y levaduras de interés industrial puede abarcar en los sectores de producción de alimentos y bebidas. En la industria de alimentos los hongos como *Pichia* y *Saccharomyces* se saben utilizar como fuentes para la obtención del complejo vitamínico B, pigmentos, cofactores, extractos y producción de biomasa. Hongos del género *Trichoderma* presentan control antifúngico, bacteriostático que facilita su uso como bioinsumos para la producción agrícola. *S. cerevisiae* sirve como suplemento alimenticio en vacunos, porcinos y aves dando un importante aumento de peso y desarrollo de los animales, pero reduciendo los costos de los alimentos tradicionales (Eliodório et al., 2019). Las levaduras tienen un interés especial debido a su relación con la producción de etanol para combustible, que se considera una industria emergente, y quizás uno de los métodos más económicos en aquellas industrias que utilizan la levadura como catalizador de este proceso biológico (Tesfaw & Assefa, 2014).

Para utilizar eficazmente todas las características de los mohos y levaduras a nivel comercial, es necesario determinar sus propiedades fisicoquímicas y las características taxonómicas de las cepas. Una identificación rápida y precisa de especímenes fúngicos hasta la especie es fundamental en muchos campos, como la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, la vigilancia ecológica, la prevención y el control de patógenos fúngicos, el control de cuarentena de especies exóticas y la salud humana (J. Xu, 2016).

Las principales técnicas de identificación de microorganismos se basan en métodos de biología molecular, utilizan la reacción en cadena de polimerasa (PCR, siglas en inglés) para obtener secuencias del espaciador interno transcrito, pueden ser

muy sensibles y pueden obtener resultados en poco tiempo. El método de análisis del genoma es una mejor alternativa a los métodos bioquímicos que se usan en tiempos contemporáneos, porque se analiza parte del genoma y no depende del estado fisiológico o del ambiente, en el que se aísla la levadura, lo que reduce el error por parte de las personas y la aleatoriedad de los cultivos cepas (Rodríguez, 2020).

El estudio se lo realizó en la empresa IANCEM a 25 km de la ciudad de Ibarra, teniendo como antecedente un estudio de población microbiana de bacterias presente en el área de extracción de azúcar de la caña, se intuye que las especies de hongos y levaduras poseen propiedades de interés industrial a causa del estrés presente en las labores del Ingenio, por ello es de importancia poder aislar e identificar los organismos. Como alternativa a la microbiología tradicional el trabajo plantea usar secuenciación del genoma para la identificación de los microorganismos presentes en las muestras a nivel de género y especie mediante la amplificación y secuenciación regiones transcritas en el ADN de hongos (ITS), que funcionan como código de barras en este reino (Rosenblad et al., 2016).

## **Objetivos del Trabajo de Titulación**

### **Objetivo General**

Aislar e Identificar molecularmente mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) recolectado en el área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte.

### **Objetivos Específicos**

Recolectar las muestras del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el área de los molinos del IANCEM por muestreo aleatorio simple.

Aislar mohos y levaduras procedentes del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) aplicando técnicas dependientes de cultivo.

Identificar molecularmente las especies de mohos y levaduras aislados del material lignocelulósico, mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS.

### **Hipótesis**

Del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) procedente del área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte, se pueden aislar e identificar molecularmente mohos y levaduras.

## **Capítulo II: Marco Referencial**

### **Ingenio Azucarero del Norte Compañía de Economía Mixta**

Los orígenes del Ingenio Azucarero del Norte datan de 1964 en el que nace como la solución a la producción de tierras de la provincia de Imbabura, luego se establece como IANCEM en el año de 1986. La empresa se dedica a la producción de azúcar blanca y morena; además, de subproductos y productos intermedios como: melaza, bagazo, cachaza, ceniza, mieles y jugos clarificados. En el 2021 el ingenio se encuentra con una producción de molienda de 360 millones de toneladas de caña y generándose un desecho de material lignocelulósico de alrededor de los 40 puntos porcentuales y estableciendo una problemática en el manejo de desechos industriales. El Ingenio Azucarero del Norte se encuentra como la agro-industria líder en las provincias de Imbabura y Carchi, de su actividad económica dependen unas 2.500 familias. Su producción representa el 7% del azúcar del país (IANCEM 2021).

### **Biología de los Hongos**

Los hongos son un grupo monofilético de eucariotas no fotosintéticos. Las células fúngicas están rodeadas de paredes químicamente complejas, que siempre contienen una gran cantidad de polisacáridos de muchos tipos. Los principales componentes de la pared se pueden clasificar en dos tipos: (i) los polímeros estructurales o fibrilares que consisten predominantemente en moléculas de cadena lineal, lo que proporciona rigidez estructural, y (ii) los componentes de la matriz que entrecruzan las fibrillas y que recubren e incrustan los polímeros estructurales. Los polisacáridos de la pared principal difieren entre los principales grupos de hongos. Los hongos poseen paredes celulares compuestas de quitina, membranas plasmáticas que contienen ergosterol, ARNr 80S y microtúbulos compuestos de tubulina. En cuanto a su organización celular, cabe señalar que en comparación con otros eucariotas, el núcleo

es más pequeño, el aparato de Golgi está subdesarrollado y la membrana mitocondrial interna se distribuye paralela al eje principal del orgánulo (Rodríguez, 2020).

Hay dos tipos de tejidos somáticos en la mayoría de los hongos: hongos unicelulares, de levadura o similares a las levaduras; y multicelulares, que son filamentos o hifas, una estructura tubular multicelular. Las células fúngicas de las hifas pueden estar separadas por un tabique. Estos compartimentos son invaginaciones de la pared celular, dividiendo las hifas en partes interconectadas. Se ha demostrado que la organización estructural del diafragma tiene valor taxonómico en el orden y nivel de clasificación del reino de los hongos (Warnock, 2019).

El gran y diverso grupo de organismos fúngicos tienen la capacidad de usar como sustrato la totalidad de fuentes de alimentos, derivados o desechos y esto se debe a que sus requerimientos nutricionales no son exigentes y requieren principalmente de una fuente de azúcar. En su mayoría las levaduras y mohos crecen en condiciones aeróbicas en un ambiente ácido-alcalino con un rango desde un pH 2 hasta pH superior a 9. Su rango de temperatura desde los 10 a 35 (°C). Con requisitos de humedad de los hongos relativamente bajos, son características para que estos microorganismos sean omnipresentes en el planeta (Rodríguez, 2020).

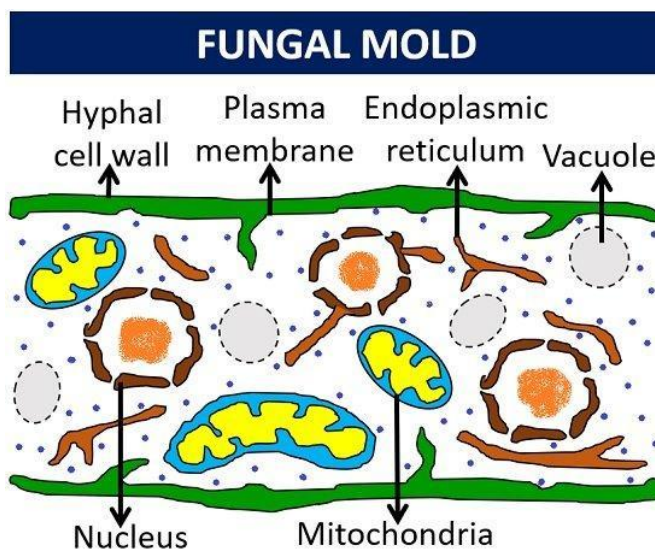
### **Mohos**

Los mohos se caracterizan por el desarrollo de hifas, que dan lugar a las características de las colonias que se observan a simple vista en el laboratorio. Las hifas se alargan mediante un proceso conocido como elongación apical, que requiere un cuidadoso equilibrio entre la lisis de la pared celular y la síntesis de una nueva pared celular. Dado que los mohos se diferencian a menudo sobre la base de la conidiogénesis, deben evaluarse cuidadosamente estructuras como los conidióforos y las células conidiógenas. Algunos mohos producen células especiales en forma de saco

llamadas esporangios, cuyo protoplasma completo se escinde en esporas llamadas esporangioesporas. Los esporangios suelen formarse en hifas especiales llamadas esporangióforos (Raja et al., 2017).

### Figura 1

*Morfología y principales estructuras de una hifa de moho*



*Nota.* Adaptado de estructuras Fúngicas, de Supriya N., 2019, Biologyreader.

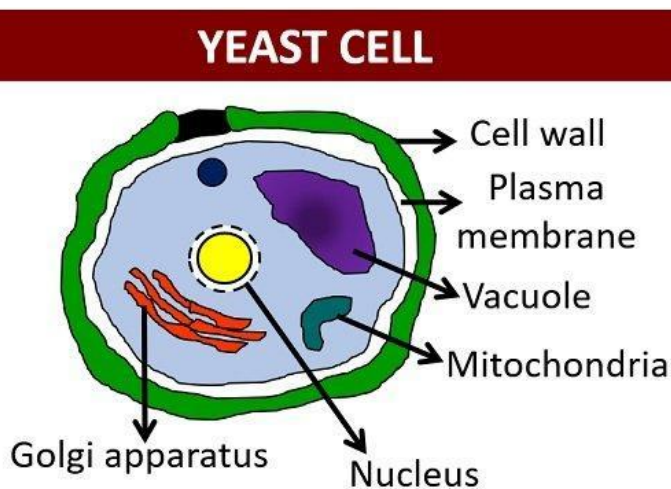
### Levaduras

Las levaduras son un grupo complejo de hongos que se asemejan entre sí en que existen como células individuales que "geman" directamente para formar nuevas células. Las colonias en crecimiento de medios de cultivo tienen un aspecto pastoso. Algunas levaduras pueden formar ascosporas dentro de sus células. Común en hábitats húmedos y, a menudo, capaz de crecer con niveles reducidos de oxígeno (Figura 2). Las células de las levaduras contienen casi los mismos orgánulos de una célula eucariota. El núcleo, el aparato de Golgi, las mitocondrias, el retículo endoplásmico, la vacuola y el cito esqueleto que se presentan en la mayoría de estos organismos. El tamaño de las partículas de las células de levadura es típicamente de  $5 \times 10 \mu\text{m}$ . El principal método de reproducción es por gemación y ocasionalmente por fisión. La

levadura se puede identificar y caracterizar en función de la morfología celular, la fisiología, la inmunología y el uso de técnicas de biología molecular (Speers & Forbes, 2015).

## Figura 2

*Morfología y principales estructuras de una célula de levadura*



*Nota.* Adaptado de estructuras Fúngicas, de Supriya N., 2019, Biologyreader.

## Filogenia de los Hongos

En micología la identificación de hongos se realiza sobre la base de las características morfológicas de la colonia, los conidios y las células conidiógenas (Spatafora et al., 2016).

En 1969, los hongos y levaduras se consideraron un nuevo reino independiente (Fungi) y evolutivamente más cercanos a los animales que a las plantas. En la actualidad, según el estudio de la filogenia molecular, el reino de los hongos es uno de los siete reinos y dos superreinos del árbol de la vida (Estrada & Ramírez, 2019).

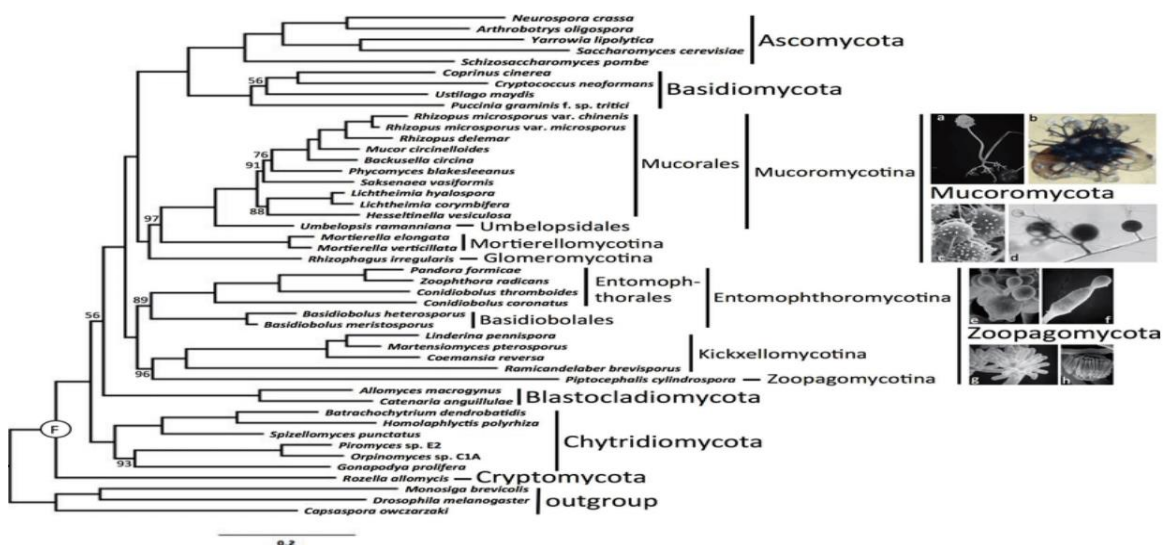
La clasificación clásica de los hongos se basa en la comparación de sus características morfológicas, con especial énfasis en descripciones detalladas de las estructuras involucradas en la reproducción sexual y asexual. Desde mediados de la década de 1980, el análisis filogenético basado en estudios comparativos de las



secuencias de nucleótidos de genes ribosomales y otros genes estructurales involucrados en el metabolismo celular ha establecido un sistema de clasificación biológica basado en estándares más concisos que los organismos. Aquellos basados en la investigación del fenotipo. La filogenia molecular permite la reconstrucción de la historia evolutiva teniendo en cuenta genomas completos o usando el barcoding. El Reino Fungi se divide en 8 sectores, 12 subsectores y 46 categorías como se muestra en la Figura 3 (Spatafora et al., 2016).

**Figura 3**

Árbol filogenético del reino Fungi.



*Nota:* Árbol filogenético del reino Fungi basado en la alineación concatenada de 192 proteínas ortólogas conservadas, adaptado de *Mycologia*, Spatafora et al., 2016.

### Material Lignocelulósico de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

La biomasa lignocelulósica es el recurso renovable más abundante y más grande del planeta, que constituye una fuente potencial de energía renovable. La producción de biocombustibles y productos bioquímicos a partir de la biomasa lignocelulósica puede contribuir de manera importante al desarrollo económico rural y a la sostenibilidad de los paisajes agrícolas para todos los países (H. Chen, 2015).

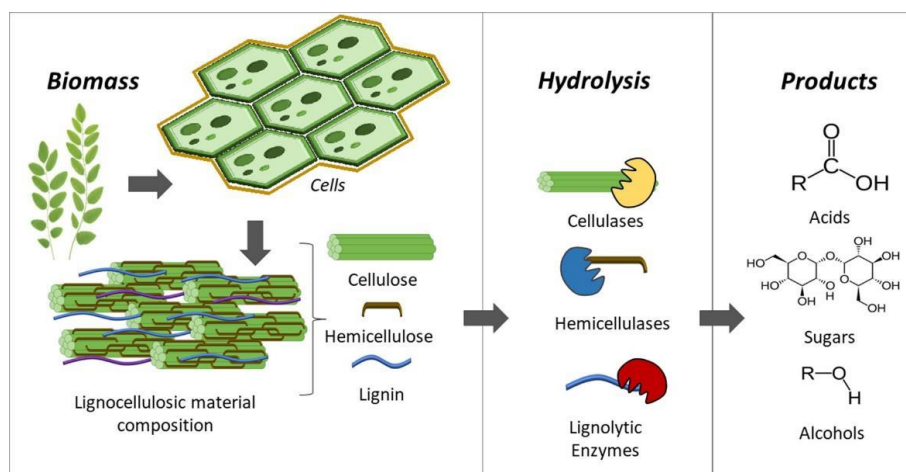
La lignocelulosa es el principal componente y tejido de soporte de la pared celular de las plantas, que está ampliamente distribuida en los residuos de los cultivos, como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre los tres componentes, la celulosa es un polisacárido que se encuentra en un estado ordenado como microfibrillas en la pared celular, dependiendo del número de enlaces de hidrógeno intermoleculares y del grado de polimerización de las moléculas constituyentes. La celulosa se compone de regiones cristalinas y amorfas, cuya proporción afectará a la eficiencia de degradación de la cadena de azúcares; mientras que la hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo muy ramificado, que incluye principalmente xilosa, manosa, arabinosa, etc. La lignina, un polímero heterogéneo compuesto por unidades fenilpropanoides, como el alcohol cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico, forma una gran parte de la biomasa vegetal junto con la celulosa y la hemicelulosa. El cuello de botella en la bioconversión lignocelulósica es la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables simples, y las enzimas lignocelulolíticas desempeñan un papel importante en el proceso de bioconversión (Zhang et al., 2019).

Los avances en biotecnología industrial abren nuevas oportunidades en los bioprocesos que utilizan desechos agroindustriales como fuente de sustrato. El material lignocelulósico de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es un subproducto de la industria azucarera. Contiene aproximadamente un 50% de celulosa, un 25% de hemicelulosa y un 25% de lignina. Debido a su abundante disponibilidad, puede servir como sustrato ideal para los procesos microbianos de fabricación de productos de valor añadido, como piensos enriquecidos con proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos de importancia farmacéutica, etc. Dado que el material de caña sin tratar es degradado muy lentamente por los microorganismos, un paso de

pretratamiento puede ser útil para mejorar la utilización del sustrato (Figura 4). Se puede establecer un valor añadido al material lignocelulósico de la caña de azúcar través de proceso biotecnológicos y mediante diferentes pretratamientos de hidrólisis a las cadenas de azúcares para alcanzar una utilización eficiente de las fuentes de carbono del desecho agroindustrial (Q. Xu et al., 2018).

#### Figura 4

*Estructura y biodegradación del material lignocelulósico.*



*Nota.* Adaptado de Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products, de Saldarriaga S., 2020, Biomac.

#### Plan de Muestreo de Campo para Análisis Microbiológico

Con el fin de obtener datos confiables y replicables para evaluar la presencia de microorganismos de muestras ambientales, es necesario desarrollar y aplicar un plan de muestreo (PM) bien definido y exhaustivo. Aunque los pasos para preparar e implementar un PM pueden parecer sencillos, existe una falta de consenso sobre cómo abordar la incertidumbre y la variabilidad de los datos microbianos de campo y analíticos, lo que hace que la fase de planificación del PM y la evaluación de los datos sean un reto. El PM también debe tener correlación con los objetivos del estudio

realizado para garantizar que los datos de la muestra ambiental presenten una calidad conocida y documentada para su análisis de microambientes (Silvestri et al., 2018).

Los análisis de muestras que contienen agentes microbianos tienen consideraciones diferentes a las de los agentes químicos. Estas diferencias incluyen la diversidad genética, la virulencia variable y la inmunidad y susceptibilidad del huésped. Además, los patógenos tienen la capacidad de crecer, morir y transmitirse entre huéspedes individuales, mientras que los agentes químicos tienden a degradarse o ionizarse. Los patógenos también pueden ser endémicos en el medio ambiente, pueden presentarse de forma estacional y pueden responder de forma diferente a las condiciones de las ambientales. Los protocolos de muestreo deben ser los adecuados como para detectar los microorganismos en las condiciones de laboratorio que simulen a las del ambiente (Silvestri et al., 2018).

### **Muestreo Aleatorio Simple**

El área de interés está formada por un número casi infinito de posibles lugares de muestreo. La suma de esos lugares se considera la población objetivo. Las muestras deben tomarse de forma aleatoria de la población objetivo para poder hacer inferencias válidas sobre toda esa población. Para caracterizar toda la zona de interés se podrían tomar muestras de todos los lugares posibles, pero eso sería costoso en tiempo y recursos (Cedeño et al., 2014).

El muestreo aleatorio es uno de los supuestos subyacentes que deben cumplirse para llegar a una inferencia válida y defendible basada en los resultados de esa muestra. Con un sistema aleatorio simple, cada núcleo de la muestra ambiental se selecciona por separado, al azar e independientemente de las unidades extraídas anteriormente (Cedeño et al., 2014).

### **Muestra Compuesta**

La decisión de recoger muestras compuestas debe basarse en el rendimiento del laboratorio, el tamaño del área que se requiera y la aplicabilidad del muestreo compuesto para cumplir eficazmente los objetivos del estudio. En un analito compuesto, los volúmenes de material de las submuestras discretas se combinan físicamente en una única mezcla homogénea o se utiliza un único dispositivo de recogida en los múltiples sitios de análisis. La principal ventaja del muestreo compuesto es que reduce el número y tiempo de procesamiento y análisis. Si alguna de las ubicaciones de examinadas arroja un resultado positivo, entonces toda el área de decisión será tratada colectivamente (Silvestri et al., 2018).

### **Técnicas para Detectar y Enumerar Levaduras y Mohos**

Los micólogos han utilizado tradicionalmente la morfología o caracteres fenotípicos, como las estructuras productoras de esporas formadas como resultado de la reproducción asexual o sexual, como único medio de identificación de las especies fúngicas, e incluso hoy en día se sigue adoptando como medio de identificación de especies dentro de la comunidad micológica. El uso de la morfología en la identificación de especies fúngicas es muy importante para entender la evolución de los caracteres morfológicos. Sin embargo, los enfoques morfológicos de la sistemática fúngica, aunque se utilizan de forma rutinaria en los estudios taxonómicos para la clasificación de los hongos a nivel ordinal o familiar, pueden presentar dificultades para la determinación de especies (Cepeda et al., 2019).

### **Medios de Cultivo y Extensión en Placa**

La técnica de extensión en placa está diseñada para determinar las poblaciones de propágulos fúngicos viables por unidad de peso o volumen de alimento. El agua con peptona al 0,1 % de concentración se usa comúnmente como diluyente para

homogeneizar o mezclar muestras. Ningún medio es satisfactorio para la detección o enumeración de levaduras y mohos en todos los alimentos. El agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol, el Sabouraud glucosado agar, el agar extracto de levadura con glucosa de oxitetraciclina y el agar rosa de bengala cloranfenicol son superiores al agar de dextrosa de patata acidificado para la enumeración de levaduras y mohos. La técnica de placa extendida se prefiere mucho a la técnica de placa vertida para enumerar levaduras y mohos (Vanegas & Gómez, 2018).

### **Condiciones de Incubación y Conteo de UFC**

Las condiciones de incubación estándar especificadas para la mayoría de hongos son 25 (°C) durante 5 días. En las regiones tropicales, se recomienda la incubación a 28 (°C), ya que es una temperatura más realista para enumerar los hongos presentes en un ambiente (Talaiekhosani & Mohanadoss, 2015).

Las placas de Petri deben incubarse en posición vertical y no deben tocarse hasta que las colonias estén listas para contar. El movimiento de las placas puede resultar en la liberación de conidios o esporas de moho y el subsiguiente desarrollo de colonias que darían una sobreestimación de la población en la muestra de prueba. No se debe intentar seleccionar placas que contengan 30-300 colonias para el recuento. Se opta por seleccionar diluciones que proporcionen de 10 a 100 colonias en placas de 9 cm o de 20 a 200 colonias en placas de 14 cm. Se deben recoger varias colonias de placas contables (Al-mohanna, 2017).

### **Técnicas de Identificación Molecular**

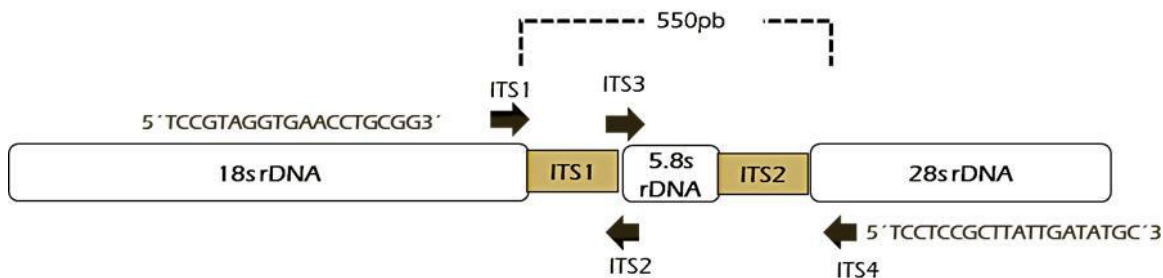
Los tres genes ribosómicos nucleares más utilizados en la identificación de hongos y las posibles ventajas y limitaciones de la región ITS, que es el marcador oficial de código de barras de ADN para la identificación de hongos a nivel de especie. El uso de datos moleculares para la identificación de hongos comenzó hace más de dos

décadas en la cual se describían los cebadores del operón ribosómico nuclear de los hongos (Estrada & Ramírez, 2019). Las secuencias de ADN fúngico generadas con estos cebadores para la subunidad grande del 26S o 28S, la subunidad pequeña 18S y toda la región del espaciador transcrito interno ITS1-ITS2; de una aproximado de 0,45-0,80 kb que marcaron el comienzo de una nueva era de identificación de secuencias filogenéticas moleculares en el reino Fungi (Baselga et al., 2017).

Debido a su facilidad de amplificación, a su uso generalizado y a la gran brecha del código de barras, el ITS es elegido como código de barras oficial para los hongos por un consorcio de micólogos. Por lo tanto, para la investigación de productos naturales, los dos primeros dominios del gen de subunidad larga (LSU, siglas en inglés) y toda la región ITS deben ser secuenciados debido a su alta prevalencia en la taxonomía y la sistemática de los hongos. Mientras que el gen LSU puede utilizarse en los análisis filogenéticos para determinar las relaciones entre especies, el ITS puede utilizarse solo o junto con otros genes codificadores de proteínas para la identificación de especies (Figura 5). Estos genes han sido ampliamente utilizados en importantes estudios de referencia en sistemática fúngica, como el Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL). Por lo tanto, existe un gran número de secuencias de ARNr de hongos en el GenBank para la identificación de especies mediante códigos de barras y análisis filogenéticos (Ammar et al., 2020).

## Figura 5

Representación gráfica de las regiones ribosomales internas ITS para identificación de hongos.



*Nota.* Adaptado de, Relevance of the Appropriate Control and Detection of Phytopathogens Fungi in Strawberries, de Lafuente D., 2015, Universidad Autónoma de Coahuila.

## Reacción en Cadena de Polimerasa

Los ensayos de reacción en cadena polimerasa requieren el procesamiento de muestras para extraer el ácido nucleico de la célula de interés en donde deben romperse y liberarse el material genético. Los ensayos de PCR se pueden utilizar para analizar tanto el ADN como el ARN. (Vanegas & Gómez, 2018).

Los ensayos de PCR funcionan según el principio de amplificar una región objetivo específica de ADN para ello se requiere cebadores aguas arriba y aguas abajo diseñados específicamente para que se unan regiones complementarias del ADN objetivo de interés y proporcionan sitios para el inicio de la síntesis de ADN. El procedimiento que realizar por ciclos y con variación de temperatura delimita la región amplificada. Para los protocolos de PCR convencionales, el análisis y la confirmación de los amplicones se pueden lograr mediante varias determinaciones como puede ser electroforesis en gel, hibridación de sonda, curvas de fusión de ADN, secuenciación de ADN (Ferrer, 2018).



## **Capítulo III: Metodología**

### **Localización y Tiempo del Ensayo**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo por Fabricio Castillo en el Laboratorio de análisis de calidad de la empresa Ingenio Azucarero del Norte Compañía de Economía Mixta., ubicado en la provincia de Imbabura, cantón Ibarra, sector Tababuela a una latitud de N 0°21'47.86596" y longitud de W 78°6'47.88648".

Las actividades de investigación se realizaron desde octubre del 2021 y finalizó en enero 2022, durante un periodo de cuatro meses.

### **Verificación de Equipos y Reactivos.**

Los equipos de medición y pesaje fueron estandarizados de acuerdo a las Normas de las BPM y normas de laboratorio de ISO 9001:2015.

Los reactivos como medios de cultivo y las soluciones de dilución, provenían de casas comerciales con una elaboración en base estándares ISO 11133 y estaban listos para prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Prueba Ambiental del Laboratorio**

En el laboratorio se realizó una prueba de ambiente para verificar la carga ambiental y la esterilidad de la cámara de flujo. Con esto se establecieron en el laboratorio cuatro puntos para colocar placas de agar de diferentes medios (PDA, RBA, TSA) y un quinto lugar que fue la cámara de flujo laminar. Los medios de cultivo se expusieron descubiertos durante 1 hora y se incubaron a 25 (°C) durante cinco días y se procedió a observar.

### **Trabajo en Campo**

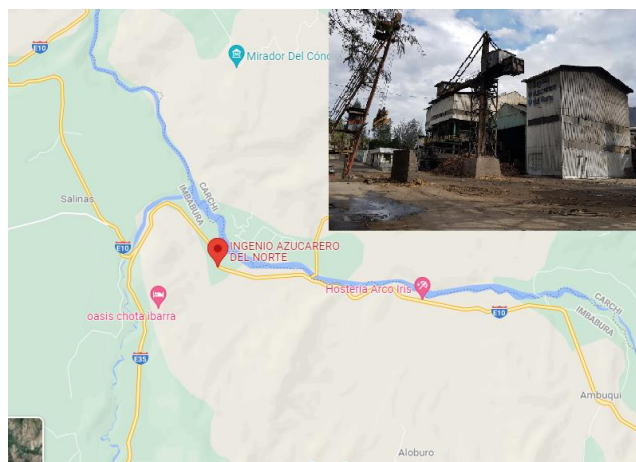
El estudio se lo realizó en el área de Ingenio Azucarero del Norte, ubicado en la provincia Imbabura en el cantón de Ibarra situada a 20 Km de la vía Panamericana.

Esta consta de una estación lluviosa nublada, la temporada seca es parcialmente nublada y con poca precipitación fluvial. Durante el transcurso del estudio la temperatura de campo se midió utilizando una aplicación meteorológica indicando un promedio de 24 (°C) durante los meses de estudio con picos de bajada de 13 (°C) y picos de subida de 26 (°C).

El área de toma de muestras fue en la parte de descarga del material de caña de azúcar, que en el IANCEM se conoce como el área de los molinos. Se delimito la toma de muestra en la etapa del primer proceso de picado de la caña en el cual se libera el material lignocelulósico conocido como marmaja.

### Figura 6

*Ubicación geográfica del área de estudio en Ibarra y el área de los molinos del IANCEM.*



*Nota:* las coordenadas geográficas de la ubicación del estudio es 0°28'44.8"N 78°05'53.0"W. Tomado de Mapas de Google 2021.

Se delimitó el área de recolección de muestra de acuerdo a las medidas en donde la picadora de caña se encuentra. Con un flexómetro se tomaron medidas de longitud, largo y altura con el fin de dimensionar la población muestral de la marmaja (Figura 7).

## Figura 7

*Área de la picadora de caña para la recolección muestral.*



*Nota:* las dimensiones del lugar de muestreo son 21x3x1 m. Tomada por Castillo, 2021

## Muestreo

Para el muestreo se tomó como referencia el protocolo del trabajo de Silvestri (2018) que indica las consideraciones a tomar en cuenta cuando se recolecta en campo. Con la finalidad de garantizar la calidad de los datos requeridos durante el muestreo se registraron los parámetros como tiempo y fecha de la recolección de los datos, localización mediante un programa GPS, peso en gramos, descripción física, el pH, y la capacidad de campo.

Los instrumentos de recolección y almacenaje se sometieron a un proceso de desinfección que constaron de un lavado con detergente comercial, aspersión de etanol al 70%. Luego de dejaron secar y se sometieron a un proceso de esterilización mediante una cámara UV durante 15 min. Al proceder con las tomas de muestras se utilizó vestimenta de protección como casco, mascarilla y guantes.

La recolección de muestras en campo, se estableció al sexto día de la molienda con el fin de encontrar una cantidad suficiente de marmaja para su análisis. Mediante un recorrido de reconocimiento se identificaron cinco lugares de recolección de forma aleatoria en el área de los molinos (muestreo aleatorio simple). Debido a la

homogeneidad del material lignocelulósico se estableció una muestra compuesta de 250 g mediante una mezcla de los analitos anteriores durante cinco min en un agitador mecánico y colocándolo en una bolsa de cierre hermético para su posterior análisis en el laboratorio.

### **Preparación de Medios de Cultivo y Soluciones Seriadas**

Se utilizaron medios cultivo de marcas comerciales de agar Rosa de Bengala (RBA), Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Sabouraud Dextrosa (SDA). Se los preparo siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior esterilización en autoclave a 121 (°C), 2 atm y 20 min. Luego se procedió a dispensar 15 mL de cultivo a 45 (°C) en placas de Petri estériles de 9 cm de diámetro y se colocó en luz UV durante 15 min hasta su punto de solidificación. Las placas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en análisis de la muestra de campo.

A los medios de cultivo como PDA y SDA se añadieron antibióticos a los medios micológicos para inhibir el crecimiento bacteriano. El cloranfenicol fue el antibiótico de elección, ya que es estable en condiciones de autoclave. La concentración utilizada y recomendada de este antibiótico es de 100 mg/L de medio.

La solución empleada de para las diluciones fue el diluyente salino de peptona (DSP) que se preparó con 1 g de peptona, 8.5 g de cloruro de sodio en 1 L de agua de osmosis con pH final de 7. El DSP se dispensó en tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave (Public Health England, 2019).

### **Procesamiento de la Muestra**

Para el análisis se utilizó 10 g de cada la muestra compuesta pesada en balanza analítica y bajo cámara de flujo. Se transfirió la muestra a 90 mL solución estéril DSP de para lograr una dilución de  $10^{-1}$ , luego se homogeneizó en un agitador magnético durante 30 min para poder aumentar la recuperación de población de microorganismos.

Después se realizaron diluciones seriadas agregando 1 mL de dilución anterior en 9 mL de la solución de DSP colocados en tubos de ensayo. Cada recipiente se agitó durante 7 s en un vortex antes de seguir con la siguiente dilución. Se estableció un rango de dilución de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . Este procedimiento se lo realizó para cada uno de los distintos medios de cultivo, con el fin de buscar la reproducibilidad y la varianza en comparación de las muestras (Rodríguez, 2020).

### **Extensión en Placa**

Para obtener colonias de hongos y levaduras se optó por la metodología de placa extendida. Se pipeteó asépticamente con una micropipeta (Marca Boheco de 100  $\mu$ L) 0,1 ml de cada dilución elaborada previamente en placas de agar solidificadas de RBA, SDA y PDA. Después se esparció el inóculo con una varilla de vidrio doblada (asa Digralsky) estéril, haciendo movimientos circulares de la caja hasta que se seque completamente. Se realizaron triplicados para cada dilución.

### **Incubación y Conteo de Colonias**

Para la incubación se lo realizó en un equipo BIOSTAT con la programación de 27 ( $^{\circ}$ C), temperatura óptima para la mayoría de hongos y levaduras (Cedeño et al., 2014). Se procedió a un primer conteo para levaduras a las 48 h de incubación y para mohos a los 5 días en total. Se tomó precaución en manipulación de las placas ya que se podría provocar un crecimiento secundario por esporas desprendidas, lo que afectaría en los recuentos finales. Estos resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por cada dilución tomada. La elección de las placas que presentaron un valor 10 a 150 UFC totales fue un método de elección para someterse a los siguientes análisis.

## Figura 8

*Procedimiento para el análisis de hongos y levadura del material lignocelulósico.*



*Nota:* Procedimiento de análisis a) tomas de muestras, b) preparación de medios, c) preparación de las diluciones seriadas y d) incubación de muestras en cajas Petri.

### **Aislamiento y Purificación de Cepas Mohos y Levaduras**

Todos los procedimientos de aislamiento se realizaron en el área designada del laboratorio de la cabina de seguridad microbiológica de clase I. El medio utilizado para el aislamiento de colonias de levaduras y mohos fue el SDA.

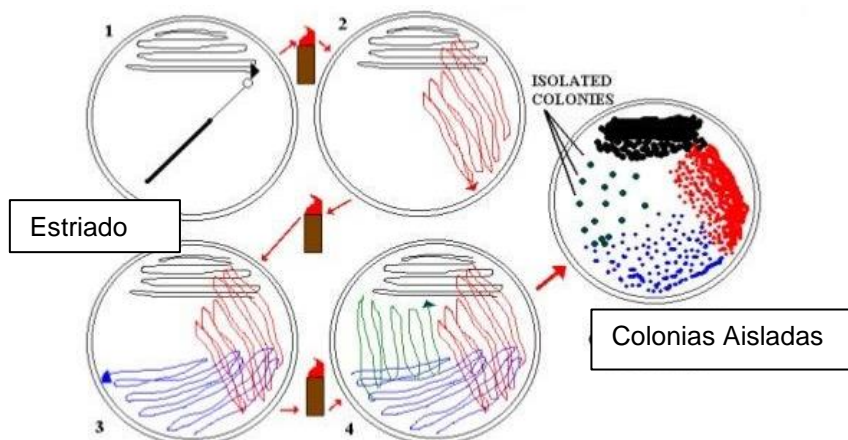
### **Colonias Puras de Levaduras**

Para la obtención de las colonias aisladas se utilizó el método de estriado en una placa de agar solidificado. Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el costado de la placa de agar mediante un asa de inoculación estéril. Luego se usó el asa para esparcir las bacterias en una dirección desde el sitio inicial de inoculación, moviendo el anillo de lado a lado, pasando por el sitio inicial. Después, se volvió a esterilizar el asa con la llama del mechero y luego se extendieron las primeras rayas. Esto se repitió dos o tres veces, moviéndose alrededor de la placa de agar (Figura 9).

Finalmente se vuelven a meter a incubación durante 48 h hasta que se logre visualizar colonias aisladas y sin contaminantes. El proceso se repite dos veces para garantizar un cultivo axénico.

### Figura 9

*Procedimiento de estriado en placa para el aislamiento de levaduras*

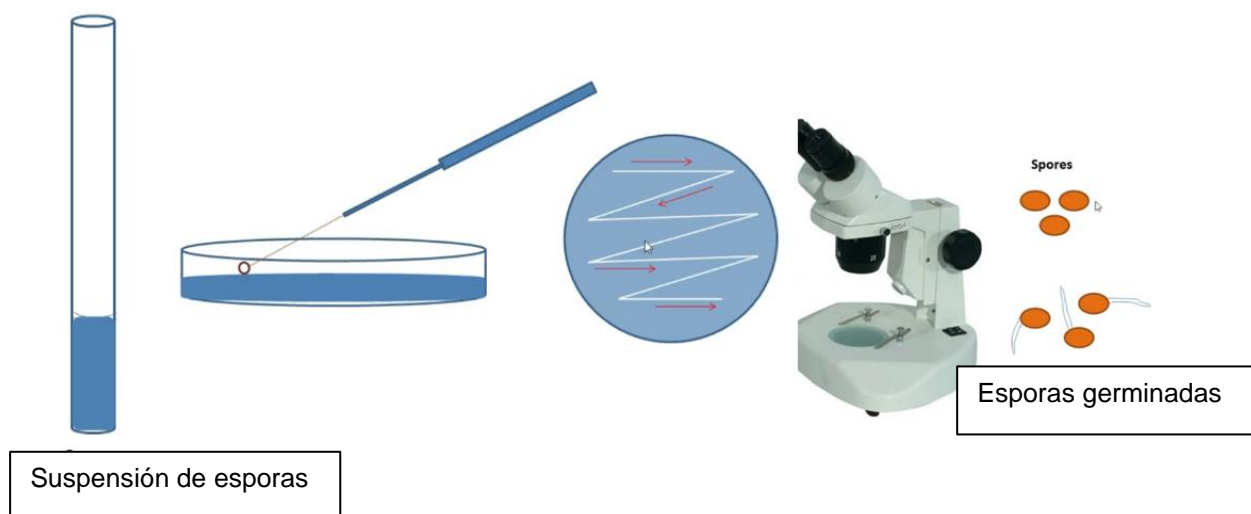


### Cultivo Monoespórico de Mohos

Se preparó una solución de esporas, partiendo de la observación macroscópica de las cajas de agar iniciales. Se tomó un pedazo de 1 cm<sup>2</sup> del moho en crecimiento y se lo sometió a la solución de DSP con tween al 0.1%, posteriormente se sometió a la maquina vortex durante 30 s con el fin de desprender el máximo número de hifas y esporas. La solución de esporas se diluyo hasta un factor de 10<sup>-3</sup> y se procedió a inocular en cajas SDA de forma de estrías desde el inicio superior de la caja hasta el inferior sin volver a pasar el asa. Después se incubó y se realizó visualización en el estereomicroscopio hasta observar la germinación de esporas. Finalmente se cortó el pedazo de agar con la espora germinada y se transfirió a un medio nuevo para su crecimiento y visualización (Figura 10).

## Figura 10

*Procedimiento para la obtención de cultivos monoespóricos de mohos.*



## Caracterización Morfológica de Cepas de Levaduras

Se comenzó con un estudio macroscópico a nivel de colonia en el medio de agar solidificado, tomando en cuenta las características morfológicas como: en base a color, textura, margen, elevación, topografía de la superficie y bordes de la colonia (Thapa et al., 2015).

Para el estudio de levaduras en el microscopio se inoculó con el asa una cepa aislada en agar en medio de caldo Sabouraud y se incubó a 27 (°C) durante 24 h. Luego se tomó 10  $\mu$ L del inóculo y se colocó en una placa portaobjetos. Después se procedió a con la metodología de la tinción Gram para dilucidar la morfología, composición de la pared celular, disposición de las células de levadura y la gemación (Thapa et al., 2015).



### **Caracterización Morfológica de Cepas de Mohos**

La identificación de hongos se lo realizó sobre la base de las características morfológicas de la colonia, los conidios y las células conidiógenas. Los mohos se caracterizaron al observar el desarrollo de hifas, que dan como resultado las características de las colonias que se observan en el laboratorio.

Para una caracterización de moho se basó en la metodología de Talaiekhosani, (2015) que establece el uso de montajes en placa (micro-cultivos) y la identificación por claves dicotómicas. Se tomaron las placas que contenían colonias de mohos en donde el margen produce activamente las esporas. Para preparar un microcultivo, en primer lugar, se utilizó el asa de laboratorio estéril, para tomar 2 mm<sup>2</sup> de la colonia de moho cerca del margen con una capa delgada de la superficie del agar. Luego se colocó una gota de suero fisiológico (8.5 g de cloruro de sodio en 1 L de agua destilada) como medio húmedo en un papel absorbente estéril en portaobjetos de microscopio. Se realizó con aguja de siembra un esparcimiento en todo el agar para que los filamentos estén bien dispersos. Si no se elimina un trozo de colonia de moho, aparecerá como un bulto opaco y solo brindará poca información. Después se colocó un cubreobjetos sobre el montaje que contiene un trozo de la colonia de moho, bajando un borde hacia el portaobjetos antes que el otro para que puedan escapar las burbujas de aire. Luego se incubo a 27 (°C) observando crecimiento micelar a partir de las 48 horas Finalmente mediante un microscopio se observó las características del microcultivo para establecer el uso de claves dicotómicas (Talaiekhosani & Mohanadoss, 2015).

### **Clave Dicotómicas para Identificación de Mohos.**

Las claves dicotómicas están diseñadas para funcionar mediante el descarte de los hongos más comunes o más esperados y relegando al final los menos comunes. Estos se componen de claves para varios grupos de géneros. El grupo I

contiene los géneros más comunes, el grupo II los que son un poco menos comunes y el grupo III los que son menos comunes aún, y así hasta el final. Se comenzó con la clave del grupo I. Todas las identificaciones se contrastaron con la descripción y la ilustración correspondientes que siguen a la clave.

### **Identificación Molecular de Mohos y Levaduras**

Para la identificación de las diferentes cepas de moho y levaduras a nivel de especie se optó por la aplicación de la técnica de secuenciación del gen ITS, que consta de los métodos de extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación.

#### **Extracción de ADN**

Para la extracción ADN de levaduras y mohos se empleó el protocolo de extracción de ADN propuesto por la empresa IDGEN. El protocolo consta de los siguientes procedimientos:

- En levaduras se tomó mediante un asa estéril, un crecimiento de cepa bacteriana aislada en forma de una bola de helado de aproximadamente de 50 mg. Para mohos se tomó un trozo de micelio (100 mg) en crecimiento activo mediante un corte directo a la placa. El resto del procedimiento se repitió en ambos microorganismos.
- La muestra de 50 mg se pasó a un tubo de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio estériles. Luego se adición 500  $\mu$ L de buffer de extracción (2.5 % p/v de Bromuro de cetiltrimetilamonio, 1.4 M de cloruro de sodio, 20 mM de ácido etilendiaminotetraacético, 100 mM de cloruro de trishidroximetil aminometano a pH 8) y 2  $\mu$ L de  $\beta$ .mercaptoetanol.
- Se agitó la muestra vigorosamente usando la maquina vortex con una velocidad máxima del equipo, el proceso se repitió dos veces, hasta que el analito quede pulverizado.

- Se incubó a baño María a 60 (°C) por 30 min, se hizo una mezcla por inversión cada 10 min.
- Se añadió 500 µL de cloroformo, congelado y se homogenizó en vortex por 30 s. Esta mezcla se dejó reposar por 3 min y se centrifugó a 14500 g durante 15 min y eliminando el sobrenadante.
- Se realizó dos lavados con etanol al 70% con 200 µL. Se pipeteó y descartó el etanol por inversión.
- Se secó el pellet durante 15 a 20 min, en cámara de flujo laminar.
- Resuspendió el pellet de ADN con 25 µL de agua DEPC, añadir 1 µL de RNAsa y se incubó con 30 min a 37 (°C).
- Se almacenó las muestras a -20 (°C) hasta su aplicación en la PCR.
- Para la visualización del ADN en un gel de agarosa al 1 %, con una corrida electroforética de 90 voltios durante 35 min con una solución tampón de TBE.

### **Amplificación de Secuencias**

Como un paso previo para la amplificación el ADN purificado se sometió a un análisis de espectrofotometría en el equipo NanoDrop y se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/µL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Con la técnica de PCR se amplificaron las copias del gen ribosomal para hongos y levaduras de la región ITS empleando los iniciadores universales ITS-1 e ITS-4. Para este procedimiento se utilizó los kits de amplificación provenientes de la empresa ABM mol. Los reactivos del kit se presentan en la Tabla 1 y el programa del termociclador se especifica en la Tabla 2.

**Tabla 1.**

*Reactivos empleados para la reacción de amplificación de la secuencia ITS por PCR*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad <math>\mu\text{L}</math></b>
Taq Buffer	10 X	2.5
Taq Polimerasa	5U/ $\mu\text{L}$	0.1
DNTPs (sATP, dGTP, dCTP, dTTP)	40 mM C/dNTP	0.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.75
Iniciador ITS-1	15 pMoles	0.6
Iniciador ITS-4	15 pMoles	0.6
Agua Ultra Pura		18.95
ADN		1
Total reacción por muestra		25

**Tabla 2**

*Secuencias de iniciadores empleados para la amplificación de la región ITS*

<b>Iniciador</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia</b>
ITS-1	Forward	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS-4	Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

**Tabla 3**

*Programa de amplificación en el termociclador*

<b>Ciclos PCR</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo</b>
25	95	6 min
	95	30 s
	55	30 s
	72	30 s
	72	10 min

### **Electroforesis y Secuenciación**

Mediante la preparación de un gel de 1.5 % de agarosa con Tris/Borato/EDTA 1X y 3  $\mu\text{L}$  de bromuro de Etidio en 60 mL de la solución, se empleó para poder visualizar los amplicones de la técnica de PCR. Para poder migrar el amplicón se tomó 10  $\mu\text{L}$  junto con 2  $\mu\text{L}$  de tampón TBE y se colocaron en la cámara para la corrida electroforética durante 35 min y voltaje de 100 V. Luego se empleó el transiluminador UV, con la finalidad de observar el producto de la amplificación. La secuenciación se estableció con los parámetros de la empresa, con 20  $\mu\text{L}$  de muestra de PCR que fueron

purificados por el método SANGER. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos. Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

## **Diseño Estadístico**

### **Mohos y Levaduras Aislados por Medios de Cultivo.**

Para establecer las unidades formadoras de colonia presentes en medios de cultivo y establecer un rango de trabajo óptimo se realizó un análisis inferencial en donde se usó prueba no paramétrica de Kruskal Wallis que permite evaluar los diferentes niveles del factor de dilución ( $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ ) junto con los medios de cultivo (RBA, SDA y PDA). Las variables se midieron luego de 5 días con un triplicado. La variable de respuesta será las UFC totales en cada placa. La prueba estadística discernió el medio de cultivo y el factor de dilución óptimos para el uso en los siguientes análisis.

### **Identificación Molecular de Especies de Mohos y Levaduras**

La estadística de chi-cuadrado se utiliza para comparar la frecuencia de observación de dos variables categóricas y determinar su independencia (Mendivelso & Rodríguez, 2018). El proyecto de investigación describe el uso de estadísticas de Fisher para probar la hipótesis de la relación entre las variables; organismos presentes en el material lignocelulósico versus su identificación mediante técnicas moleculares. Se utilizará como variable de investigación aquellas especies que tengan un porcentaje de similitud superior al 97 % tomando un valor de uno y su opuesto con un valor de cero. Como conclusión se obtuvo la probabilidad de que las especies pueden ser la relación por técnicas moleculares. Para los análisis estadísticos se usó el software de programación R Studio.

## Capítulo IV: Resultados

### Pruebas de Ambiente de Laboratorio

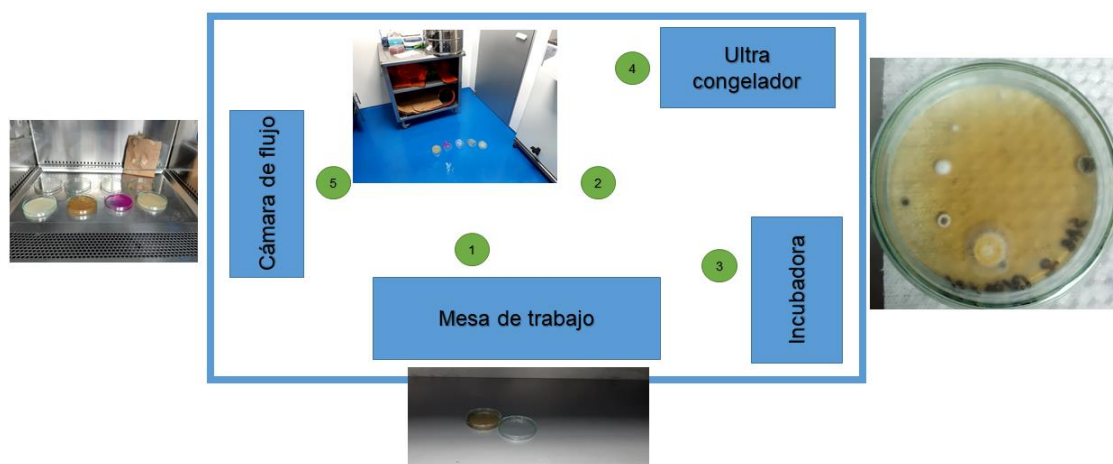
Las placas de agar, después de incubación mostraron crecimiento de diferentes cepas, de bacterias y mohos. Se prosiguió con el recuento de las colonias (UFC) en los diferentes puntos de análisis. La carga microbiana presente en el ambiente se determinó con la ecuación descrita por Cepeda (2019), nos indica los UFC por metro cubico de aire:

$$N = 5 \times a \times 10^4 (b \times t)^{-1}$$

Donde “N” es la concentración microbiana media en UFC/m<sup>3</sup>, “a” es el conteo de colonias por placa Petri, “b” es el área superficial de la placa que es igual a “r<sup>2</sup> x π” y “t” el tiempo de exposición en minutos. A continuación, se muestra los datos registrados en la Figura 11 y la Tabla 4.

### Figura 11

*Puntos de muestreo para análisis de pruebas ambientales y esterilidad de la cámara de flujo.*



*Nota:* Los indicadores 1 al 5, son los puntos en donde se colocaron los medios de cultivo para las pruebas ambientales. A la derecha se observa las UFC después de incubación.

**Tabla 4**

*Análisis de UFC en pruebas ambientales en escala logarítmica.*

<b>Ubicación</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>UFC</b>	<b>UFC/m<sup>3</sup></b>
1 Mesa de trabajo	PDA	13	170
1 Mesa de trabajo	RBA	6	79
1 Mesa de trabajo	TSA	13	170
2 Suelo de laboratorio	PDA	9	118
2 Suelo de laboratorio	RBA	14	183
2 Suelo de laboratorio	PDA	9	118
3 Incubadora	PDA	6	79
3 Incubadora	RBA	14	183
3 Incubadora	TSA	6	79
4 Ultracongelador	PDA	16	210
4 Ultracongelador	RBA	11	144
4 Ultracongelador	TSA	12	157
<b>Promedio</b>			<b>141</b>
5 Cámara de flujo	PDA	0	0
5 Cámara de flujo	RBA	0	0
5 Cámara de flujo	TSA	0	0
<b>Promedio</b>			<b>0</b>

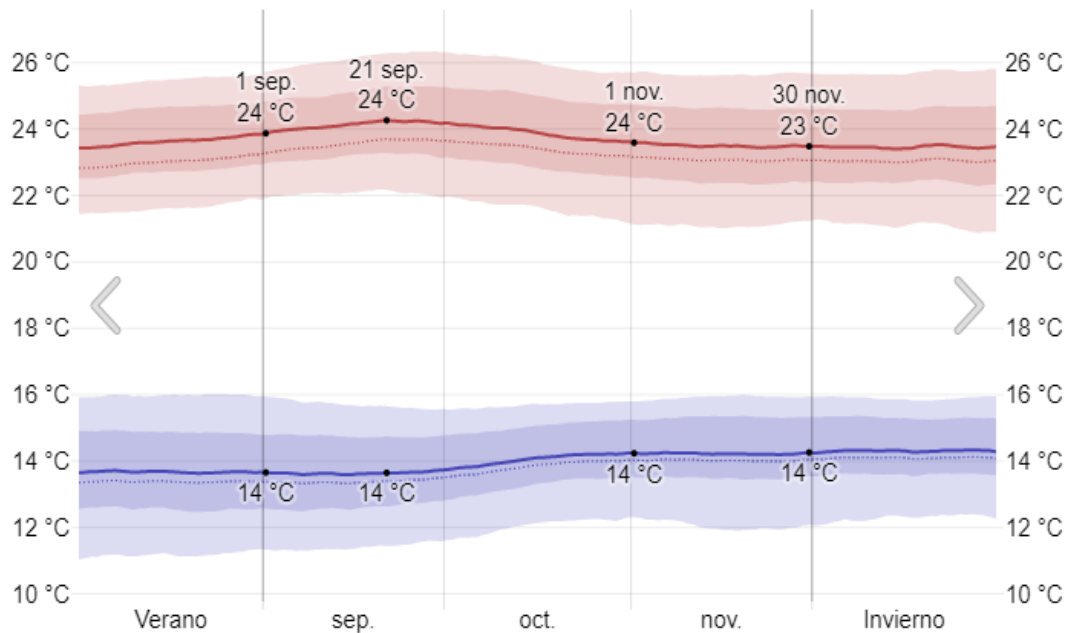
Los resultados de los estudios muestran que los puntos de análisis que se encuentran en el laboratorio del IANCEM (punto 1 a 4) presentan de 6 a 16 colonias que comprende a los organismos de bacterias y mohos, dando un promedio de carga microbiana de 141 UFC/m<sup>3</sup> de aire. La prueba de esterilidad de la cámara de flujo muestra una carga microbiana nula, estableciendo que el ambiente es estéril e idóneo para trabajar.

### **Muestreo del Material Lignocelulósico**

Mediante la aplicación Weather Spark meter se obtuvo un monitoreo de la temperatura del área de campo arrojando un promedio de 24 (°C) con picos de bajada de 13 (°C) y picos de subida 26 (°C), (Figura 11).

**Figura 12**

*Temperatura promedio de la localización de campo Ibarra, Ecuador en los meses de estudio.*



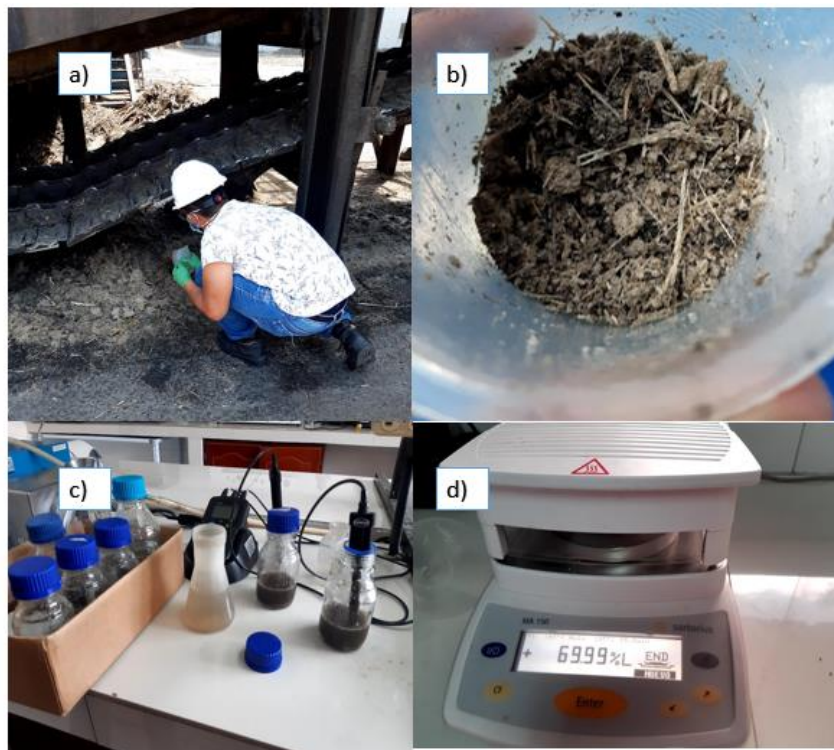
*Nota:* Los datos se tomaron mediante la aplicación Weather Speak, 2021.

Del muestreo que se realizó en el área de los molinos del IANCEM, se obtuvieron de forma aleatoria 5 submuestras que se sometieron a pruebas tanto de porcentaje de humedad y pH (Tabla 5). La descripción de la materia se indica como pequeñas partículas, compuestas de fibras de unos 0.4 cm de largo, presentan un color grisáceo y con ligero olor a alcohol. Como las submuestras indican homogeneidad se procedió a realizar analito compuesto mediante agitación mecánica.



### Figura 13

Recolección de muestras de material lignocelulósico en el área de los molinos del IANCEM.



*Nota:* Las fotos indican; a) la recolección de las submuestras, b) descripción física de la marmaja, c) medición del pH de las muestras y d) análisis de humedad de las muestras.

**Tabla 5**

*Parámetros físicos de la toma del material lignocelulósico.*

<b>Código</b>	<b>Peso gramos</b>	<b>pH</b>	<b>% de humedad</b>
ML1	99.8	6.8	69.99
ML2	100.5	6.9	70.00
ML3	98.5	6.4	70.23
ML4	97.7	6.8	71.3
ML5	99.2	6.7	70.5

*Nota:* Las muestras fueron tomadas en las coordenadas N 0°21'47.86596" y W

78°6'47.88648 de Ibarra Ecuador.

## Mohos y Levaduras Aislados por Medios de Cultivo

### Análisis Estadístico de UFC Presentes en Diluciones Seriadas

Para establecer el factor de dilución y el medio de cultivo a utilizar para emplearse en los aislamientos y análisis de identificación se propuso evaluar la variable de respuesta mediante un análisis de normalidad para establecer la prueba paramétrica o no paramétrica correspondiente. La utilización de la prueba de Shapiro-Wilk y el gráfico de QQ-Plot permitieron evaluar la hipótesis de normalidad de los datos (Figura 13).

**Tabla 6**

*Diseño de estudio para determinar el medio de cultivo y el factor de dilución de trabajo*

Factor Dilución \ Medio	PDA	SDA	RBA
	100	77	200
3	74	76	150
	70	74	130
	27	31	137
4	40	33	180
	28	34	145
	1	16	34
5	1	20	25
	5	18	40
	0	4	11
6	1	7	0
	2	9	25

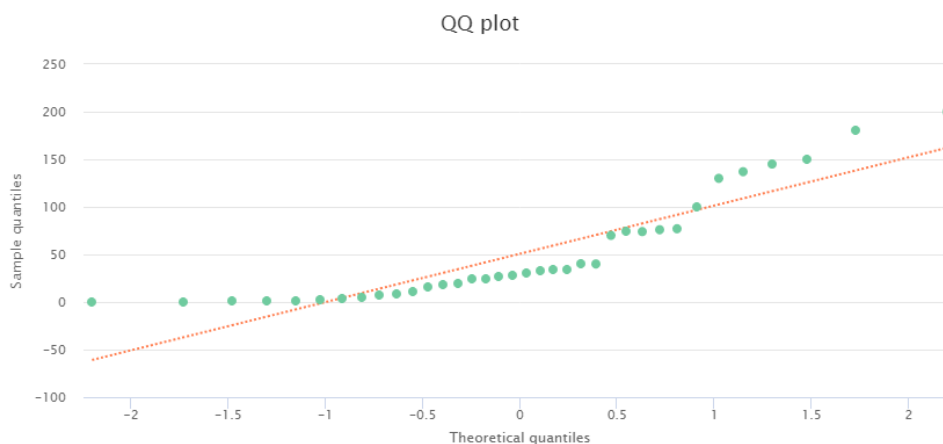
*Nota:* La variable de respuesta son las UFC totales (mohos y levaduras) medidas luego de 5 días de crecimiento.

Se realizó una prueba de Shapiro para una muestra en la que la variable de respuesta fue significativa (estadística  $W = 0.82984$ ,  $p\text{-value} = 0.00006758$ ). La distribución de la variable respuesta, por lo tanto, es significativamente diferente de una distribución normal con la misma media y varianza.

La Figura 14 al no presentar que los puntos se encuentran cercanos a línea central se concluye que los datos no siguen una normalidad, lo que nos permite utilizar pruebas no paramétricas.

### Figura 14

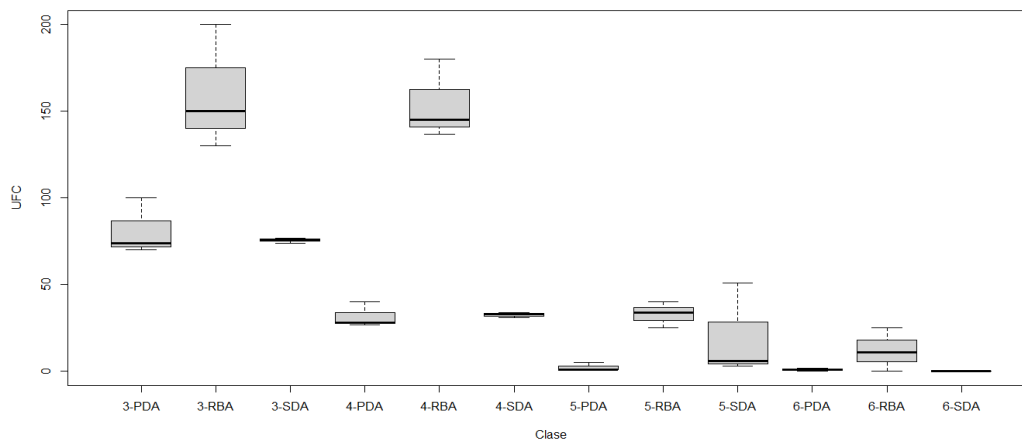
*Gráfico de cuantiles para visualizar la normalidad de los datos.*



Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis de los datos de la Tabla 6 con resultados chi-squared = 32.123, df = 11 y p-value = 0.0007288. La distribución de la variable respuesta, y p-valor es significativamente inferior al nivel de significancia de 0.05. Por lo tanto, podemos concluir que existe algún tratamiento diferente entre el estudio. Mediante un estudio de homogeneidad de los tratamientos se determinó qué medio de cultivo y que factor de dilución son los más homogéneos para poder trabajar en los aislamientos de levaduras y mohos.

## Figura 15

Gráfico de caja y bigote para visualizar la homogeneidad de los tratamientos.



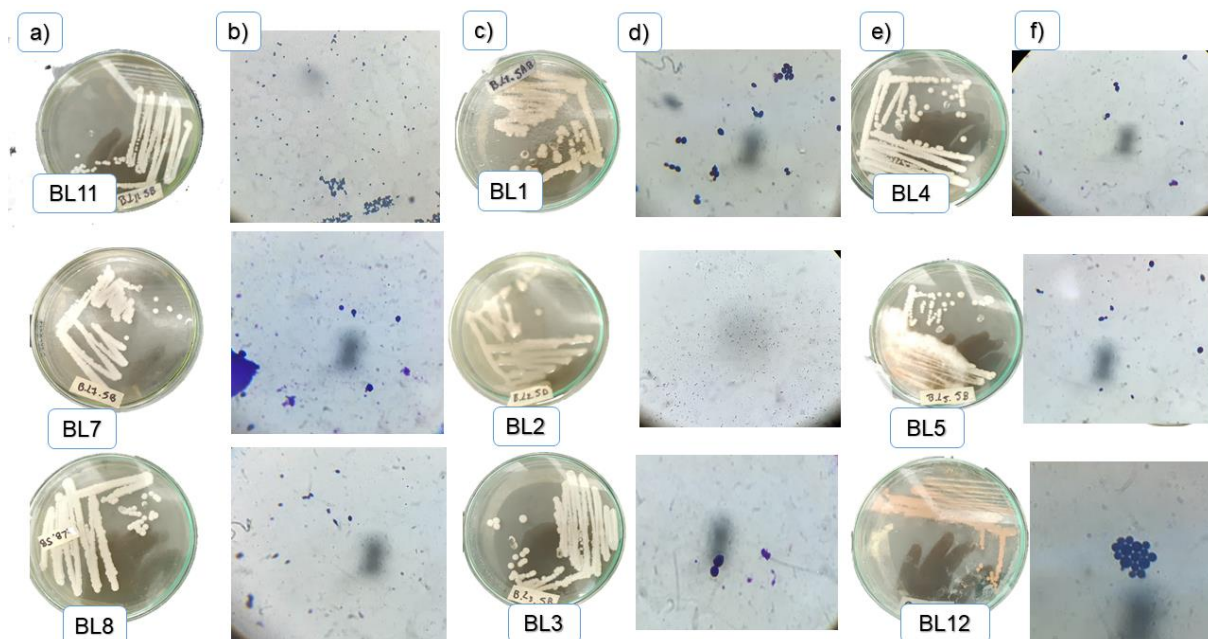
La Figura 15 de caja de bigote nos indica que entre más homogénea la muestra menos sesgo presentan sus resultados. Con esto podemos concluir que los tratamientos con un factor de dilución  $10^3$ ,  $10^4$  y con medio de cultivo SDA presentaron una varianza de datos cercanos a la media, convirtiéndolos en los resultados para obtener aislar las cepas de estudio.

### Aislamiento de Levaduras

Mediante la técnica de estrías en placa se pudo aislar 18 cepas de levaduras de las cuales, se estudiaron por técnicas como: la observación macroscópica, tinción de Gram y la identificación molecular por amplificación del código de barra ITS. En la Figura 15 y Tabla 7 se muestra un ejemplo de las levaduras que fueron sometidas a identificación.

**Figura 16**

*Aislamientos de cepas de levaduras en SDA y visualización en el microscopio.*



*Nota:* Se muestran que a), c), y e) son las columnas donde se observan los aislamientos de colonias de levadura y b), d), y f) son las columnas de visualización al microscopio con la tinción Gram a 400x.

**Tabla 7**

*Descripción de levaduras aisladas mediante técnica de estría en placa y observación en el microscopio.*

Código	Tinción Gram	Descripción
BL3	Positiva-violeta	M En SDA mostraron un color blanco a crema, con una textura cremosa y apariencia suave y pueden tener bordes ligeramente arrugados.
		m Las células Gram positivas esféricas u ovoides, que se encontraban en grupos de a pares o solos, midiendo un aproximado de 4-8 × 5-11 μm.
BL4	Positiva-violeta	M En medio de crecimiento SDA, se presentaron como una colonia blanquecina, lisa, plana, seca.
		m Células Gram positivas se visualizaron como ovoides, solas o con yema.

Código	Tinción Gram	Descripción
BL6	Positiva-violeta	M Sus colonias en medio SDA fueron aspecto de color blanco a crema lisas, glabras, similares a levaduras.
		m Son células Gram positivas y blastoconidios de gemación esferoidales a elipsoidales, de 3,0-6,5 x 2-5,5 $\mu\text{m}$ de tamaño. No se detectaron pseudohifas.
BL7	Positiva-violeta	M Su morfología en medio SDA se presentó de forma globular-oval contrastando de menor tamaño que las levaduras <i>S. cerevisiae</i> . Mostraron una coloración blanquecina con estrías en que recorre cada colonia
		m Son células Gram positivas formando blastoconidios de gemación esféricos a elipsoidales, de 2-6 x 3-7 $\mu\text{m}$ de tamaño.
BL8	Positiva-violeta	M Las características de colonia en medio SDA presentaron coloración blanca a crema, con aspecto suave, tonalidad opaca y ligeramente arrugada.
		m Son células Gram positivas que presentan una gemación multilateral; Elipsoidal a cilíndrico, (2,4-6,4) x (3,2-7,2) $\mu\text{m}$ , pudiendo mostrar pseudohifas.
BL9	Positiva-violeta	M En medio de cultivo SDA, se mostraron como una colonia de color negro, con ciertas vellosidades que se encuentran al margen. Es de aspecto rugoso pero sin formar estrías.
		m Son células Gram positivas, que presentan gemaciones y se encuentran de forma separada.
BL11	Positiva-violeta	M Las características de colonia en medio SDA son de color blanco a crema en los bordes, suave, opaco, ligeramente arrugado, presentando una punta blanca por colonia.
		M Son Gram positivas, formando blastoconidias ovales con una gemación encontrándose en grupos de dos células.
BL12	Positiva-violeta	M El cultivo en estría es rosado, butiroso, brillante, liso y con un margen entero ligeramente lobulado.
		M Las células son de cilíndricas a baciliformes, de 2-3x6-9 $\mu\text{m}$ , se presentan solas o en parejas y la brotación es polar.

Mediante una revisión bibliográfica cumpliendo con los objetivos de investigación de la empresa, se seleccionaron aquellas cepas que cumplieron con características de

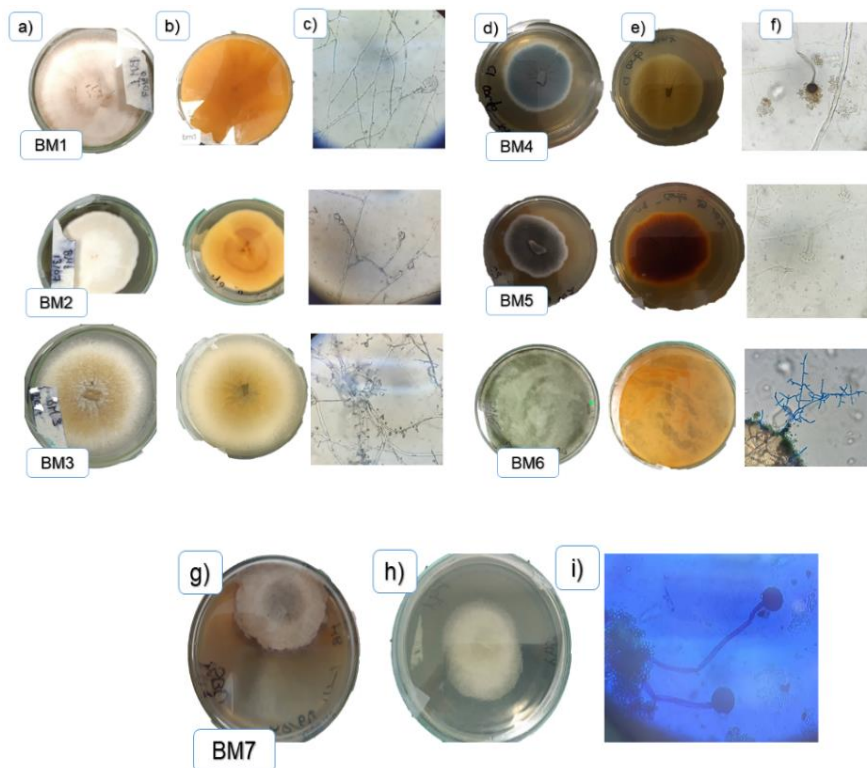
géneros de interés como *Candida*, *Pichia*, y *Saccharomyces*. Obteniéndose un total de ocho cepas de levaduras que se sometieron a identificación molecular por método del Barcoding del gen ITS.

### **Aislamiento y Caracterización Morfológica de Mohos**

Con los aislamientos obtenidos por el método cultivo monoespórico y la visualización de microcultivo en el microscopio, se procedió con la descripción de los microorganismos. Mediante la observación macroscópica se elaboró una descripción de los aspectos de tamaño, forma de la cepa, aspecto color del micelio aéreo y vegetativos y si existe liberación de pigmento en el medio de agar. Luego mediante la utilización de claves dicotómicas se obtuvo una descripción microscópica con una posible identificación a nivel de género. En la Figura 17 y Tabla 8 se muestra aquellas especies que se aislaron del material lignocelulósico.

**Figura 17**

*Visualización macroscópica y microscópica de cepas de mohos obtenidas del material lignocelulósico.*



*Nota:* Las columnas a), d) y g) muestran la vista macroscópica de los mohos de la parte frontal, las columnas b), e) y h) la parte posterior y las columnas c), f) e i) muestran las vistas microscópicas a 400x de cada cepa.



**Tabla 8**

*Descripción macroscópica y microscópica de los hongos aislado del material lignocelulósico.*

<b>Cod.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Posible identificación</b>
M	Presentaron colonias de rápido crecimiento con un micelio aéreo afieltrado. La pigmentación fue de pálido a rosa y se presentó puntos viscosos en el cultivo.	
BM1	El conidio o macroconidio es fusiforme, multicelular por tabiques transversales, con una característica célula basal en forma de pie y una célula apical puntiaguda o en forma de látigo. Estos son en su mayoría se encuentran agrupados de tres a cinco células, de forma a fusiformes.	<i>Fusarium</i> sp.
M	Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observó un crecimiento que ocupa tres cuartas partes de la placa, posee un aspecto liso sin la formación algodonosa. Presentó una coloración blanca con una degradación a gris a medida que se aleja del centro. En la parte posterior se mostró una coloración blanca, pero se presenta un anillo de color marrón que rodea el centro de la cepa.	
BM2	Mediante tinción azul lactofenol se mostraron fiálides solitarias o débilmente ramificadas que se estrechan a partir de filamentos vegetativos y portan un grupo húmedo de esporas en su mayoría unicelulares. Los filamentos a veces se unen en cuerdas de varias celdas de diámetro. Son conidios incoloro y fiálides no pigmentados.	<i>Acremonium</i> sp.
M	Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observó un crecimiento que ocupa la totalidad de la placa, posee un aspecto granuloso, pero sin la formación algodonosa. Presentó una coloración blanca en los bordes de la placa y en el centro un verde olivo con copos blancos. En la parte posterior se mostró una coloración blanca en los bordes la placa pero se presenta un halo verde olivo en el interior.	
BM3	Mediante tinción azul lactofenol se mostraron conidióforos desarrollados, incoloros, simples o ramificados, que llevan de dos a varias fiálides. Las fiálides están hinchados en la	<i>Paecilomyces</i> sp.

Cod.	Descripción	Posible identificación
BM4	<p>base y se estrechan gradualmente en un pico largo. Las esporas se producen en cadenas a partir de las puntas de las fiálides.</p> <p>Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observa un crecimiento que ocupa la mitad de la placa, posee un aspecto liso granuloso, pero con estrías en sentido radial. Presentó una coloración azul marina y un borde blanco. En la parte posterior se mostró una coloración blanca pero presentó estrías en toda la cepa.</p> <p>Mediante tinción con hidróxido potasio se presentaron conidióforos que surgen de una célula con cabeza bien definida y terminan en una vesícula hinchada que contiene fiálides en forma de manojo. Las fiálides pueden estar directamente sobre las métulas intermedias. Las esporas presentaron un color oscuro marrón.</p>	<i>Aspergillus sp.</i>
BM5	<p>Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observa un crecimiento que ocupa la mitad de la placa, posee un aspecto liso granuloso, pero con estrías en sentido radial. Presentó una coloración grisácea y un borde blanco. En la parte posterior se mostró una coloración café oscura y liberación del pigmento en el medio sólido.</p> <p>Mediante tinción con hidróxido potasio se presentaron conidióforos que surgen de una célula con cabeza bien definida y terminan en una vesícula hinchada. Las fiálides se encontraron sobre las métulas intermedias. Las esporas se ubican en las puntas de las fiálides que presentan una coloración azulada transparente.</p>	<i>Aspergillus sp.</i>
BM6	<p>Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observa un crecimiento que ocupa toda la placa con aspecto de micelio algodonoso. Presentó una coloración verde cubierta de copos blancos. En la parte posterior se mostró una coloración blanca que cubre toda la placa.</p> <p>Con tinción de lactofenol se presentaron conidióforos bien desarrollados con un eje central de crecimiento y formando un racimo de hifas septadas. Con esporas unicelulares aisladas.</p>	<i>Trichoderma sp.</i>

<b>Cod.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Posible identificación</b>
BM7	<p>M Luego de 5 días de crecimiento en medio SDA en la parte frontal se observa un crecimiento que ocupa la mitad de la placa, posee micelio algodonoso. Presentó una coloración café en los bordes con una centro negro y puntos oscuros en toda la cepa. En la parte posterior se mostró una coloración pero existe la liberación de un pigmento marrón en el medio sólido.</p> <p>m Con tinción de lactofenol se caracterizaron esporangios oscuros que contienen esporas oscuras y una columela grande. En la base de los esporangios hay rizoides.</p>	<i>Rhizopus</i> sp.

*Nota:* Se muestra una descripción de las cepas aisladas de la Figura 15. Donde “M” indica descripción macroscópica y “m” microscópica.

El uso de calves dicotómicas permite obtener identificación a nivel de género y en algunas ocasiones a nivel de especie, dado a que esta técnica depende de la experticia del investigador se debe optar por técnicas de identificación molecular que se consideran el Gold estándar en estos procesos. Debido a los recursos financieros del proyecto se tomaron las cepas con codificación BM1, BM2, BM3 y BM6 para su posterior análisis e identificación por Barcoding ITS4.

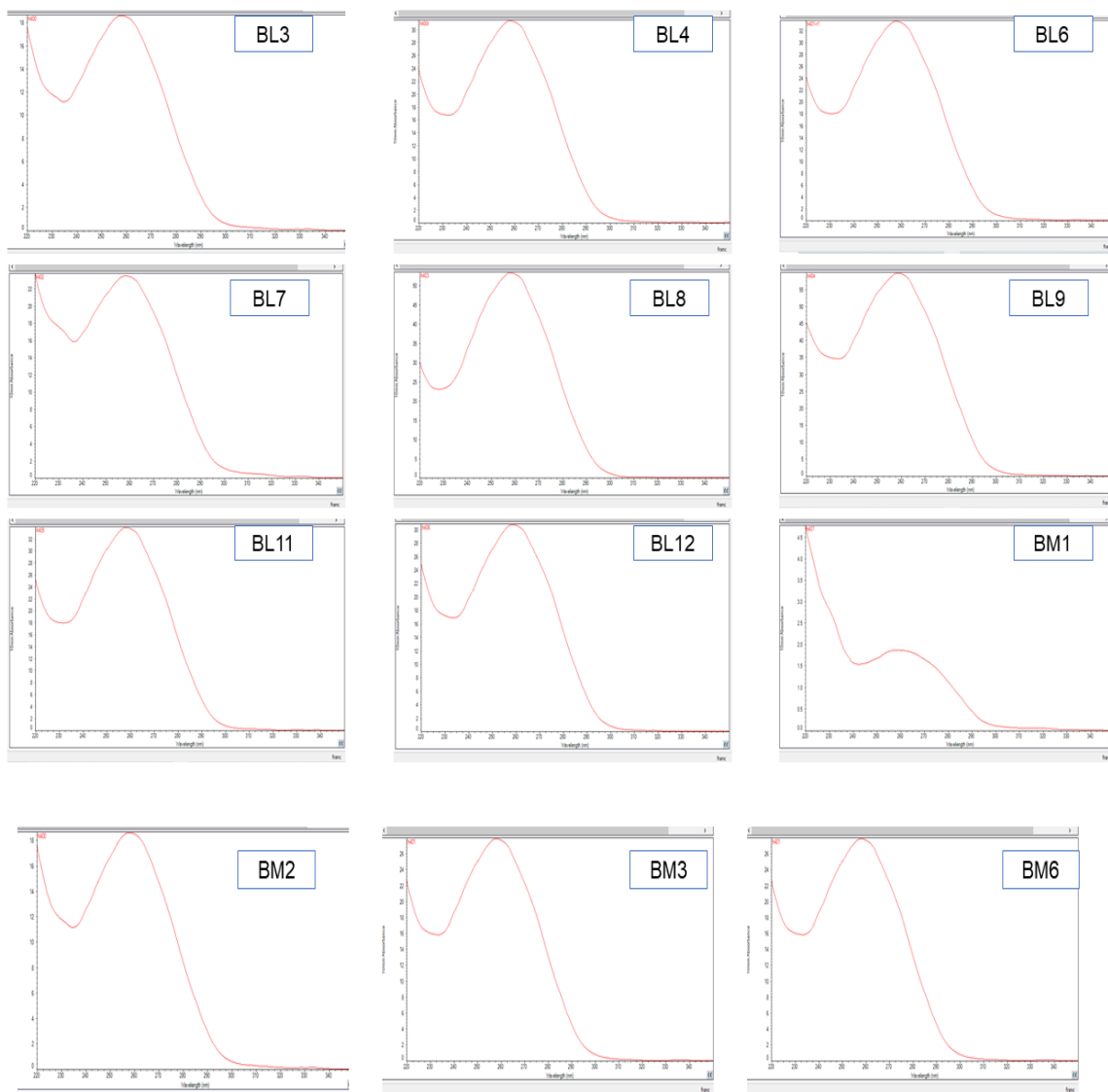
## **Identificación Molecular de Mohos y Levaduras**

### **Extracción de ADN**

Mediante la metodología empleada por el laboratorio IDgen se obtuvo ADN con diferentes calidades y concentraciones. Para lo cual mediante el uso del nanodrop se obtuvieron mediciones con longitud de onda en los rangos de 230 a 280, pudiendo verificar la calidad del ADN de las muestras de levaduras y mohos (Figura 17 y Tabla 9). Se obtuvo una muestra viable para el proceso de PCR, cuando concentraciones de ADN se diluyeron a un valor menor o igual de 200 ng/μL.

**Figura 18**

*Espectro de absorción obtenido mediante espectrofotometría de las muestras de ADN de las cepas de levaduras y mohos.*



*Nota:* las longitudes de onda se encuentran en el eje de las abscisas y la su absorbancia en eje de las ordenadas. Las designaciones con “BL” corresponden a levaduras y las “BM” a mohos.

**Tabla 9**

*Valores de la absorbancia obtenido por el nanodrop.*

<b>Cod.</b>	<b>ADN ng/μL</b>	<b>A260 (Abs)</b>	<b>A280 (Abs)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
BL3	926,3	18,525	8,448	2,19	1,57
BL4	1386,4	27,728	13,175	2,1	1,73
BL6	1171,4	23,427	11,92	1,97	1,33
BL7	2653,7	53,073	23,514	2,26	2,28
BL8	2987,6	59,752	29,544	2,02	1,71
BL9	1686,9	33,739	15,354	2,2	1,87
BL11	1533,9	30,678	14,935	2,05	1,78
BL12	55	1,099	0,713	1,54	0,71
BM2	1561,4	31,229	14,411	2,17	1,85
BM3	93,3	1,866	1,127	1,66	0,66
BM6	1669,2	33,383	15,478	2,16	1,85

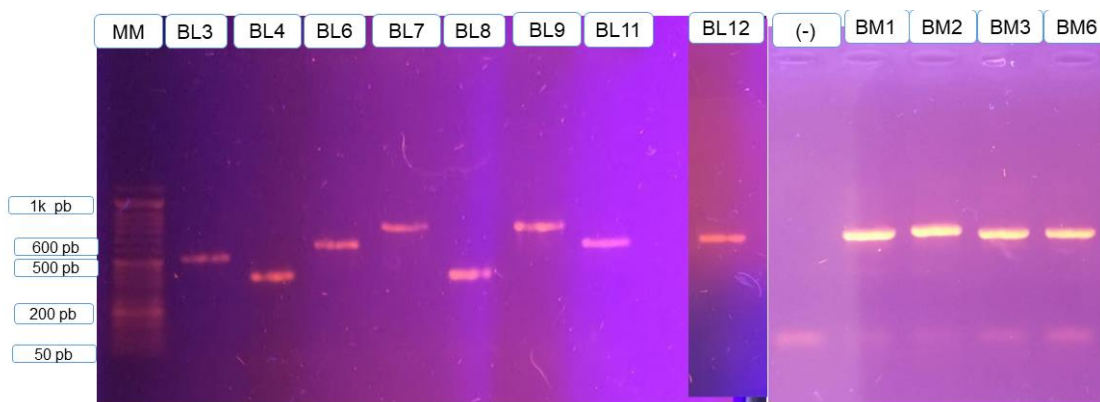
*Nota:* Los valores A260 y A280 se refieren a la medición de longitud de onda que cuantificaron el contenido de ácidos nucleicos y proteínas respectivamente. Mientras que los valores de absorbancia A230 midieron la interferencia de minerales y alcohol en las muestras de ADN extraídas.

### **Amplificación del Espaciador Interno Transcrito**

Mediante la amplificación por la técnica de PCR del segmento ITS se ensamblaron fragmentos de un tamaño aproximado de 500 a 600 pb. Estos fragmentos junto a un marcador de peso molecular (marca comercial ABM 100 pb Opti-DNA Maker) se lograron visualizar a través de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (Figura 19).

**Figura 19.**

Visualización en gel de agarosa 1% en el transiluminador UV de la del amplicón ITS1-ITS4.



*Nota:* los códigos de “MM” corresponden al marcador molecular de marca comercial, “BL” a las cepas de levaduras, “BM” a las cepas de mohos y “(-)” el control negativo.

En el gel de agarosa se comprobó que las reacciones de PCR se realizaron de forma óptima dado a que no se mostraron signos de bandas opacas, dobles o difuminadas. Mediante la amplificación y visualización del barcoding de levaduras se obtuvo que las cepas con designación BL3 y BL4 presentaron un tamaño menor 400 pb, mientras que las BL6, BL8 y BL12 mostraron un tamaño de entre 550 a 600 pb y los organismos BL7, BL9 y BL11 manifestaron secuencias superiores a 600 pb. Las cepas de mohos BM1 y BM6 presentaron uniformidad en su fragmento de ácidos nucleicos con una extensión de 500 pb mientras que BM2 y BM3 tuvieron un tamaño mayor a 600 pb.

**Ensamblaje de Secuencias y Búsqueda BLAST**

Los resultados de secuenciación de las 12 muestras fúngicas se muestran en la Tabla 10, y mediante la utilización de programas bioestadísticos de Open Source se lograron alinear generando secuencias consenso de alta calidad. Las secuencias de fueron alineadas debido al “emparejamiento” de los contigs en la comparación entre las

secuencias forward y reverse. La identificación de la muestra se realizó utilizando la secuencia correspondiente al amplicón del primer ITS1, que mostró una mayor calidad de secuencia y mediante una búsqueda blast se reflejaron aquellas especies que contenían un valor alto en el parámetro de “Query” mayor a 97%, que acepta como criterio de identificación.

**Tabla 10**

*Secuencias de microorganismos fúngicos y su identificación mediante búsqueda*

*BLAST.*

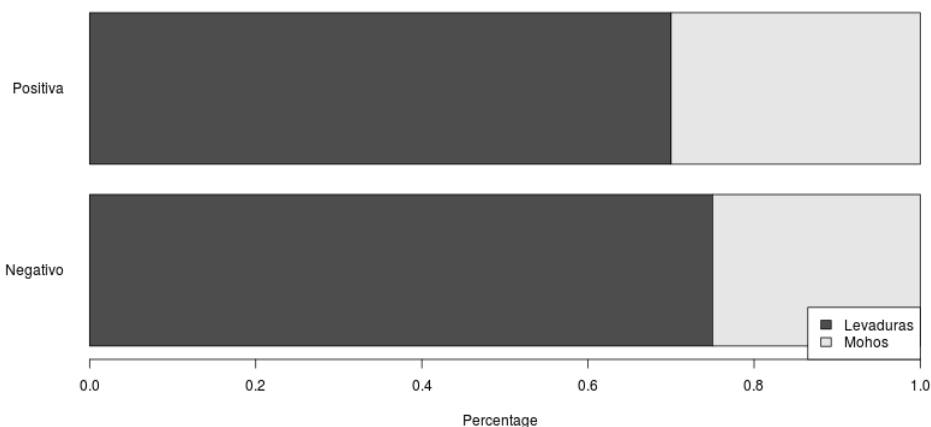
<b>Código original</b>	<b>Longitud</b>	<b>% de Calidad</b>	<b>Organismo</b>	<b>Frag-mento</b>	<b>% de identidad</b>	<b>Nº Accesoión</b>
BL3	384	96.4	<i>Candida tropicalis</i>	ITS	99.22	KY102470.1
BL4	352	97.4	<i>Candida pseudointermedia</i>	ITS	98.30	MK394147.1
BL6	585	100	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	ITS	100	MK394133.1
BL7	764	96.9	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	ITS	99.74	MK394138.1
BL8	567	55.6	<i>Candida intermedia</i>	ITS	92.48	KP860054.1
			<i>Candida</i> sp.		92.48	HQ631029.1
BL9	764	98.2	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	ITS	99.84	MK394138.1
BL11	603	99.2	<i>Candida diddensiae</i>	ITS	100	MK394116.1
BL12	577	98.4	<i>Rhodosporidiobolus nylandii</i>	ITS	99.09	NR_163534.1
BM1	492	99.4	<i>Fusarium</i> sp.	ITS	100	KX496881.1
BM2	705	94.2	<i>Sarcopodium</i> sp.	ITS	99.80	MT747419.1
BM3	625	94.7	<i>Paecilomyces sinensis</i>	ITS	100	EU272527.1
			<i>Paecilomyces maximus</i>		100	MN044952.1
M6	515	98.8	<i>Trichoderma</i> sp.	ITS	100	MT160868.1

## Análisis Estadístico

Para contrastar la hipótesis alternativa “Del material lignocelulósico de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) procedente del área de los molinos del Ingenio Azucarero del Norte, se pueden aislar e identificar molecularmente mohos y levaduras” se somete a una prueba estadística de conocida como el test exacto de FISHER. En donde la hipótesis de investigación indica la relación entre los microorganismos y poder identificar molecularmente (Figura 20).

### Figura 20

*Análisis estadístico de prueba de la interacción entre el microorganismo y su identificación.*



*Nota:* El gráfico de barras donde los valores muestran el porcentaje de cepas que son identificadas correctamente.

La prueba de test exacto de Fisher  $p\text{-value} = 0.0101$  nos indica que se rechaza la hipótesis nula ( $p\text{-valor} < \text{nivel de significancia}$ ) e inferimos que existe una relación entre los organismos que se pueden identificar por técnicas moleculares. Luego se establece el valor de asociación mediante un estudio de fuerza planteado por Cramer, en donde nos arroja el estadístico “Cramer's  $V=0.837$ ” indicando que tiene una relación elevada el uso del Barcoding para identificar molecularmente, los mohos y levaduras presentes en el material lignocelulósico.



## **Capítulo V: Discusión**

En la provincia de Imbabura la empresa IANCEM se considera como la principal productora de azúcar, pero presentan un problema con su materia prima por la generación de subproductos como miel de caña y material lignocelulósico que no son aprovechados en su totalidad debido a sus grandes producciones. El material lignocelulósico de caña de azúcar es el principal subproducto de la industria de la caña de azúcar y debido a su composición rica en azúcares y disponibilidad, puede servir como un sustrato ideal para procesos microbianos en la producción de productos con valor agregado (Singh Nee Nigam & Pandey, 2009). El estudio se aplicó como una manera preliminar de encontrar organismos del reino fungí que sean óptimos para biofábricas y que asimilen el sustrato de fibra de caña como una biomasa de partida.

### **Pruebas Ambientales y Carga Microbiana**

Para realizar una correcta investigación sobre el estudio de microorganismos, se debe tener una constancia de las condiciones con las que se presentan en el laboratorio para no producirse contaminaciones cruzadas por la carga microbiana ambiental. De igual manera al trabajar organismos como los hongos filamentosos se debe tener cuidado con el fin de no contaminar el área ni el personal. Como una de carga microorganismos presente en el laboratorio del IANCEM se obtuvo 140 UFC/m<sup>3</sup> de aire en los cuales se presentaron crecimiento de mohos y bacterias a diferencia de la cabina de flujo laminar que mostraron resultados nulos. La esterilidad de la cabina de bioseguridad es de vital importancia en el estudio ya que se puede obtener organismos aislados de manera axénica.

Según diversos estudios los hongos son transportados por el aire esparciendo sus esporas en el ambiente. Cuando se realiza controles de ambiente en salas de hospitales se considera una gran abundancia de contaminantes, si el método de control

ambiental de placa abierta proporción valores de crecimientos superiores a 50 UFC por placa o una carga ambiental mayor a 500 UFC/m<sup>3</sup> de aire (Alya et al., 2019).

Reflejando que la carga microbiana de 140 UFC/m<sup>3</sup> procedente del laboratorio del IANCEM está por debajo de los valores causantes de contaminación cruzada y afectaciones a la salud respiratoria.

Los géneros de hongos más dominantes en estudios ambientales son los *Aspergillus* y *Penicillium* debido a la capacidad de sus esporas para propagarse fácilmente en diversos entornos aeróbicos. En particular, *Aspergillus* se caracteriza por la producción de pequeñas esporas conidiales que están muy extendidas en el ambiente aéreo de las regiones tropicales (Cepeda et al., 2019). Sin embargo, se sugiere que las esporas de hongos presentes en el ambiente del laboratorio se propagan desde el exterior al interior por los sistemas de ventilación.

### **Plan de Muestro de Material Lignocelulósico**

Las comunidades bacterianas y fúngicas de los materiales de desecho agroindustriales han sido reconocidas durante mucho tiempo como componentes importantes del ecosistema, pero no han sido foco de estudio. Los muestreos para análisis microbiológico han consistido típicamente en una baja replicación de muestras recolectadas al azar. En el proyecto de investigación se optó por un muestreo aleatorio simple que permite tener un control adecuado de las muestras a analizar, y dado a que este material no se mantiene homogéneo durante todo el periodo de pruebas se omitió repeticiones con influencia del tiempo para evitar sesgos de estudios e incrementar de manera exponencial los datos de organismos obtenidos. Según Silvestri (2018) se debe mantener un transporte de muestras con condiciones controladas, para generar resultados confiables y con una homogeneidad de la variable de respuesta. Las muestras deben transportarse al laboratorio lo más rápido posible para minimizar la

degradación de microorganismos. La muestra de material de lignocelulosa presentó una humedad promedio de 70 % correspondiente a los estudios Moreno (2013) en muestras de bagazo con  $68 \pm 3$  % de humedad, indicando que los ejemplares tienen una capacidad de campo alta y no posee más de seis días desde que ingreso a la etapa de la molienda.

### **Aislamiento con Técnicas Dependientes de Cultivo**

Para poder aislar y estudiar organismos del reino fungí es necesario utilizar técnicas dependientes cultivo, como son medios nutricionales y diluciones seriadas que permitan manejar cargas microbianas elevadas. Inhibe completamente el crecimiento bacteriano, sin afectar el crecimiento de hongos transmitidos por los alimentos. Los medios nutricionales deben favorecer el crecimiento de hongos, suprimir el crecimiento de mohos que se propagan rápidamente, pero no evita su crecimiento por completo, tener un efecto bacteriostático y otorgar un lento crecimiento radial que permita el recuento de un número razonable de colonias por placa. En el estudio se trabajó con medios comerciales de PDA, DRBC y SDA que permitieron obtener un conteo de colonias de entre 10 a 150 en factor de dilución  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  que son valores aceptables para el análisis de UFC (Al-mohanna, 2017). Al usar tres distintos medios para mohos y levaduras se espera uniformidad en los UFC totales, como presenta en la Tabla 6 las variables de respuesta muestran un sesgo entre tratamientos. Según Zaky (2016) se genera una no linealidad de los recuentos de las placas de dilución, cuando las muestras diluidas no arrojan resultados correspondientes a reducciones de un orden de factor de 10 veces en el número de colonias recuperadas en placas. Esto se ha atribuido a la fragmentación del micelio y la ruptura de los grupos de esporas durante la dilución, además de la inhibición competitiva cuando hay un gran número de colonias en las placas, factores de incubación como la temperatura y el pH. En contraste las placas

inoculadas de incubaron a 27 (°C) que es un valor óptimo para el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos en sistemas tropicales (Zaky et al., 2016).

Para poder concernir un modelo de trabajo uniforme se estableció la prueba de Kruskal wallis en donde su p-valor (0,0007) es menor que el nivel de significancia (0.05), y mediante un gráfico de caja-bigotes se obtiene que los medios nutricionales no son homogéneos y que el medio SDA no presenta valores atípicos en sus resultados de UFC. Este resultado contrasta con la teoría que el medio SDA sirve para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de especies no patógenas y patógenas de organismos fúngicos y ajustando el pH a 5,6 se inhibe el crecimiento bacteriano y optimiza el de los mohos (Ramírez & Velázquez, 2018).

### **Extracción de ADN de Cepas Fúngicas**

Mediante una técnica de extracción tradicional (sin el uso de kits comerciales) se pueden obtener variaciones en las propiedades y concentraciones de las muestras de ADN extraídas. Los indicadores de calidad se pueden medir mediante espectrofotometría con una máquina conocida como NanoDrop que permite determinar la pureza y la integridad de los analitos del ADN (Lucena et al., 2016). La relación de absorbencia 260/280 se utiliza para evaluar la pureza del ADN. Una relación de cercana a un valor 1,8 se acepta generalmente como "pura" para el ADN. En las muestras del estudio 11 de las 12 cepas se acercan o superan el valor descrito por Lucena (2016) mientras que una cepa con la designación BL 8 (*Candida* sp.) muestra un valor inferior al 1,6 A260/A280 indicando la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm. Por el contrario, dado que las lecturas de absorbencia no pueden discriminar entre el ADN y el ARN, la presencia de ARN puede hacer que la relación aumente y debe tenerse en cuenta esta posibilidad para evitar la sobrecuantificación del ADN como ocurrió en la Tabla 9 con cepas fúngicas que tiene

un valor superior a 2 A260/A280. La relación A260/A230 se considera un indicador dudoso de la calidad del ADN debido a la inestabilidad de este valor cuando se utiliza un tampón de elución salino para disolver el ADN. Esto se debe al aumento de la concentración de sal en comparación con la concentración de ADN en la muestra (Lucena et al., 2016).

### **Identificación Molecular de Cepas de Levaduras**

Como parte del procedimiento para la descripción morfológica para levaduras se realizó la una tinción de Gram. Las levaduras que crecen activamente son Gram-positivas y normalmente absorben y retienen el cristal violeta durante todo el procedimiento como se contrasta con la Figura 14, donde las cepas presentan una coloración púrpura característica de las bacterias Gram positivas. Las levaduras sometidas a identificación molecular cumplían con la característica de generación de yemas al visualizarlas en el microscopio. De manera microscópica se seleccionaron cultivos de levadura que presentaban colonias lisas y rugosas que son tipologías de levaduras de interés industrial como *S. cerevisiae* (Reis et al., 2015).

Para obtener una identificación a nivel de género y especie es necesario poder amplificar y secuenciar la región del ITS mediante cebadores del ITS1-IT4, para verificar el resultado del procedimiento se obtuvo un gel de agarosa que durante una corrida electroforética y visualización en un transiluminador UV se obtienen bandas con longitudes de bases dispersas indicado en la Figura 17 que van desde 380 pb hasta 700 pb. Estos resultados dispersos difieren de la teoría en donde esta región debería obtener un tamaño aproximado de 400 pb a 500 pb organismos del reino fungi. Esto se debe a las longitudes del producto de PCR ITS1 pueden oscilar entre 134,43 pb ( *Yarrowia lipolytica* ) y 475,24 pb ( *C. glabrata* ) con una variación de cepa dentro de las especies generalmente inferior a 0,5 pb (Qvirist et al., 2016). Otras fuentes indican que

la variación en las bandas de amplificación para levaduras se debe a que se han observado diferentes ritmos de evolución, que han dado lugar a distintos niveles de mutación genética, en donde la ITS es la que genera cambios más rápidamente y presenta una diferencia de nucleótidos mayor. La región LSU, que contiene los dominios hipervariables D1 y D2, por sí sola, o cuando se combina con la región ITS, también puede ser valiosa para la identificación de especies en los hongos (Muggia et al., 2020).

### **Identificación Molecular de Cepas de Mohos**

Para la realización de este estudio se hizo la caracterización de caracteres fenotípicos de las estructuras de reproducción asexual de hongos filamentosos, como mecanismo para identificar las especies de hongos. El uso de la morfología en la identificación de especies fúngicas es muy importante para entender la evolución de los caracteres fenotípicos. En la Figura 17 y Tabla 8 se describieron como mediante el uso de claves dicotómicas se propusieron siete géneros de mohos. Por revisión bibliográfica se descartaron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, que son considerados como especies ubicuas y contaminantes del material orgánico en descomposición (Cepeda et al., 2019). Otros géneros de interés que tuvieron una identificación aparente fueron *Trichoderma*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, que por estudios previos presentan usos en el área de control biológico y producción de enzimas en fermentaciones solidas a base de desechos agroindustriales (Legodi et al., 2019).

Contrariamente a lo esperado, algunas de las caracterizaciones morfológicas (Tabla 8) no concuerda con las identificaciones moleculares (Tabla 10). Sin embargo, los enfoques morfológicos de la sistemática fúngica, aunque se utilizan de forma rutinaria en los estudios taxonómicos de hongos para la clasificación de hongos a nivel ordinal o familiar, pueden no siempre funcionar bien para las clasificaciones de nivel

inferior para determinar especies (J. Xu, 2016). Los fallos al identificar por claves dicotómicas según Huzefa (2017) se debe a: los linajes de hongos con gran especificidad, los caracteres morfológicos pueden ser problemáticos, ya que no siempre proporcionan agrupaciones precisas dentro de un marco evolutivo, principalmente a nivel de especie. Los caracteres morfológicos pueden ser a menudo engañosos debido a la hibridación, la especiación críptica, y la evolución convergente. Existe un número limitado de caracteres morfológicos especialmente cuando se encuentran con especies que no esporulan en medio nutriente de agar y así dificultando la identificación. En el caso de los hongos que sí esporulan en cultivo, las estructuras asexuales, como la forma y el tamaño de las conidias/esporas, pueden mostrar a menudo caracteres muy plásticos, lo que dificulta su identificación. En consecuencia, han surgido métodos basados en la secuencia de ADN para identificar especies dentro de los hongos megadiversos (Cedeño et al., 2014).

Estudios previos han señalado la importancia en la identificación a nivel de especie, el ITS es el más útil, ya que es la parte del cistrón del ARNr que evoluciona más rápidamente y debido a su facilidad de amplificación, a su uso generalizado y a la diferencia entre la variación interespecífica y la infraespecífica, el ITS fue elegido como el código de barras oficial para los hongos (Schoch et al., 2012). Los resultados de este estudio muestran que mediante la secuenciación del ITS se encontraron los siguientes géneros de mohos: *Fusarium*, *Sarcopodium*, *Paecilomyces* y *Trichoderma*.

Contrariamente a lo esperado, este estudio no se encontró especies de los generos mencionados en la Tabla 10, esto se puede explicar debido, aunque la región ITS se comporta bien como un marcador de código de barras fúngico adecuado, ha sido objeto de debate. La región ITS no funciona bien en algunos géneros altamente especiosos, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*, ya que estos taxones tienen espacios estrechos o sin código de barras en sus regiones ITS. Además,

todavía se están evaluando los valores de corte específicos de cada linaje para la determinación de las especies utilizando la región ITS, y no se puede aplicar un único valor a todos los grupos; esto es especialmente cierto para las especies crípticas morfológicamente similares. Debido a las limitaciones de un sistema de código de barras de un solo marcador en los hongos se establece que con estudios de realizados por Xu (2016) la implementación de un nuevo par de cebadores de alta fidelidad (EF1-1018F GAYTTCATCAAGAACATGAT y EF1-1620R GACGTTGAADCCRACRTTGTC) que se utilizan ampliamente como marcador filogenético secundario, ofreciendo una resolución superior cuando se utiliza junto a ITS.

### **Ensamblaje de Secuencias y Búsqueda BLAST**

Para la búsqueda BLAST, es razonable comenzar con una cobertura de consulta de  $\geq 80\%$  y una similitud de secuencia de  $\geq 97-100\%$  (es decir, hasta un 3% de divergencia de secuencia) para asignar un nombre de especie basado en la consideración de los resultados de la búsqueda BLAST de GenBank, ya que se calculó que la variabilidad infra-específica promedio ponderada de ITS en el reino fungi era de 2,51% con una desviación estándar de 4,57% (Vásquez et al., 2016).



## Capítulo VI: Conclusión

Mediante la técnica de muestreo aleatorio simple para la toma de muestras ambientales, se obtuvieron 5 muestra simples de material lignocelulósico de caña de azúcar que cumplieron con los criterios de homogeneidad para establecer una muestra compuesta para aislamiento e identificación de mohos y levaduras.

La implementación de técnicas microbiológicas como las diluciones seriadas, uso de medios nutritivos agarizados y la técnica de extensión en placa obtuvo colonias totales de mohos y levaduras que fueron sometidas a estudios macro y microscópicos.

El uso de claves dicotómicas para realizar la identificación de mohos, consiguió enfocar los estudios de análisis molecular en aquellas cepas que mediante bibliografía son de interés industrial en proceso de fermentaciones de residuos agroindustriales.

Se logró extraer mediante técnica de precipitación química, ADN de calidad y cantidad suficientes para ser sometida a la amplificación del Barcoding ITS.

La amplificación por PCR permitió generar un gel de agarosa en donde se mostraron fragmentos muy variables (desde 380 pb a 750 pb) en las ocho cepas de levaduras, mientras que las bandas de las cuatro cepas de hongos filamentosos se observó bandas de tamaño uniforme (400-500 pb). El gel de agarosa indicó que las amplificaciones de las bandas presentaban buena calidad para ser sometidos a secuenciación.

Siempre que sea posible, la identificación de los hongos debe realizarse mediante una combinación de caracteres micromorfológicos, culturales y moleculares. Toda la región ITS sola o en combinación con cebadores secundarios debe compararse siempre con secuencias autenticadas y publicadas. Se debe procurar la identificación al menos a nivel de género y/o familia.

Mediante secuenciación y ensamblaje de secuencias consensos tipo Sanger, se identificaron con porcentajes de identidad mayores al 97 % siete de las ocho muestras

analizadas de levaduras. Y en las cepas de mohos el análisis de las secuencias obtenidas se determinó la identidad de las muestras hasta el nivel de género.

En las muestras analizadas se encontró la presencia de *Torulaspota delbrueckii* una levadura de interés en la industria vinícola. La levadura *Candida tropicalis* es importante en la industria debido a la formación de proteína unicelular y la formación de xilitol. Se han identificado varias levaduras patógenas humanas, causantes de infecciones conocidas como candidiasis. En los hongos filamentosos se encontró un *Trichoderma* sp. que tienen utilidades como control biológico y la generación de enzimas celulasas.

## Capítulo VII: Recomendación

Realizar investigaciones posteriores sobre el potencial de las cepas aisladas en utilización de desechos industriales del IANCEM como fuente de carbono y minerales.

La región ITS funciona bien en la mayoría de los casos, pero debe usarse con precaución, especialmente cuando se emplea sólo la búsqueda BLAST de GenBank para la identificación. Para los casos en los que la región ITS no es ideal, como cuando no hay suficiente resolución para la identificación de especies como en *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* y/o cuando se trabaja con múltiples especies morfológicamente similares, que pueden mostrar una especiación críptica rampante las identificaciones del GenBank se pueden contrastar con base de datos como el AFTOL.

Se recomienda usar otro marcador molecular (EF1-alfa) con el objetivo de determinar la identidad a nivel de especie de las muestras de hongos filamentosos.

Emplear un estudio de metagenómica en diversos sitios de muestreo de la planta del IANCEM con el fin de identificar otras cepas de interés.

### Bibliografía

- Al-mohanna, M. T. (2017). *METHODS FOR FUNGAL ENUMERATION, ISOLATION AND IDENTIFICATION*. April. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12515.96809>
- Ammar, A., Mueller, P., Trabelsi, K., Chtourou, H., Boukhris, O., Masmoudi, L., Bouaziz, B., Brach, M., Schmicker, M., Bentlage, E., How, D., Ahmed, M., Aloui, A., Hammouda, O., Paineiras-Domingos, L. L., Braakman-jansen, A., Wrede, C., Bastoni, S., Pernambuco, C. S., ... Consortium, for the E.-C. (2020). Psychological consequences of COVID-19 home confinement: The ECLB-COVID19 multicenter study. *PLOS ONE*, *15*(11), 24–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240204>
- Atya, A. K., Alyasiri, M. H., Altamimy, R., & Ethaib, S. (2019). Assessment of airborne fungi in indoor environment for biological lab rooms. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *13*(4), 2281–2286. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.4.42>
- Baselga, I., Zafra, O., Pérez Lago, E., Francisco-Álvarez, R., Rodríguez-Tarduchy, G., & Santos, C. (2017). An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.014>
- Cedeño, Á. M. G., Pazmiño, D. E. Z., Rondón, A. J., Silva, M. L., Quintana, M. P., Aguilar, R. L., & Fernández, R. R. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, *46*(2), 177–189.
- Cepeda, R., Luque Aguada, L., Ramirez, D. A., Franco, P., & Fabra, M. (2019). *Monitoreo de hongos ambientales en laboratorios y reservas patrimoniales bioarqueológicas*. *34*(2), 33–49. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2019.34.2.1909>
- Chen, H. (2015). *Lignocellulose biorefinery feedstock engineering* (H. B. T.-L. B. E. Chen (ed.); pp. 37–86). Woodhead Publishing.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100135-6.00003-X>

Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G. e, Müller, C., Lucaroni, A. C., Giudici, R., Walker, G. M., Alves, S. L., & Basso, T. O. (2019). Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 109, pp. 61–119). Academic Press Inc.

<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.002>

Estrada, G., & Ramírez, M. (2019). Micología general. In *Microbiología y parasitología médicas*. [https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C\\_\\_Rb2056774\\_\\_Sprats\\_microbiologia\\_\\_Orightresult\\_\\_U\\_\\_X2?lang=cat%0Ahttp://absysweb.cpd.uniovi.es/cgi-bin/abnetopac?TITN=1028284](https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C__Rb2056774__Sprats_microbiologia__Orightresult__U__X2?lang=cat%0Ahttp://absysweb.cpd.uniovi.es/cgi-bin/abnetopac?TITN=1028284)

Ferrer, M. (2018). *Aislamiento, selección e identificación de levaduras Saccharomyces cerevisiae nativas de Alboraya para la producción de cerveza*.

<https://riunet.upv.es:443/handle/10251/109447>

Legodi, L. M., La Grange, D., Van Rensburg, E. L. J., & Ncube, I. (2019). Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana Pseudostem and Strelitzia alba. *Enzyme Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1390890>

Lucena, G., Sánchez, A. M., Barberán, C., Carrillo, J. A., López, J. A., & Aguilar, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270.

<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

Mendivelso, F., & Rodríguez, M. (2018). PRUEBA CHI-CUADRADO DE INDEPENDENCIA APLICADA A TABLAS 2 x N INDEPENDENCE CHI-SQUARE TEST APPLIED TO 2 x N TABLES. *Rev.Medica.Sanitas*, 21(2), 92–95.

<https://doi.org/10.26852/01234250.6>

Muggia, L., Ametrano, C. G., Sterflinger, K., & Tesei, D. (2020). An overview of genomics, phylogenomics and proteomics approaches in ascomycota. In *Life* (Vol.

- 10, Issue 12, pp. 1–75). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life10120356>
- Public Health England. (2019). *Preparation of samples and dilutions, plating and sub-culture* (National Infection Service (ed.); Vol. 26, Issue 4).  
<https://doi.org/http://www.gov.uk/phe>
- Qvirist, L. A., De Filippo, C., Strati, F., Stefanini, I., Sordo, M., Andlid, T., Felis, G. E., Mattarelli, P., & Cavalieri, D. (2016). Isolation, Identification and Characterization of Yeasts from Fermented Goat Milk of the Yaghnob Valley in Tajikistan . In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7).  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01690>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramírez, M., & Velázquez, R. (2018). The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation*, 4(4).  
<https://doi.org/10.3390/fermentation4040094>
- Reis, V. R., Bassi, A. P. G., da Silva, J. C. G., & Ceccato-Antonini, S. R. (2015). Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1121–1131. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>
- Rodríguez, E. (2020). Caracterización fenotípica y filogenia molecular de hongos extremófilos. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.  
<http://www.tdx.cat/handle/10803/670209>
- Rosenblad, M., Martín, M. P., Tedersoo, L., Ryberg, M., Larsson, E., Wurzbacher, C., Abarenkov, K., & Henrik Nilsson, R. (2016). Detection of signal recognition particle

- (SRP) RNAs in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer I (ITS1) of three lineages of ectomycorrhizal fungi (Agaricomycetes, Basidiomycota). *MycoKeys*, 13, 21–33. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.13.8579>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Fungal Barcoding C, Fungal Barcoding Consortium Author L. 2012. Nuclear 572 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for 573 Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 6241–6246.
- Silvestri, E., Hall, K., Chambers-Velarde, Y., Chandler, J., Cuddeback, J., & Jones, K. (2018). Sampling, Laboratory, and Data Considerations for Microbial Data Collected in the Field. *Epa/600/R-18/164*, July, 61.
- Singh Nee Nigam, P., & Pandey, A. (2009). Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (Issue January 2009). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>
- Spatafora, J., Chang, Y., Benny, G., Lazarus, K., Smith, M., Berbee, M., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T., O'Donnell, K., Roberson, R., Taylor, T., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M., & Stajich, J. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108, 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Speers, A., & Forbes, J. (2015). 1 - Yeast: An overview. In A. E. B. T.-B. M. Hill (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 3–9). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00001-0>
- Talaiekhosani, A., & Mohanadoss, P. (2015). *Identification of Molds & Bacteria Made Easier for Engineers*. February, 51–54. <https://doi.org/10.13140/2.1.1105.9524>
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by

- Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 532852. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Thapa, S., Shrestha, R., Tirewal, A., Sharma, A., & KC, Y. (2015). Isolation of yeast from soil and different food samples and its characterization based on fermentation. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3, 29. <https://doi.org/10.3126/njb.v3i1.14226>
- Vanegas, C. L., & Gómez, J. A. (2018). Aislamiento e identificación molecular de microorganismos asociados a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 722086. *Nexo Revista Científica*, 31(01), 64–73. <https://doi.org/10.5377/nexo.v31i01.6455>
- Vásquez, J., Ramirez, M., & Monsalve, Z. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>
- Warnock, D. (2019). *Taxonomy, Classification, and Nomenclature of Fungi*. <https://doi.org/doi:10.1128/9781683670438.MCM.ch116>
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *The 6th International Barcode of Life Conference*, 01(01), 913–932. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046@gen-iblf.issue01>
- Xu, Q., Ji, T., Gao, S.-J., Yang, Z., & Wu, N. (2018). Characteristics and Applications of Sugar Cane Bagasse Ash Waste in Cementitious Materials. *Materials*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/ma12010039>
- Zaky, A. S., Greetham, D., Louis, E. J., Tucker, G. A., & Du, C. (2016). A new isolation and evaluation method for marine-derived yeast spp. with potential applications in industrial biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 1891–1907. <https://doi.org/10.4014/jmb.1605.05074>
- Zhang, F., Bunterngsook, B., Li, J.-X., Zhao, X.-Q., Champreda, V., Liu, C.-G., & Bai, F.-W. (2019). *Chapter Three - Regulation and production of lignocellulolytic enzymes*



*from Trichoderma reesei for biofuels production* (Y. Li & X. B. T.-A. in B. Ge (eds.);  
Vol. 4, pp. 79–119). Elsevier.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.03.001>