



ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

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



ÉRIKA CRISTINA CASTILLO TAMAYO

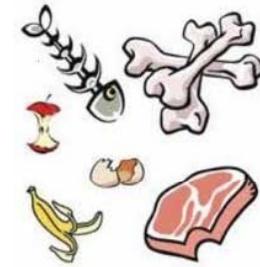
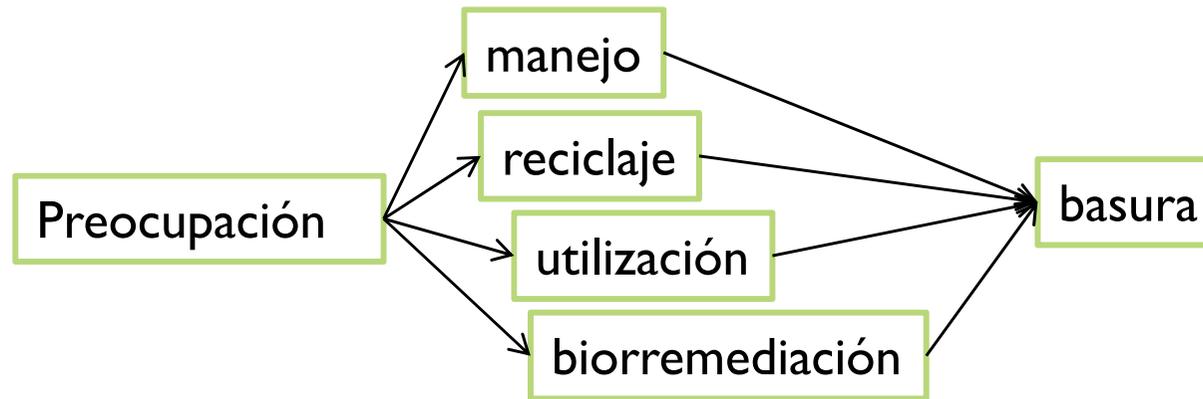
Sangolquí, marzo 2011

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MATERIALES Y MÉTODOS
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
4. CONCLUSIONES
5. RECOMENDACIONES



I.1 El problema...



- 2004..... Mundo..... 1.600 millones de ton.
- 2005..... Ecuador..... 194.400 ton.
- 2007..... Quito..... 1.550 ton.



En el presente trabajo, desarrollado a escala de laboratorio, se plantea el aislamiento y la caracterización morfológica y enzimo-funcional de hongos ligninocelulolíticos

1.2 Justificación

- Descomposición de materiales lignino-celulósicos.
- Estudios sobre hongos lignino-celulolíticos.
- Géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.
- Técnicas en la reducción biológica: Fermentación en estado sólido y aplicación de enzimas purificadas.
- El uso de microorganismos potenciales degradadores de residuos lignino-celulósicos se convierte en una opción viable.



1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

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

I.3.2 Objetivos específicos

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

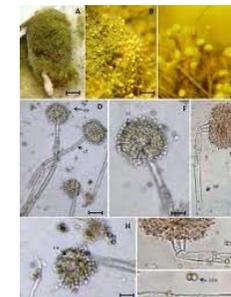
I.4 Marco teórico

- Hongos lignino-celulolíticos



Formación de complejos enzima-sustrato

- Actividad enzimática



- Caracterización morfológica



- Volcán Pasochoa

Basidiomycetes

- Son una división del reino Fungi, incluye a los hongos que producen basidios.
- Contienen a las clásicas setas y hongos con sombrero.

Hongos imperfectos

- Comprenden más de 15.000 especies diferentes que se clasifican juntas porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción.

Ascomycetes

- Comprenden aproximadamente 28.500 especies, su micelio es septado y producen ascas unicelulares, que forman esporas de origen sexual.

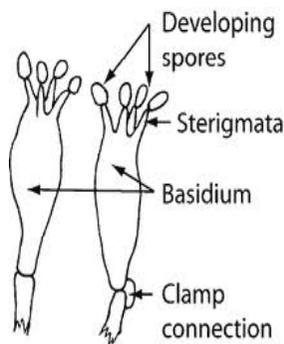
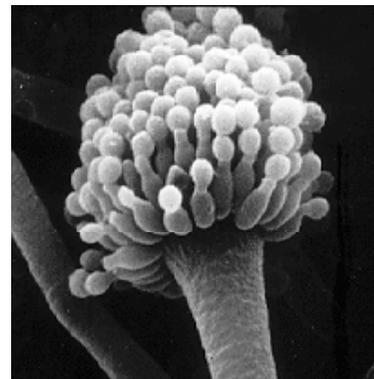


Fig. 1E Basidia



Prueba del Rojo Congo

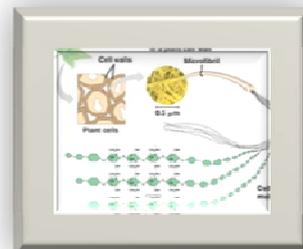
- Teather y Wood (1982).
- Hidrólisis de polisacáridos.
- Zonas de aclaramiento.

Actividad celulolítica

- Sumner (1921).
- Técnica analítica cuantitativa de azúcares reductores
- Ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS)
- D.O es proporcional a la cantidad de glucosa presente.

Actividad lignino peroxidásica

- Lignina catalizada por un complejo extracelular.
- La LiP fue la primera en descubrirse.
- Oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído.



CARACTERIZACIÓN

Macroscópica

Cada microorganismo crece de manera diferente.

a) color; b) forma; c) tamaño;
d) textura; e) olor y, f) brillo.



40x

Microscópica

a) Tipo de hifa; b) la posición del o los esporóforos; c) la presencia de esporangióforo o conidióforo; d) la forma, tamaño y distribución de las esporas y, e) la presencia o no de rizoides.



100x

El volcán Pasochoa posee uno de los últimos remanentes de bosque andino.

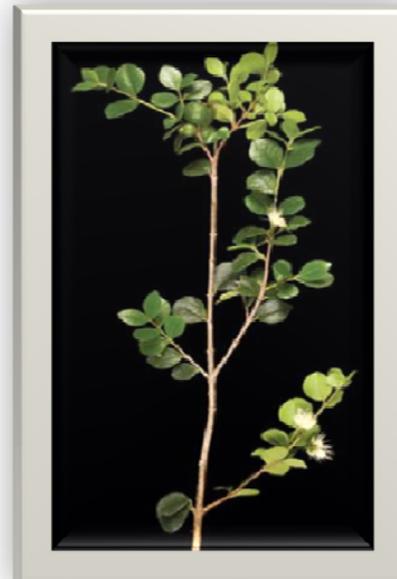
•Árboles como el pumamaqui, el polylepis, el laurel y la palma de ramos han sido de interés científico.

•Ubicado al sureste de la hoya de Guayllabamba, tiene una extensión de 500 hectáreas.

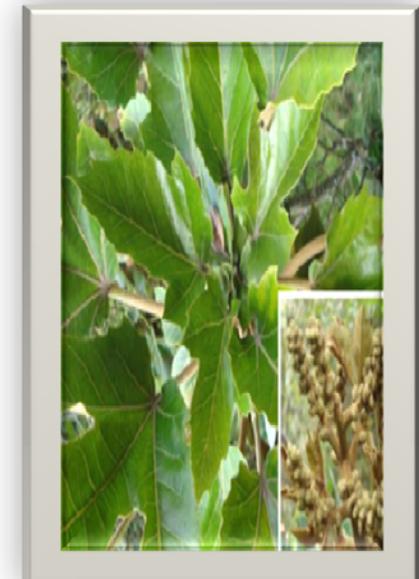
•Fuente principal de muchos estudios.



Aliso (*Alnus acuminata*)
Fuente: Ulloa y Møller, 2008



Arrayán (*Myrcianthes hallii*)
Fuente: Bustamante, 2010



Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*)
Fuente: Aguilar et al., 2009

2.1 Fase de campo

Identificadas las tres especies vegetales nativas del Ecuador, se tomaron pedazos de las cortezas de los tallos de diez árboles.

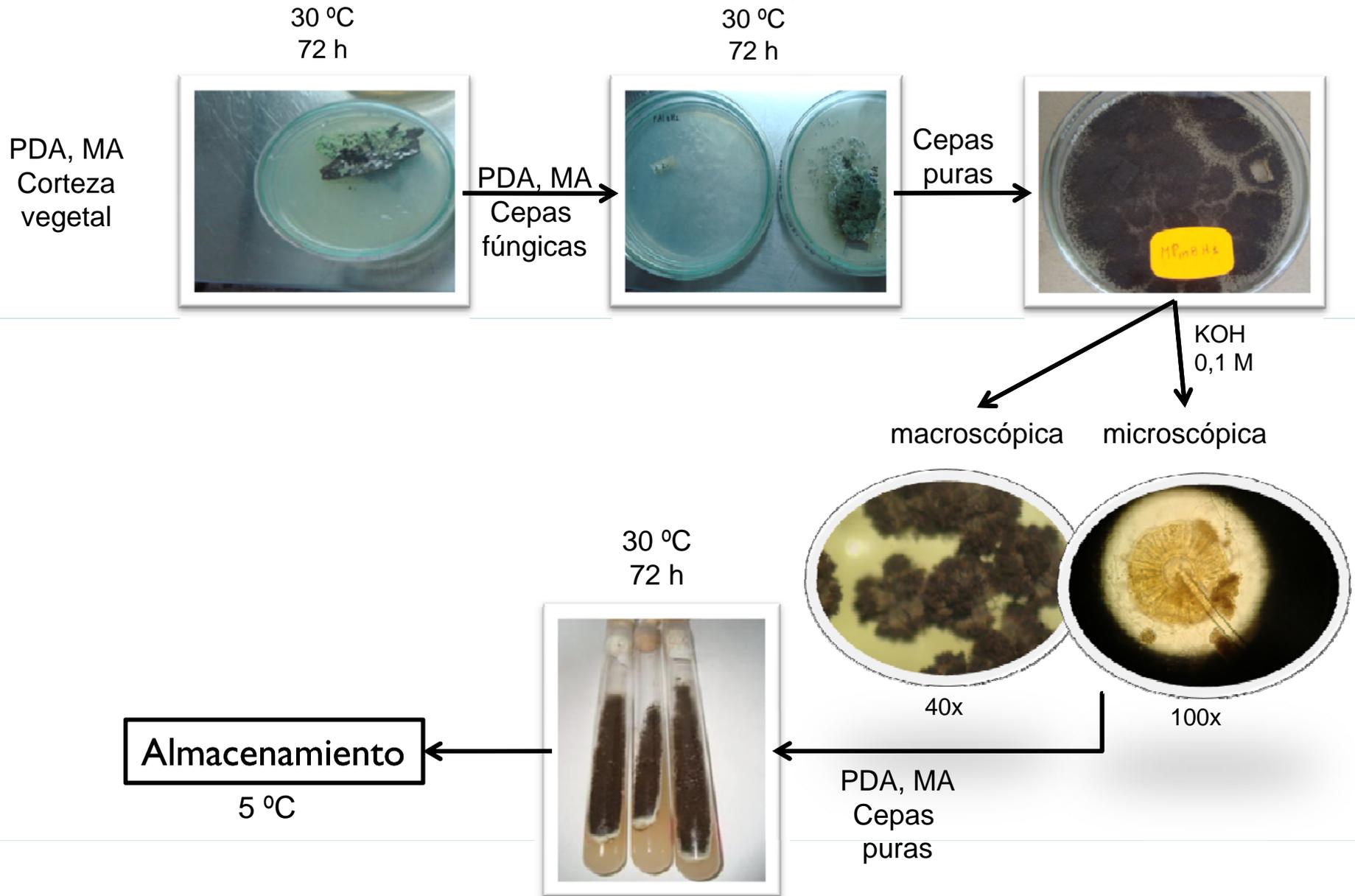


Los pedazos de cortezas fueron recolectados manualmente y depositados en fundas de papel. Las fundas fueron mantenidas a temperatura ambiente.

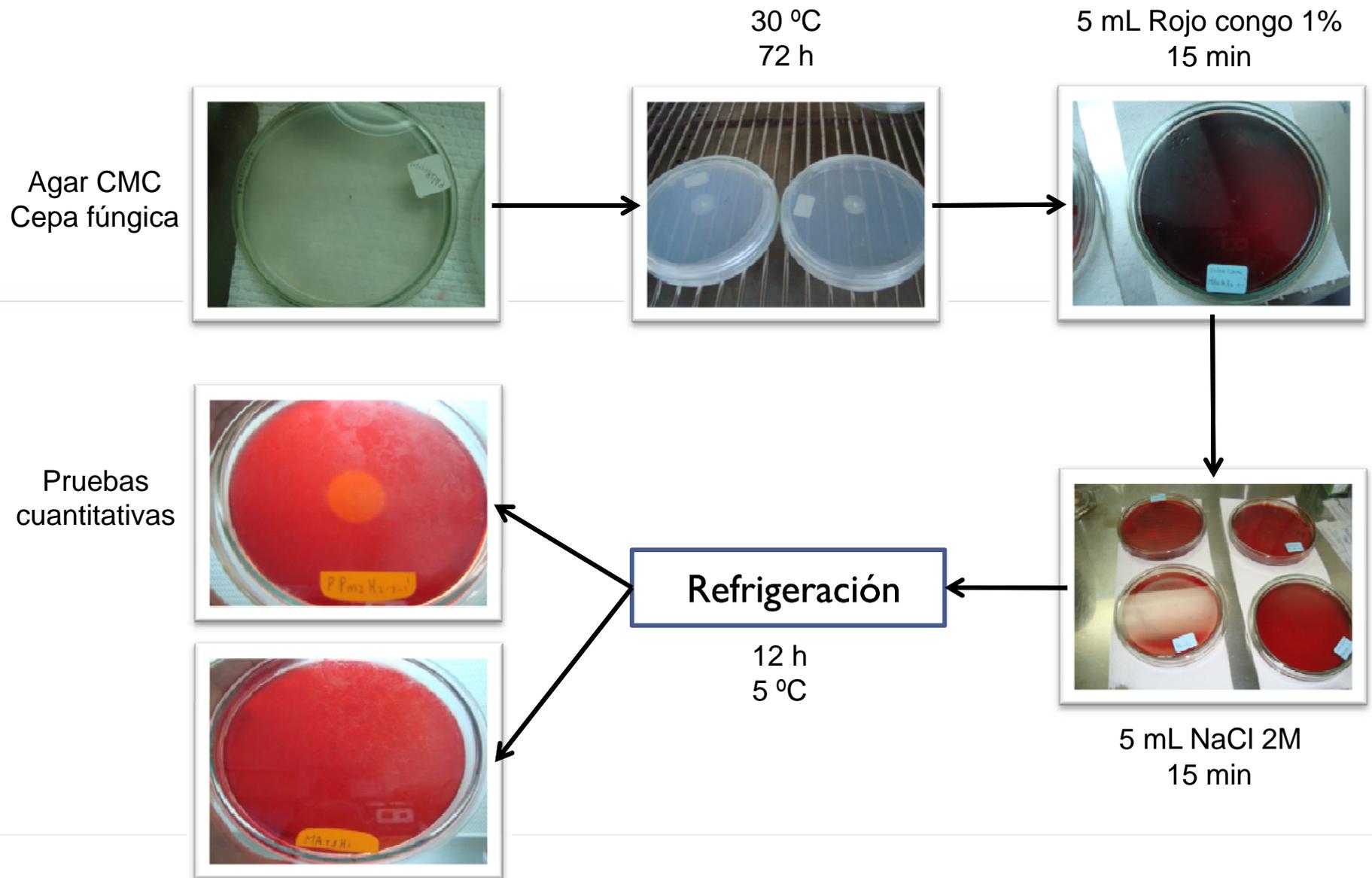


2.2 Fase de laboratorio

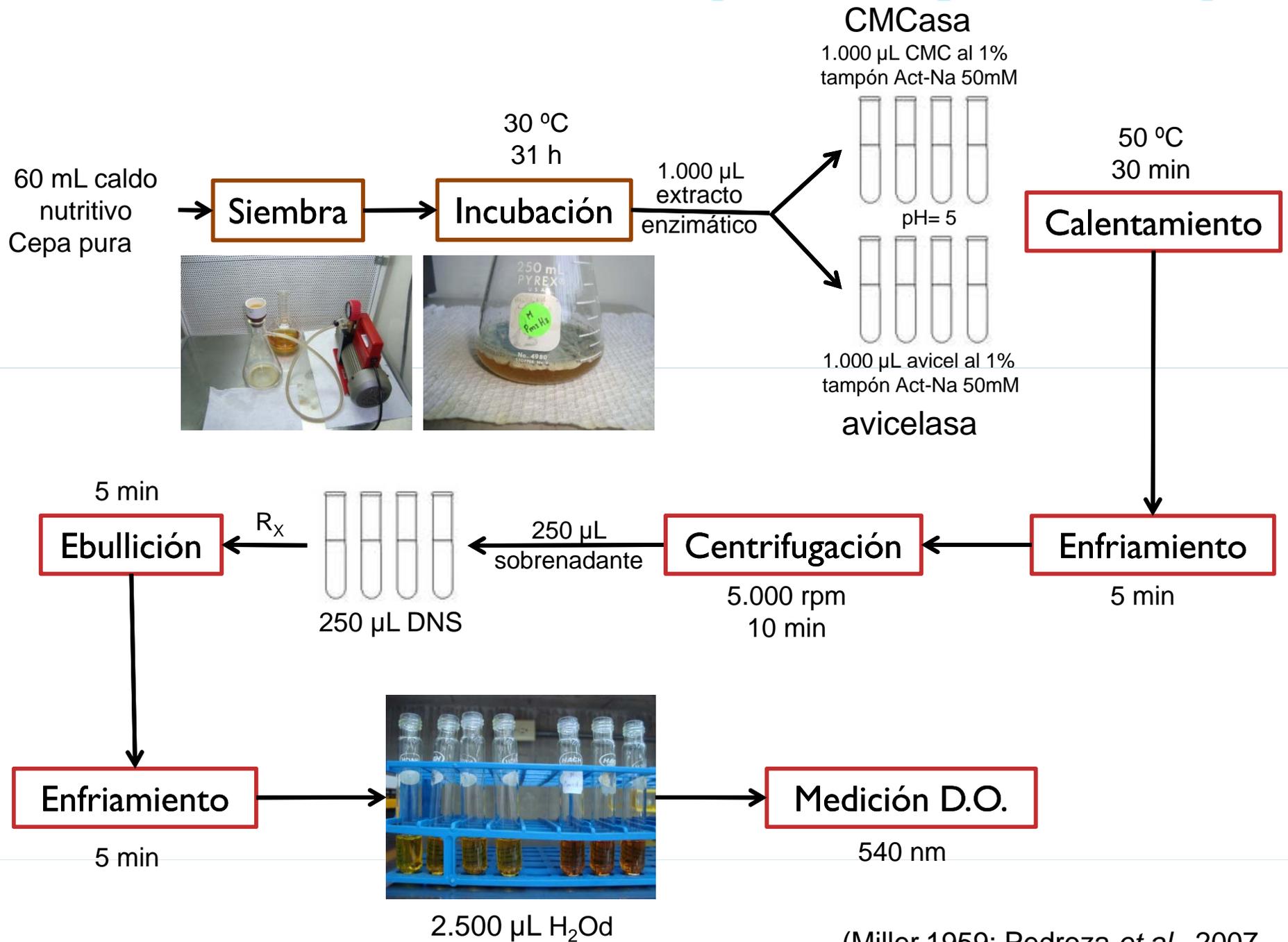
2.2.1 Aislamiento, resiembra y conservación



2.2.2 Prueba semi-cuantitativa



2.2.3 Actividad celulolítica (CMCasa y avicelasa)



2.2.4 Actividad lignino peroxidásica

60 mL caldo nutritivo
+ 4 g aserrín

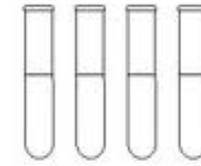
Cepa pura

Siembra

30 °C
72 h

Incubación

250 µL
extracto
enzimático



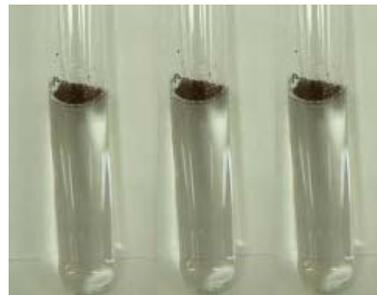
pH=3

9,6 mL tampón
tartrato-Na 0,1 M
100 µL Tween 80
15 µL alcohol
veratrílico 2 mM
20 µL peróxido de
hidrógeno 4 mM

Calentamiento

30 °C R_x
1 h

Enfriamiento



Medición D.O.

330 nm

2.2.5 Caracterización morfológica de las tres cepas eficientes

- Caracterización morfológica macro y microscópica fue realizada con la colaboración de la Lic. Verónica Luna, del laboratorio DISerLAB.
- Desarrollo de los microorganismos en medio papa dextrosa agar (PDA), durante 5 días, seguida de la observación bajo el microscopio.



3.1 Aislamiento, resiembras y caracterización preliminar

Tabla 1 Frecuencia y porcentaje de hongos desarrollados según los medios de cultivo

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

Tabla 2 Frecuencia y porcentaje del número de las resiembras de purificación

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

Tabla 2 Frecuencia y porcentaje de las especies vegetales

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

Tabla 4 División, familia o géneros de las cepas purificadas

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

3.2 Prueba semi-cuantitativa

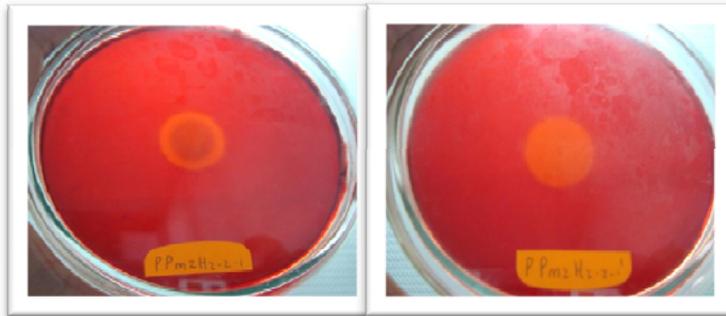


Figura 1 Resultados de la actividad enzimática cualitativa positiva de una cepa de *Fusarium* a las 72 h de incubación

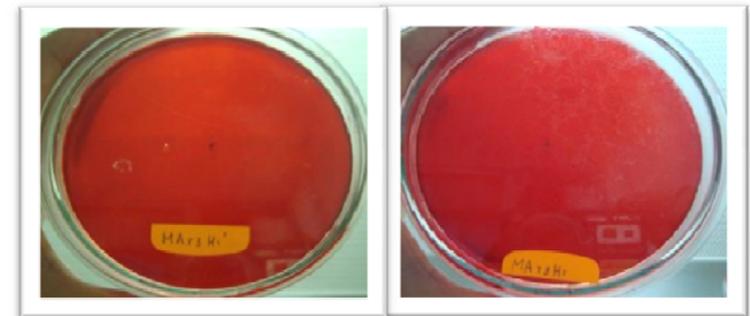


Figura 2 Resultados de la actividad enzimática cualitativa negativa de una cepa de *Aspergillus* a las 72 h de incubación

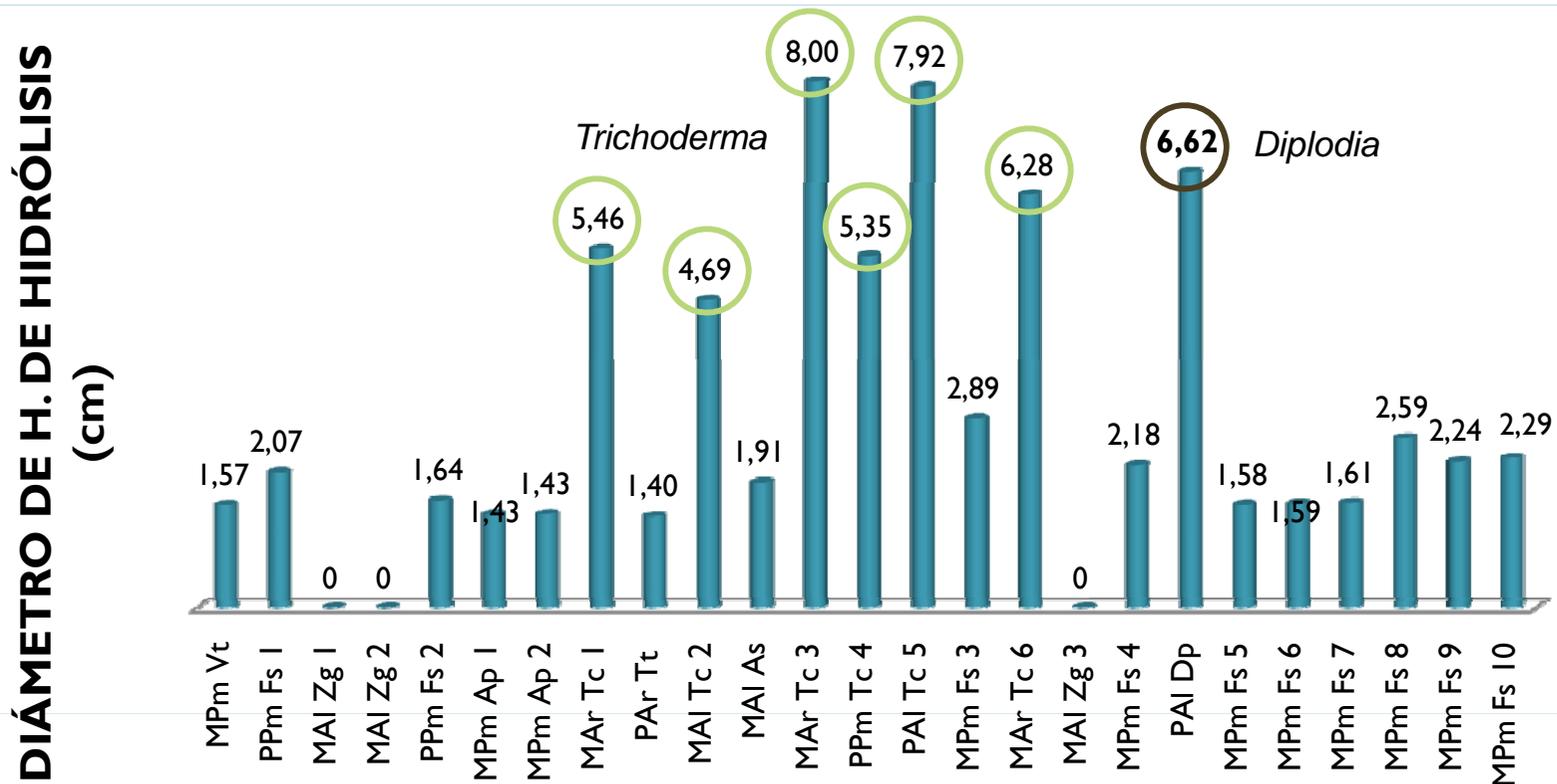


Figura 3 Diámetro de los halos de hidrólisis

3.3 Actividad celulolítica

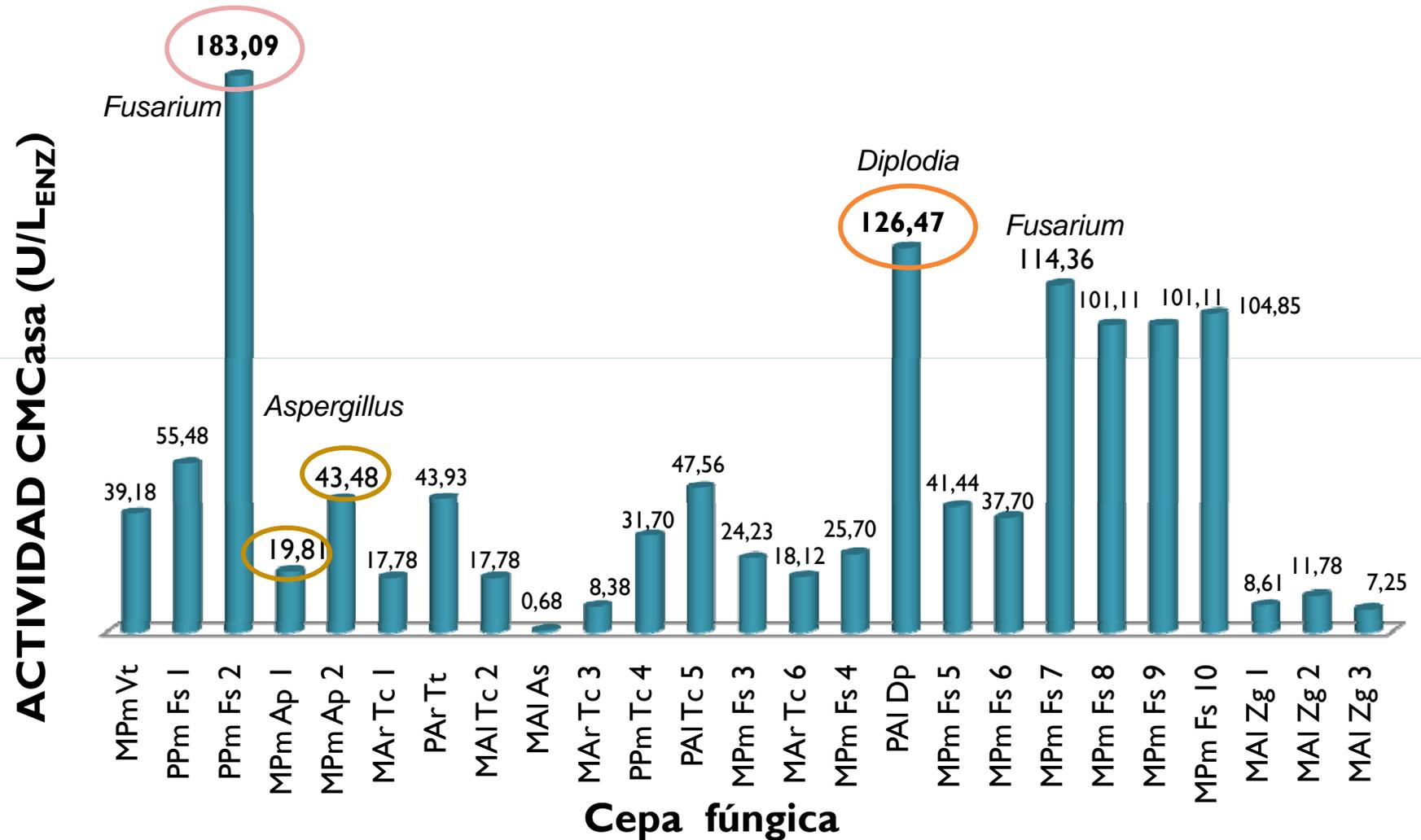


Figura 4 Actividad celulolítica CMCasa

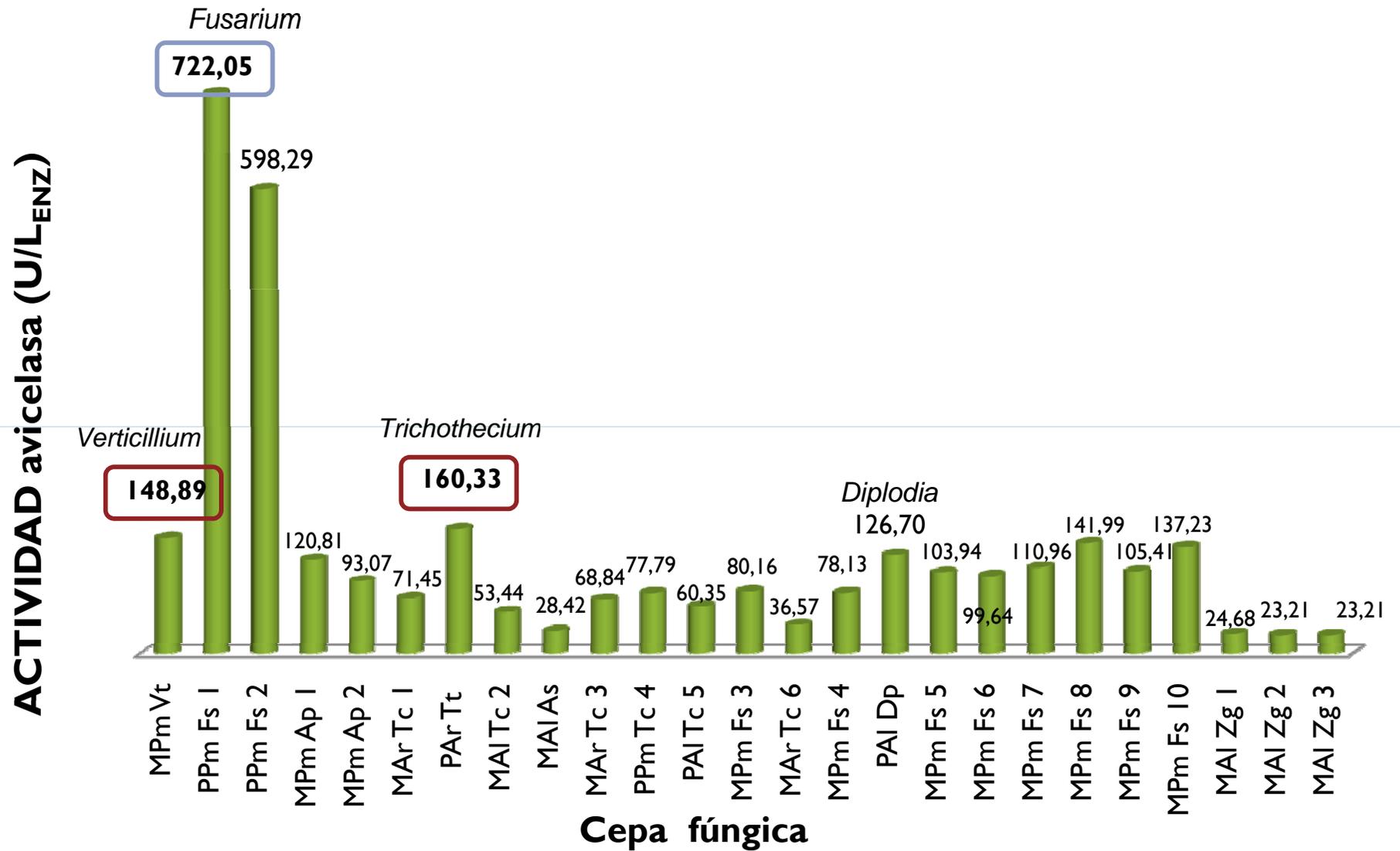


Figura 5 Actividad celulolítica avicelasa

3.4 Actividad ligninolítica

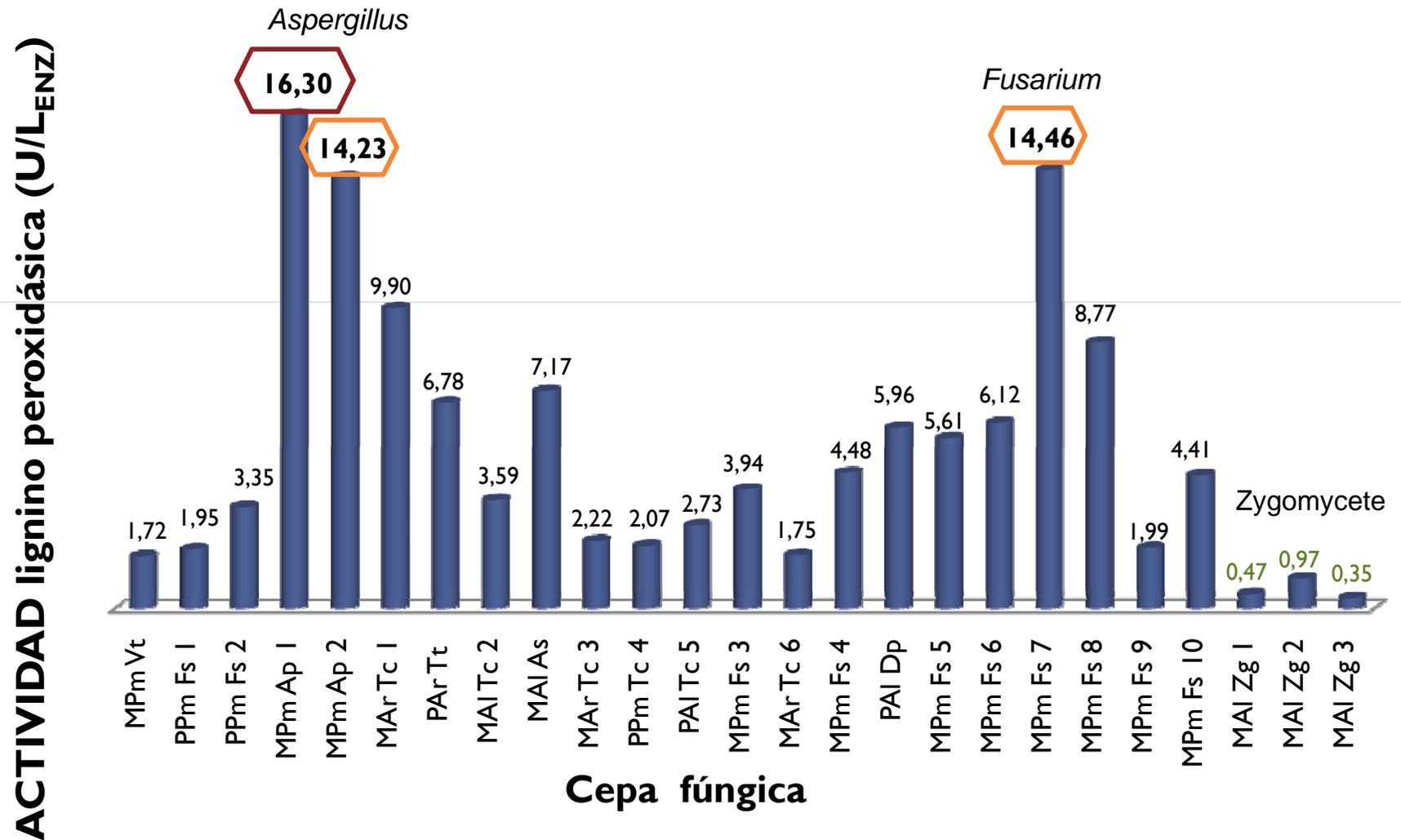


Figura 6 Actividad lignino peroxidásica

3.5 Caracterización morfológica



Fusarium 2
Fusarium semitectum



Fusarium 1
Fusarium oxysporum



Aspergillus 1
Aspergillus flavus

Morfología macroscópica de la colonia	Morfología microscópica
<p>blanca algodonosa (torna de color rosa-salmón).</p> <p>Micelio flocoso.</p>	<p>Conidias septadas: 17 a 28 x 2,5 a 4 μm.</p> <p>Clamidosporas hialinas: 5 a 10 μm.</p>
<p>blanca algodonosa (reverso tinte púrpura).</p> <p>Micelio aéreo flocoso.</p>	<p>Microconidias: 5 a 12 x 2,2 a 3,5 μm.</p> <p>Macroconidias septadas de 3 a 5 septos fusiformes.</p>
<p>amarilla verdosa (reverso amarillento).</p> <p>verde oscura.</p> <p>Aspecto polvoriento.</p>	<p>Conidióforos hialinos.</p> <p>Vesículas globosas a subglobosas: 25-45 μm de diámetro.</p> <p>Conidias: 3 a 6 μm, globosas a subglobosas.</p>



4. Conclusiones

- De las cortezas de los árboles de aliso (*Alnus acuminata*), arrayán (*Myrcianthes hali*) y pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) se obtuvieron 57 cepas fúngicas.
- De las 37 cepas evaluadas semi-cuantitativamente, solamente 25 arrojaron resultados positivos. Las cepas de *Trichoderma* presentaron los diámetros de halo de hidrólisis mayores.
- Las tres cepas que presentaron la mayor actividad carboximetilcelulasa fueron *Fusarium* 2 (183,08 U/L_{ENZ}), *Fusarium* 7 (114,35 U/L_{ENZ}) y *Diplodia* (126,47 U/L_{ENZ}).
- La mayor actividad avicelasa la presentaron las cepas *Fusarium* 1 (722,04 U/L_{ENZ}), *Fusarium* 2 (598,29 U/L_{ENZ}) y *Trichothecium* (160,32 U/L_{ENZ}).
- Las cepas con mayor actividad lignino peroxidásica fueron *Aspergillus* 1 (16,29 U/L_{ENZ}), *Aspergillus* 2 (14,23 U/L_{ENZ}) y *Fusarium* 7 (14,46 U/L_{ENZ}).

- Las cepas de *Aspergillus* 1 y *Aspergillus* 2 se mostraron como las más activas frente al CMC y avicel.
- *Fusarium semitectum* (*Fusarium* 2) se presentó como un hongo blanco, con tintes color durazno, actividad CMCasa de 183,08 U/L_{ENZ}; *Fusarium oxysporum* (*Fusarium* 1), hongo blanco con tintes rosados, actividad avicelasa de 722,04 U/L_{ENZ} y *Aspergillus flavus* (*Aspergillus* 1), hongo verde oliváceo a verde amarillento, actividad lignino peroxidásica de 16,29 U/L_{ENZ}.
- Las cepas novedosas, en cuanto a la actividad enzimática, que se aislaron en esta investigación pertenecieron a los géneros *Diplodia*, *Verticillium* y *Trichothecium* y constituyen fuentes promisorias de cepas fúngicas con potencial capacidad degradadora de materiales lignino-celulósicos.



5. Recomendaciones

- Realizar la prueba de la actividad enzimática lignino peroxidásica, pasadas las 72 h de incubación.
- Complementar el estudio con la determinación de la cinética de crecimiento.
- Estudiar a géneros *Diplodia*, *Trochothecium* y *Verticillium*: hongos con gran potencial lignino-celulolítico.
- Realizar la caracterización molecular de las cepas con mayor capacidad enzimática.
- Diseñar un biorreactor: aplicación semi-industrial o industrial.
- Extender esta investigación con muestras vegetales de otras manchas de bosques nativos del área andina,



ESCUELA POLITÉCNICA
DEL EJÉRCITO



CARRERA DE ING. EN
BIOTECNOLOGÍA



ESCUELA POLITÉCNICA
NACIONAL

