



EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS CONSERVADOS EN EL BANCO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

SEBASTIAN MANCERA PEREZ
DANIEL CAMILO ROMERO PRIETO

TRABAJO DE GRADO MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE PREGRADO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA-GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL E
INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C., 2018

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS CONSERVADOS EN EL BANCO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

SEBASTIAN MANCERA PEREZ
DANIEL CAMILO ROMERO PRIETO

Dra. Concepción Puerta
Decana Académica Facultad de
Ciencias

Dra. Marcela Franco Correa
Directora Carrera de Microbiología
Industrial

TRABAJO DE GRADO MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE PRE
GRADO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA-GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL E
INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C., 2018
**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE
AISLAMIENTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS CONSERVADOS EN EL BANCO DEL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

SEBASTIAN MANCERA PEREZ
DANIEL CAMILO ROMERO PRIETO

Directora: IVONNE GUTIERREZ ROJAS

TRABAJO DE GRADO MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE PREGRADO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA-GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL E
INDUSTRIAL

BOGOTÁ D.C., 2018

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N.º 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ella el anhelo por buscar verdad y justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios, por ayudarnos a cumplir este logro y guiarnos a culminar esta etapa y dándonos la fortaleza para afrontar cada situación presentada durante la realización de este trabajo de grado.

Deseamos agradecer a nuestros padres y hermanos por acompañarnos y brindarnos su ayuda en cada momento, por sus consejos y apoyo incondicional, por creer en nosotros e impulsarnos a lograr nuestros objetivos.

A nuestra tutora Ivonne Gutiérrez Rojas, por la constante ayuda, acompañamiento y guía aportando conocimiento y consejos; con su profesionalismo nos sirvió de luz para lograr el objetivo de este proyecto de grado. A Catalina García por su altruismo incondicional, consejos y aportes de su conocimiento en nuestro trabajo.

Y a nuestros amigos por su compañía, ayuda y por hacer más fácil el día a día con el sentido del buen humor que nos caracteriza durante toda la carrera y siempre que lo hemos necesitado brindarnos su mano en circunstancias difíciles, reafirmando su amistad y haciéndome sentir su afecto y acogida.

Tabla de contenido	
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Marco conceptual.....	9
2.1.1. Alternativas para tratar los residuos postcosecha.....	9
2.1.2. Lignocelulosa.....	10
2.1.3. Hongos lignocelulolíticos.....	11
2.1.4. Transformación enzimática de la lignocelulosa.....	11
2.1.5. Métodos de conservación.....	12
2.2 Antecedentes.....	12
2.2.1 Hongos de estudio.....	12
2.2.2. Métodos de conservación utilizados para hongos filamentosos.....	12
3. OBJETIVO.....	13
4. METODOLOGÍA.....	13
4.1. Aislamiento y reactivación.....	13
4.2. Elaboración de bancos secundarios de conservación.....	14
4.3. Actividad Enzimática.....	14
4.3.1 Actividad enzimática cualitativa.....	14
4.3.2 Evaluación de la temperatura para el método cuantitativo.....	14
4.3.3 Actividad enzimática cuantitativa.....	15
4.4 Análisis estadístico.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1. Evaluación de la viabilidad de los 40 aislamientos de hongos lignocelulolíticos.....	15
5.2. Evaluación de la actividad enzimática celulolítica cualitativa en agar celulosa.....	16
5.3. Evaluación de la actividad enzimática ligninolítica cualitativa en agar lignina.....	18
5.4. Evaluación de la temperatura para el método cuantitativo.....	20
5.5. Evaluación de la actividad enzimática celulolítica cuantitativa en tamo de arroz y carboximetilcelulosa a 50°C.....	20
6. CONCLUSIONES.....	21
7. RECOMENDACIONES.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA.....	22
9.1 Codigos de los aislamientos, genero de cada aislamiento y su halo de hidrolisis....	26
9.2 Halos de oxidación.....	26

9.3 Halos de hidrolisis y oxidación , aislamientos fungicos y fermentación líquida.	27
9.4 Curva patrón de glucosa para la determinación cuantitativa de unidades enzimáticas y azúcares reductores equivalentes a glucosa.....	38

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE AISLAMIENTOS DE HONGOS FILAMENTOSOS CONSERVADOS EN EL BANCO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

RESUMEN

Introducción. En Colombia la producción anual de diferentes tipos de cereales está alrededor de 14'974'807 toneladas y se producen alrededor de 71'943'813 toneladas de residuos postcosecha, los cuales contienen lignocelulosa de difícil degradación. Estos residuos son un problema para los agricultores ya que las alternativas que se manejan pueden ser costosas o causar daños a los suelos o al medio ambiente. En la búsqueda de soluciones para tratar los residuos se encuentran las alternativas biológicas, es así como existen grupos de hongos con la capacidad de degradar estos desechos gracias a su complejo enzimático. En el año 2009 el grupo de investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Pontificia Universidad Javeriana realizó junto con la Universidad Nacional de Colombia, muestreos en suelos rizosféricos de cultivos de arroz en los departamentos de Tolima y Meta, Colombia. Se realizó un screening obteniendo 436 aislamientos bacterianos y 40 aislamientos fúngicos que se han conservado durante 9 años a una temperatura de 4°C en discos de agar. **Objetivo.** Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la viabilidad y la actividad lignocelulolítica de 40 aislamientos de hongos filamentosos conservados en el banco del laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana. **Materiales y métodos.** Se realizó la reactivación de cada aislamiento del banco para verificar su viabilidad, para su posterior conservación por 2 métodos: conservación de discos de agar en agua estéril y conservación de suspensión de conidios en glicerol al 20%. También se realizó la medición de la actividad celulolítica cualitativa sobre agar celulosa mediante la técnica de revelado con rojo congo y NaCl, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta evaluación cualitativa se seleccionaron los 11 mejores aislamientos para medir la actividad celulolítica cuantitativamente mediante cultivos líquidos utilizando como fuentes de carbono tamo de arroz y carboximetilcelulosa. Para esto se incubó por 8 días a 120 rpm a 28°C y se obtuvo el extracto enzimático, se empleó la técnica de FPasas (50°C y pH 5) para la cuantificación de la actividad celulolítica. **Resultados y conclusiones.** De los 40 aislamientos de hongos filamentosos el 55% se encuentra viable, donde el 47.83% pertenecen a hongos celulolíticos y el 7.17% a hongos ligninolíticos, mostrando que el método de conservación empleado fue efectivo en el caso de los hongos con actividad celulolítica, y que para la conservación de hongos con actividad ligninolítica debe emplearse otro tipo de métodos y monitorear constantemente los bancos de conservación. La evaluación cualitativa mostró que 22 de los 23 aislamientos evaluados conservaron su actividad celulolítica o ligninolítica. Por último, en la evaluación cuantitativa el valor más alto de actividad enzimática se obtuvo con el aislamiento que corresponde a *Talaromyces sayulitensis* con 48.41 ± 15.7 y 38.49 ± 0.7 UC*L⁻¹ para tamo de arroz y carboximetilcelulosa respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia la producción anual de café, palma de aceite, maíz, arroz, banano, plátano, caña de azúcar y panelera está alrededor de 14'974'807 toneladas, siendo los productos que más se producen en el país, y alrededor de 71'943'813 toneladas de residuos postcosecha son producidos por estos mismos, los cuales contienen residuos lignocelulósicos difíciles de degradar (1). Estos residuos se convierten en un problema para los agricultores por lo que se manejan diferentes alternativas como las quemadas controladas, estas producen CO₂ el cual es un factor contaminante del medio ambiente debido a su composición molecular que tiene la capacidad de retener energía (calor), siendo el principal responsable del calentamiento global (2). Otra alternativa que toman los agricultores es dejar los residuos en el lugar de cosecha a la espera que se degraden solos, lo cual les causa pérdida de tiempo ya que estos ocupan espacio que puede ser utilizado para nuevas siembras, conllevando también a una pérdida económica. Por último, los agricultores pagan para que se lleven estos desechos a un relleno sanitario (3).

En la búsqueda de soluciones para tratar los residuos se encuentran las alternativas químicas y biológicas. Los tratamientos químicos emplean agentes químicos que alteran la estructura lignocelulósica y solubilizan los azúcares (4), causando nuevamente un problema ambiental al ser sustancias químicas tóxicas que contaminan los suelos; por lo cual la alternativa más adecuada son los tratamientos biológicos.

Uno de los componentes que tienen las plantas es la lignina, la cual se degrada más lentamente debido a su composición, es así como existen dos grupos de hongos que se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosa dejando la lignina como residuo, y los que provocan la podredumbre blanca que degradan lignina (5). Es así como el estudio y conservación de estos hongos filamentosos servirá para tratar los residuos postcosecha. En el año 2009 el grupo de investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Pontificia Universidad Javeriana realizó junto con la Universidad Nacional de Colombia, muestreos en suelos rizosféricos de cultivos de arroz en los departamentos de Tolima y Meta, Colombia. Realizaron un screening obteniendo 436 aislamientos bacterianos y 40 aislamientos fúngicos que se han conservado durante 9 años a una temperatura de 4°C en discos de agar (6), Debido al largo plazo de conservación y al poco uso de este banco se quiere saber si los 40 aislamientos conservados en el banco de hongos filamentosos del laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana después de su tiempo de conservación siguen viables y conservan la actividad lignocelulolítica, permitiendo realizar estudios posteriores para implementar nuevas estrategias que actúen como tratamientos de residuos post-cosecha usando bioinoculantes de hongos lignocelulolíticos y así evitar contaminaciones ambientales o pérdidas económicas para los agricultores.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Alternativas para tratar los residuos postcosecha

Existen diferentes alternativas que se emplean para tratar los residuos postcosecha, métodos como las quemadas controladas o tratamientos químicos son los más usados; sin embargo, ocasionan consecuencias negativas para el medio ambiente o no son eficientes en cuestión de tiempo. Las quemadas controladas es una de las formas de tratar los residuos que sólo deben usarse en caso de que el fuego sea la única herramienta que se tiene para

deshacerse de residuos vegetales en terrenos agrícolas (7). Otra forma es no remover los residuos de su lugar y dejarlos hasta que se descompongan lo cual tarda mucho tiempo y trae pérdidas económicas. Otros usos que se le han dado a los residuos postcosecha son el compostaje, ensilajes, abonos verdes o alimentación animal las cuales siguen siendo dispendiosas y poco efectivos si no se realizan correctamente. Todos estos tratamientos serían más eficientes o no habría la necesidad de usarlos si no fuera por la lignocelulosa presente en estos residuos post-cosecha, ya que es el principal componente de las plantas el cual se degrada más lentamente (8), su lenta degradación es debido a que la lignina es un polímero de unidades fenilpropano, altamente variable, que le da rigidez y resistencia a los tejidos vegetales (9). Por eso se usan los tratamientos químicos ya que son efectivos para alterar la estructura lignocelulósica y solubilizar los azúcares empleando un licor de bisulfito de sodio el cual disminuye sustancias inhibitoras derivadas de la lignina (4), pero esto ocasiona un problema ambiental al dejar residuos de sustancias tóxicas que contaminan los suelos.

2.1.2. Lignocelulosa

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono (**Figura 1**). La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta (8). En la **Tabla 1** se muestra la composición porcentual de polímeros (lignina, hemicelulosa, celulosa) de diferentes plantas de cultivo agrícola.

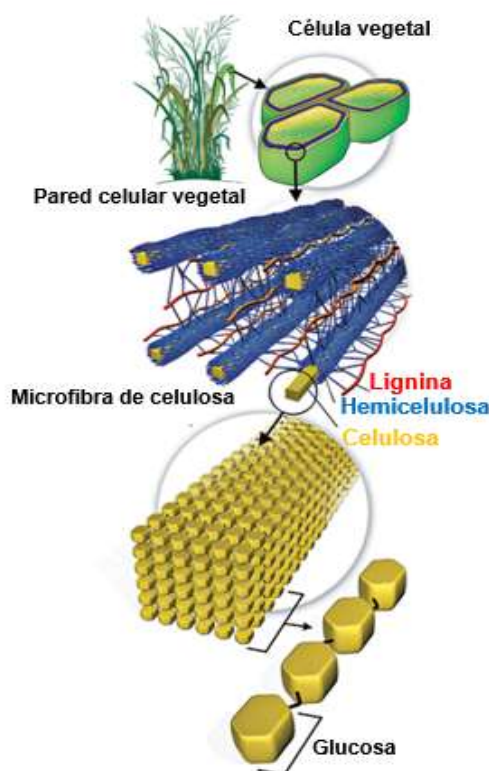


Figura 1. Composición de pared celular vegetal por polisacáridos (lignina, hemicelulosa, celulosa) modificada de American Chemical Society (10).

Tabla 1. Composición porcentual de polímeros (lignina, hemicelulosa, celulosa) de diferentes plantas de cultivo agrícola. (11-12-13).

Plantas agrícolas	Lignina %	Hemicelulosa %	Celulosa %
Tamo de arroz	18.20-24.6	18.1-21.35	25.89-35.5
Bagazo de caña de azúcar	23.09	22.4	39.01
Paja de trigo	16.85	19.53	32.64
Eucalipto	26.91	11.65	48.07
Rastrojo de maíz	18.59	21.99	37.69
Pulpa de café	17.6	2.3	17.7
Álamo	18.1	25.1	49.9
Sorgo	16.09	14.16	34.01

2.1.3. Hongos lignocelulolíticos

Entre los microorganismos capaces de degradar lignina y celulosa, los hongos como *Penicillium* sp, *Pleurotus* sp, *Paecilomyces* sp, entre otros., son los más importantes en los ecosistemas tropicales por su capacidad de secretar enzimas extracelulares, su adaptación a ambientes ácidos, y al estrés hídrico, su rápido crecimiento y estabilidad genética. Estos hongos degradan la celulosa rompiendo los enlaces glicosídicos β 1-4, por medio de endoglucanasas que cortan la regiones internas amorfas de la celulosa y exoglucanasas que cortan los extremos libres (9).

Existen dos grupos de hongos que se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo, ya que modifican la estructura química y su composición, esto lo hacen mediante reacciones de oxidación, permitiendo el acceso a esos componentes, sin embargo, no degradan la lignina completamente por eso queda como residuo. Y los que provocan la podredumbre blanca que degradan lignina, los cuales tienen la capacidad de degradar la lignina y mineralizarla a CO_2 y H_2O a partir de enzimas como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (5-14).

2.1.4. Transformación enzimática de la lignocelulosa

La transformación enzimática de la lignocelulosa implica la acción de enzimas que se encuentran dentro de complejos ligninolíticos, celulolíticos y hemicelulolíticos. El complejo ligninolítico comprende tres tipos de enzimas extracelulares como las lignina y manganeso peroxidases que oxidan los anillos aromáticos utilizando el peróxido de hidrógeno como co-sustrato y la lacasa, que está mayormente distribuida entre los hongos, oxida los residuos metoxilo laterales utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (9)(15).

El complejo celulolítico comprende enzimas como las endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. La endoglucanasa realiza la hidrólisis de enlaces glicosídicos por los extremos no reductores de la cadena de celulosa, liberando largas cadenas de oligómeros. Posteriormente la exoglucanasa o celobiohidrolasa realiza la hidrólisis en los extremos reductores y no reductores de los enlaces glicosídicos donde liberan celobiosa, y finalmente la β - glucosidasa libera glucosa por hidrólisis de los enlaces glicosídicos por cada unidad de glucosa (16).

El complejo hemicelulolítico comprende principalmente las enzimas degradadoras del xilano y del manano. Las xilanasas son las enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces glicosídicos del xilano y las mananas hidrolizan los enlaces glicosídicos del manano tanto

por los extremos no reductores como por los reductores gracias a las endo-1,4- β -mananidasas y las β -manosidasas (16-17).

2.1.5. Métodos de conservación

El uso de los microorganismos ha sido clave en la solución de graves problemas de la humanidad en la agricultura, alimentación, salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente, es por esto por lo que es de vital importancia conservar cultivos microbianos viables. Estos microorganismos son aislados de su ambiente natural, posteriormente son conservados en bancos de cultivos microbianos donde se conservan en tiempos de corto, mediano o largo plazo según el estudio y uso que se le quiera aplicar a futuro buscando viabilidad, pureza y estabilidad morfológica (19). Existen varios métodos de conservación de hongos, algunos de los más utilizados son subcultivos repetidos, liofilización y crio-preservación. Sin embargo, estos métodos no siempre son efectivos debido a que dependen de las características particulares que tiene cada especie (20). La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, un mecanismo de congelamiento, una fuente de vacío y una trampa para el vapor de agua, congelando la suspensión conidial de hongos filamentosos y removiendo el agua por sublimación (19).

Otros métodos de conservación como agua estéril y capa de aceite mineral garantizan la conservación de hongos filamentosos a medio plazo o largo plazo dependiendo de las características del microorganismo a conservar, siendo métodos de bajo costo y de fácil manejo, pero necesitan de constante atención y revisión para conservar la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica. Estos métodos de conservación consisten en recubrir con agua estéril o aceite mineral células del cultivo que se quiere conservar, esta técnica disminuye la deshidratación del medio y retarda la actividad metabólica del cultivo (19). Por otro lado, al recuperar los hongos después de los tiempos de conservación deben utilizarse medios que favorezcan la esporulación, como agar extracto de malta, agar papa dextrosa y agar avena. Estos medios, además de favorecer la esporulación, permiten a las colonias de los hongos expresar características de color, textura y producción de pigmentos difusibles al medio, siendo características claves para su correcta identificación taxonómica (21).

2.2 Antecedentes

2.2.1 Hongos de estudio

En el 2009 el grupo de investigación de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Pontificia Universidad Javeriana junto con la Universidad Nacional de Colombia, realizaron muestreos en suelos rizosféricos de cultivos de arroz en los departamentos de Tolima y Meta, Colombia. De estos se obtuvieron 436 aislamientos bacterianos y 40 aislamientos fúngicos, los cuales fueron conservados a 4°C en discos de agar en agua destilada. De las cepas conservadas 18 tenían actividad lignocelulolítica y los otros 22 actividad celulolítica (6). Los códigos de cada aislamiento y el género al que pertenece se encuentran en **Anexos 9.1**

2.2.2. Métodos de conservación utilizados para hongos filamentosos

Franco Correa et al en el 2006 (22), evaluaron 5 diferentes métodos de conservación (conservación en agua destilada suplementada con NaCl al 0.85% (p/v), en suelo, crioconservación en glicerol al 10% (v/v), conservación por transferencia seriada bajo una capa de aceite mineral y en tierra diatomácea) para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica bajo parámetros de viabilidad, pureza y actividad enzimática durante

cuatro meses. Se evaluó la viabilidad del microorganismo conservado en diferentes métodos determinando que los mejores son la conservación en agua destilada suplementada con NaCl al 0.85% y el suelo. Ya que estos métodos no afectaron la pureza del microorganismo ni la actividad enzimática en el momento del uso experimental.

Por otro lado, Toscano Palomar et al en el 2015 (23), evaluaron la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de siete cepas de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium sp.*, y *Trichoderma harzianum*) durante 24 meses por tres métodos de conservación: liofilización, en suelo-arena y en papel filtro, siendo reactivados en un medio nutritivo sólido (agar papa dextrosa) y un medio nutritivo líquido (caldo papa dextrosa). Obtuvieron porcentajes de viabilidad de 74.3% y 85.9% con el método de liofilización y secado en papel filtro, respectivamente. Por otro lado, el método de preservación en suelo-arena mostró las menores viabilidades con un porcentaje de 33.4% a los 24 meses, teniendo una mayor reactivación en el medio nutritivo sólido. Concluyendo que de los tres métodos de conservación la liofilización y el secado en papel filtro son los métodos más efectivos para largo plazo.

Oliveira et al en el 2011 (24), evaluaron la viabilidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* almacenados bajo diferentes métodos de conservación (liofilización, glicerol congelado y subcultivo) durante un año. Estos investigadores concluyeron que el subcultivo es el mejor método para la conservación, pero para un corto plazo de esta especie fúngica. Sin embargo, si se requiere almacenamiento a largo plazo, el congelamiento de glicerol demostró ser el método de preservación más eficiente.

Borman et al en el 2006 (25), evaluaron la viabilidad y posibles alteraciones morfológicas de 45 especies de hongos filamentosos patógenos conservados en agua estéril durante 2 meses y 21 años. El 90% de los hongos filamentosos se encontraban viables y observaron que ciertos hongos tuvieron alteraciones morfológicas durante la conservación como la pérdida de características morfológicas y la sobreproducción de micelio estéril con conidios aberrantes o sin conidios.

3. OBJETIVO

Evaluar la viabilidad y la actividad lignocelulolítica de 40 aislamientos de hongos filamentosos conservados en el banco del laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana.

4. METODOLOGÍA

4.1. Aislamiento y reactivación

Los diferentes viales que se trabajaron se obtuvieron en el screening de microorganismos lignocelulolíticos que se mencionó en antecedentes (6) y están conservados a 4°C en agua destilada en discos de agar, en el banco de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana. El proceso de reactivación de los viales se llevó a cabo empleando agar PDA (Scharlau) y agar Avena (20 gL⁻¹ de avena marca Quaker que contiene: 65 mg sodio, 200 mg de potasio, 4 g de carbohidratos totales y 4 g de proteína - Gluten o gliadina y 15 gL⁻¹ de agar agar (Scharlau)), se llevaron a incubación por un tiempo 10 días y una temperatura de 28°C. Luego de reactivar los viales se realizó una descripción macroscópica y microscópica de cada aislamiento evaluado.

4.2. Elaboración de bancos secundarios de conservación

A partir de la reactivación de los viales de cada aislamiento, se realizaron dos bancos secundarios, seleccionando los hongos que no presentaron contaminación para su posterior determinación de actividad enzimática. El primer banco se realizó por el método de discos de agar con un diámetro de 10 mm, depositados en tubos Eppendorf con 800 μL de agua estéril o 600 μL de aceite mineral y conservados a una temperatura de 4°C.

Por otro lado, el segundo banco se realizó por el método de conservación de conidios. En este método se hizo una suspensión de conidios con 10 mL de solución salina con Tween 80 al 0.1% (v/v), esta suspensión se pasó a tubos falcon de 15 mL para su posterior filtración en una jeringa con un algodón; el filtrado que se obtuvo se depositó en otro tubo falcon de 15 mL que se llevó a centrifugar (6000 rpm por 15 minutos en una centrifuga Hermle Z 206 A), el sobrenadante que se formó se descartó y se realizó otro lavado con 6 mL de solución salina con Tween 80, este paso se realizó dos veces más para tener una suspensión de conidios libre de micelio con una concentración de 10^8 conidios/mL la cual se confirmó mediante cámara de Neubauer. Por último, se usaron 600 μL de la suspensión y 600 μL de glicerol al 40% (v/v) para su conservación que se realizó en tubos Eppendorf a una temperatura de -20°C.

4.3. Actividad Enzimática

4.3.1 Actividad enzimática cualitativa

Se midió la actividad enzimática de cada hongo viable activo por métodos cualitativos, en el caso de la actividad celulolítica se empleó agar celulosa 1% (p/v) (En gL^{-1} extracto de levadura 2.5; carboximetilcelulosa (CMC) 10.0; triptosa 2.5; sulfato de amonio 0.5; cloruro de calcio, 0.5; fosfato monobásico de potasio, 0.1; fosfato dibásico de potasio, 0.1), para la siembra se usó agar agua (agar agar (Scharlau) 15 gL^{-1} y agua), para así formar una dilución con la suspensión de conidios (10^6 conidios/ml) de cada hongo, la cual usa 500 μL del agar agua y 500 μL de la suspensión y de ahí se tomaron 50 μL para sembrar en un pozo central en el agar celulosa, esto se llevó a incubar por 12 días a 28°C y se hizo por triplicado para cada hongo. Después de este tiempo se adicionó rojo congo al 1% (p/v), y se llevó a refrigeración por 12 horas y posteriormente se adicionó NaCl al 0.85% (p/v) evidenciándose la producción de halos de hidrólisis (26).

En el caso de la actividad ligninolítica se empleó agar lignina (En gL^{-1} fosfato monopotásico 0.5; sulfato de magnesio heptahidratado 0.2; nitrato de amonio 0.1; cloruro de potasio 0.1; sulfato de hierro heptahidratado 0.02; nitrato de calcio tetrahidratado 0.05; extracto de malta 2; agar agar 15; después de esterilizar, se dejó enfriar a 55°C se le agregó 5 ml de KOH (1M); 0.4 ml de guayacol, 1g de lignina alcalina, 30 mg de penicilina y 4 mg de cloranfenicol) se empleó el mismo tiempo y temperatura de incubación que se describió para la actividad celulolítica, la actividad ligninolítica se evidencia en el medio sólido por una coloración café producto de la oxidación del guayacol (27).

4.3.2 Evaluación de la temperatura para el método cuantitativo

Se realizó un ensayo con el hongo de código HC1 que corresponde a *Talaromyces sayulitensis* para la determinación de la temperatura de incubación a la cual se iba a someter la prueba para reacción enzimática. Para esto se cultivó el hongo en matraces de 250 mL, con un volumen efectivo de 120 mL. Se empleó la solución de macronutrientes propuesta por Mandels (En gL^{-1} : fosfato monopotásico, 0.3; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.83; cloruro de calcio, 0.3; sulfato de hierro heptahidratado, 0.005; sulfato de manganeso hidratado, 1.56 mg; sulfato de zinc heptahidratado, 1.4 mg y Tween 80, 0.2 mL, pH 6.0) (28), y se empleó tamo de arroz o CMC como fuente de carbono a una

concentración de 10 gL^{-1} y 5 gL^{-1} para la fuente de nitrógeno que fue sulfato de amonio (Merck). El inóculo consistió en 12 mL de una suspensión de conidios con una concentración de 10^6 conidios/mL. Después de inoculados, los matraces se incubaron a 28°C , en una incubadora orbital a 120 rpm por 8 días, se realizó este procedimiento por triplicado para cada hongo con cada una de las fuentes de carbono. En la medición de la actividad enzimática se emplearon 2 temperaturas de incubación 37°C y 50°C .

4.3.3 Actividad enzimática cuantitativa

Por métodos cuantitativos se determinó la actividad de celulasas totales en papel filtro (FPasas) (29); el medio de cultivo implementado para la obtención de celulasas es el mismo que se describió en el apartado 4.3.2 utilizando los 2 sustratos nombrados. Al finalizar los 8 días de montaje se filtró el contenido de cada matraz por un papel filtro Whatman de poro entre $5\text{-}10 \mu\text{m}$ empleando una bomba de vacío y lo filtrado se centrifugó por 15 minutos a 8000 rpm en una centrifuga Heraeus Megafuge 16R. Se utilizó papel de filtro cualitativo de 1 cm por 6 cm como sustrato, se usó también buffer citrato de sodio a un pH de 5 y una concentración de 0.05M. En tubos falcon de 15 ml se colocó el papel filtro, 2 ml del buffer y 2 ml del extracto enzimático y se incubó a 50°C por una hora, para la obtención de glucosa a partir de la degradación del papel filtro. Posteriormente se tomaron $250 \mu\text{L}$ del tubo falcón de 15 ml y se depositaron en un tubo de vidrio de 16×150 al cual se le agregaron $250 \mu\text{L}$ de DNS y se colocó a ebullición por 5 minutos, una vez pasado los 5 minutos se llevó a 5 minutos en frío y se adicionaron 2.5 ml de agua, una vez cumplida toda la reacción se leyó a 540 nm para la medición de azúcares expresados en glucosa (30). Para los blancos muestra se usaron 2 ml de buffer y 2 ml de extracto enzimático y para los blancos sustrato 2 ml de buffer y papel filtro. La absorbancia obtenida se convirtió en glucosa mediante una curva patrón realizada previamente (Anexo 9.4), y se calcularon las unidades enzimáticas que corresponden a $1\text{UC} = 1 \mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$ de glucosa (29).

4.4 Análisis estadístico

Se utilizó una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey, para establecer si existían diferencias entre los diferentes aislamientos, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics® 21.0. Previamente la distribución normal de la variable de respuesta fue verificada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la viabilidad de los 40 aislamientos de hongos lignocelulolíticos

Al reactivar los 40 aislamientos de hongos lignocelulolíticos (22 con actividad celulolítica y 18 con actividad ligninolítica) en agar PDA a 28°C , se obtuvieron 23 aislamientos viables de los cuales 20 pertenecían al grupo de hongos celulolíticos y 3 al grupo de hongos lignocelulolíticos. Es así como el porcentaje de viabilidad para los 40 aislamientos fue de 55%, de estos el 47.83% son hongos celulolíticos y el 7.17% hongos ligninolíticos (**Figura 2**). Esto quiere decir, para los hongos conservados con actividad celulolítica, que el método de conservación de discos de agar con agua estéril fue efectivo a largo plazo, debido a que no se afectó la pureza de los hongos en el transcurso del tiempo y de los 22 aislamientos se encontraron 20 viables, correspondiendo al 90,9% de los aislamientos conservados con actividad celulolítica. Esto puede compararse con el estudio realizado por Borman et al en el 2006 (25), donde evaluaron la viabilidad de 45 especies de hongos filamentosos patógenos almacenados en agua estéril, cada 2 meses por 21 años, encontrando que el 90% de los hongos filamentosos se encontraban viables al final el periodo de observación.

Sin embargo, para los hongos conservados con actividad ligninolítica este método no fue efectivo debido a que de los 18 aislamientos solo 3 se encontraron viables (17%). Aunque este método es uno de los más empleados para conservar estos hongos, presenta un mayor riesgo de que presenten cambios o pérdidas de características fisiológicas o morfológicas (24), esto se debe a la ausencia de estructuras reproductivas que no permiten una mayor sobrevivencia, ya que es uno de los principales activos que tienen los hongos para reproducirse y sobrevivir dado que tienen la capacidad de soportar condiciones extremas (31). Por eso se recomienda la implementación de aceite mineral (21) o implementar algunos protocolos descritos por Voyron et al en el 2009 (32) donde obtuvieron 2 métodos de conservación por liofilización y uno para crioconservación a -80°C capaces de mantener viable a los hongos por 18 meses y así evitar estas desventajas. No obstante, esto no significa que el método sea deficiente, pero no es efectivo a periodos largos de conservación, por lo que se debe ser cuidadoso con el monitoreo de los bancos y su reactivación a periodos cortos. Esto se representa en un experimento realizado por Ritcher et al en el 2010 (33), que comparó el método de conservación en agua destilada y la reactivación periódica de 14 aislamientos de hongos de podredumbre blanca y parda durante 18 años renovando los bancos anualmente y midiendo la capacidad de descomposición de un bloque de madera. Los resultados mostraron que ninguno de los métodos implementados presentó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en producción de biomasa y de descomposición de la madera, manteniendo su actividad enzimática.

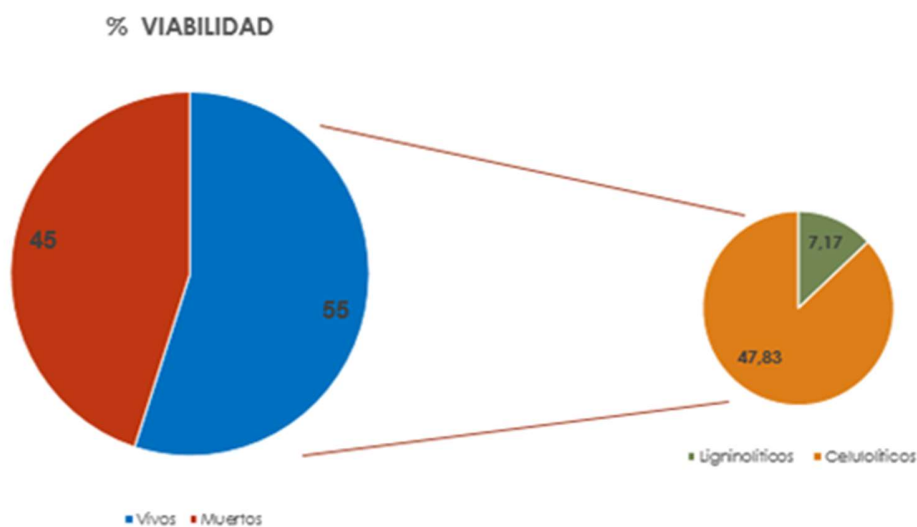


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de los 40 aislamientos de hongos filamentosos y su clasificación según su actividad enzimática (celulolíticos y ligninolíticos).

5.2. Evaluación de la actividad enzimática celulolítica cualitativa en agar celulosa

Fue posible determinar la actividad enzimática celulolítica de los 20 aislamientos de hongos filamentosos a partir de su halo de hidrólisis en agar celulosa después de 12 días de crecimiento a 28°C , y se seleccionaron los aislamientos que obtuvieron mayor halo de hidrólisis (**Figura 3**) para posteriormente ser evaluados por métodos cuantitativos en fermentación líquida. Gracias a un ANOVA seguido de una prueba Post-Hoc fue posible

determinar que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), y así clasificarlos en grupos (a-h) de menor a mayor halo de hidrólisis (**Figura 4**).

El halo producido por la hidrólisis de la celulosa está relacionado con la región de acción de las enzimas celulolíticas, ya que el colorante permanece unido a las regiones de enlaces β -1,4-D-glucanohidrolasa (34). Los valores reportados representan el promedio de 3 réplicas por cada aislamiento evaluado, seleccionando los 11 mejores aislamientos con mayor halo de hidrólisis: MF 9-61 (7.7 ± 0.2 cm), MF 10-63 (7.5 ± 0.1 cm), TF 3-70 (7.5 ± 0 cm), *T. sayulitensis* (7.3 ± 0.1 cm), TF 3-88 (7.2 ± 0.2 cm), MF 11-76 (7.0 ± 0.1 cm), MF 1-22 (6.1 ± 0.2 cm), *P. chysogenum* (6.1 ± 0.2 cm), TF 3-65 (5.7 ± 0.1 cm), TF 6-68 (5.6 ± 0.1 cm), TF 7-67 (5.6 ± 0 cm). Los resultados obtenidos pueden compararse con lo reportado por Florencio et al en el 2012 (34), donde evaluaron 49 cepas de *Trichoderma* sp en placas de agar con carboximetilcelulosa durante 4 días a 30°C, los valores obtenidos fueron entre 0,9 a 3,7 cm. En otro estudio realizado por Sazci et al en 1986 (35) evaluaron diferentes cepas de hongos filamentosos en placas de agar con carboximetilcelulosa durante 5 días a 26°C, obteniendo resultados para *Penicillium italicum* (2.3cm), *Aspergillus niger* (4.0cm) y *Aspergillus ochraceus* (3.8cm). En el presente trabajo los aislamientos del género *Aspergillus* sp. presentaron mayor halo de hidrolisis que los 8 aislamientos del género *Penicillium* sp. A pesar de que los estudios anteriormente mencionados fueron incubados en menos días y por tanto los halos de hidrolisis reportados fueron más bajos que los obtenidos en este trabajo, se evidencia efectivamente la capacidad de los hongos filamentosos de hidrolizar la celulosa debido a que se fracciona el polímero. Los resultados también muestran que los aislamientos viables conservaron su actividad enzimática en el periodo de tiempo en que se almacenaron.

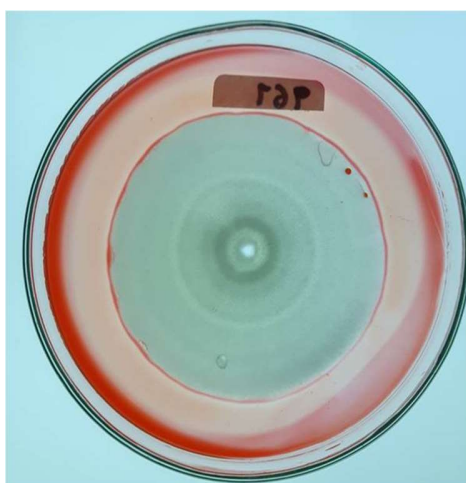


Figura 3. Halo de hidrolisis del aislamiento MF 9-61 revelados con rojo Congo en agar celulosa.

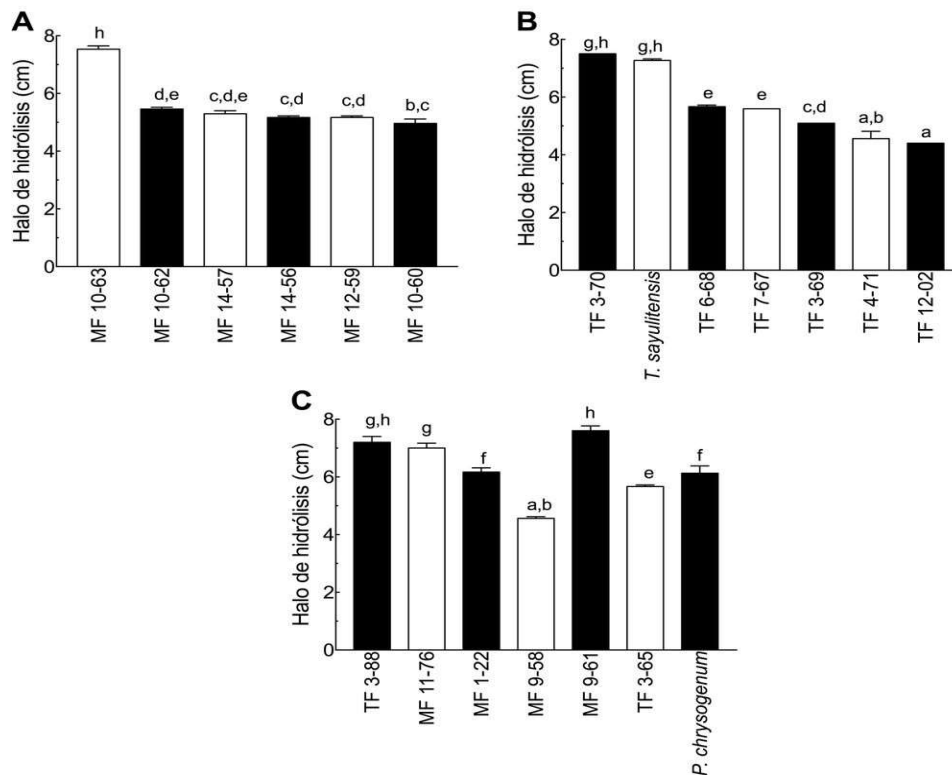


Figura 4. Halos de hidrólisis (cm) de 20 aislamientos de hongos filamentosos constituidos por sus especies y lugar de aislamiento. Donde, A: *Penicillium* sp (Meta), B: *Penicillium* sp (Tolima) y C: Otros como *Paecilomyces* sp, *Aspergillus* sp (Meta y Tolima) y *Penicillium chrysogenum*. Los resultados corresponden a la media de 3 réplicas.

5.3. Evaluación de la actividad enzimática ligninolítica cualitativa en agar lignina

Fue posible determinar la actividad enzimática ligninolítica de los 3 aislamientos de hongos filamentosos a partir de su halo de oxidación del guayacol en agar lignina, después de 10 días de crecimiento a 28°C. Se realizó un análisis estadístico empleando un ANOVA seguido de una prueba Post-Hoc donde fue posible determinar que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), y así clasificarlos en grupos (a-c) de menor a mayor halo de oxidación (**Figura 6**).

Los valores reportados representan el promedio de 3 réplicas por cada aislamiento evaluado, donde los aislamientos de MF 1-83 (*P. ostreatus*) mostró un halo de oxidación de 5.7 ± 0.5 cm y MF 3-86 de 1.3 ± 0.3 cm. Esto se corrobora con el estudio realizado por Kocyigit et al en el 2012 (36), donde obtuvieron un halo de hidrólisis de 6.6cm con guayacol y 8.5cm con ABTS como indicadores para *Trametes trogii*, usando un medio base modificado que contenía glucosa, extracto de levadura y asparagina, comparando el halo de oxidación obtenido en guayacol los resultados fueron cercanos con el aislamiento MF1-83 (*P. ostreatus*). Esto indica que las condiciones del medio son importantes para que el complejo enzimático de los aislamientos tenga la capacidad de oxidar la lignina. No obstante es recomendable usar ABTS como indicador ya que según lo reportado por Kocyigit et al en el 2012 (36), se evidenció mayor halo de oxidación en el medio con ABTS que en Guayacol.

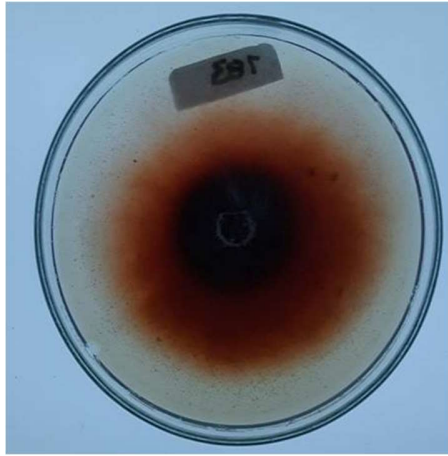


Figura 5. Halo de oxidación en agar lignina.

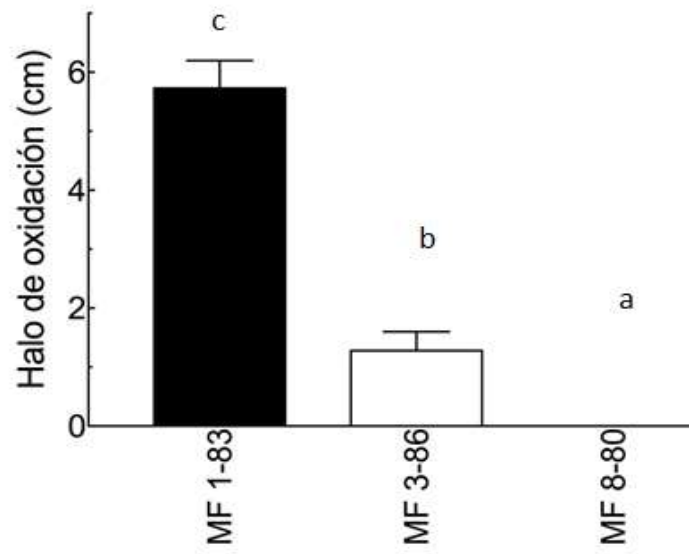


Figura 6. Halos de oxidación (cm) en agar lignina de 3 aislamientos de hongos filamentosos.

5.4. Evaluación de la temperatura para el método cuantitativo

Inicialmente se realizó un ensayo evaluando la temperatura más adecuada de incubación para la determinación de actividad enzimática, para esto se usó el aislamiento de *T. sayulitensis* y la determinación de actividad se realizó a 50°C y 37°C durante una hora, usando como sustrato papel de filtro, tal como se describió en el numeral 4.3.3. La temperatura de 50°C fue seleccionada por lo mencionado por Ghose en 1986 (29), mientras que la temperatura de 37°C se seleccionó por el estudio realizado por Kumar et al en el 2007 (37). Los resultados muestran una mayor actividad enzimática a 50°C que a 37°C (**Figura 7**), lo que puede deberse a que las reacciones catalizadas por enzimas muestran un incremento de velocidad al aumentar la temperatura dentro de un intervalo corto, el cual depende del tiempo de incubación de la reacción, el pH y el origen de la enzima, es así como esta variable afecta notablemente los resultados del ensayo (38).

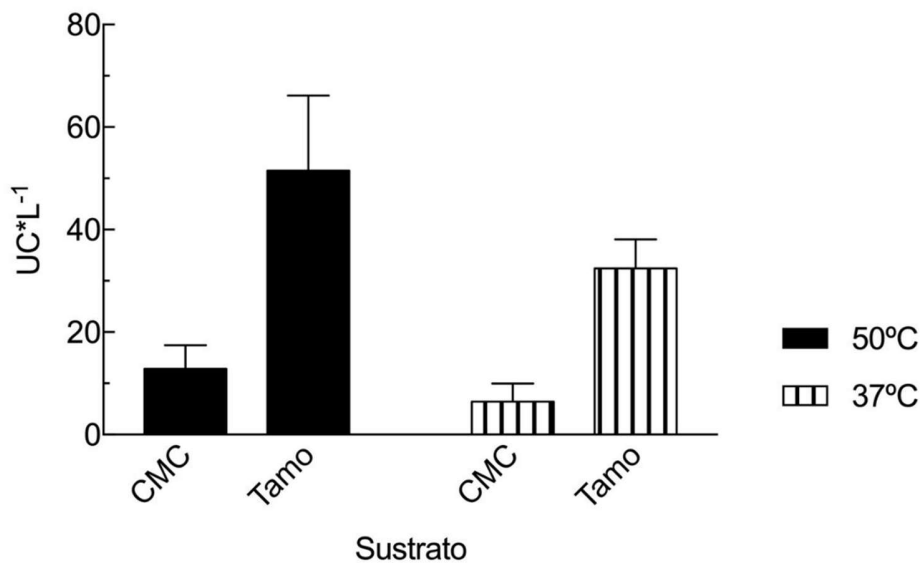


Figura 7. Actividad enzimática celulolítica en tamo de arroz y carboximetilcelulosa de *T. sayulitensis* a 50°C y 37°C.

5.5. Evaluación de la actividad enzimática celulolítica cuantitativa en tamo de arroz y carboximetilcelulosa a 50°C

Luego de evaluar los aislamientos en agar celulosa para determinar su actividad enzimática según el diámetro del halo de hidrólisis, se seleccionaron los 11 mejores aislamientos y se les evaluó su actividad enzimática celulolítica en tamo de arroz y carboximetilcelulosa por la técnica FPasas para celulasas (29). Se realizó un análisis estadístico empleando un ANOVA seguido de una prueba Post-Hoc donde fue posible determinar que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), debido a que *T. sayulitensis* fue significativamente diferente a los demás aislamientos, se realizó otro análisis estadístico sin este aislamiento para observar diferencias representativas de la actividad enzimática de los demás aislamientos, esta se representa de color **naranja** (a-b) de menor a mayor actividad enzimática (**Figura 8**).

Los valores reportados representan el promedio de 3 réplicas por cada aislamiento evaluado; el aislamiento de *T. sayulitensis* mostró mayor actividad (48.41 ± 15.7 y 38.49 ± 0.7 UC*L⁻¹ para tamo de arroz y carboximetilcelulosa respectivamente) que los demás

aislamientos. Choudhary et al en 2016 (39), evaluaron hongos con actividad lignocelulolítica en una mezcla de tamo de arroz y paja de trigo como sustrato de fermentación y también evaluaron la actividad por la técnica FPasas de once aislamientos entre los géneros *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, los cuales presentaron una alta actividad celulolítica siendo los aislamientos más representativos *Penicillium janthinellum* con actividad celulolítica de 167 UC*L⁻¹, y *Aspergillus terreus* con actividad de casi 160 UC*L⁻¹; comparando con los aislamientos que se trabajaron en el presente trabajo donde la actividad enzimática fue baja y no pasan de más de 15 UC*L⁻¹. En un estudio realizado por Hussain et al en 2012 (40) evaluaron la actividad enzimática celulolítica de *Paecilomyces variotti*, donde obtuvieron entre 500 a 300 UC*L⁻¹ con carboximetilcelulosa como sustrato de fermentación, comparado con el presente trabajo donde el aislamiento MF 9-61 del género *Paecilomyces* sp en el mismo sustrato se mostró con muy pocas unidades celulolíticas (**Figura 8**). Esto puede deberse a que los aislamientos evaluados necesiten de otra fuente de carbono de más fácil acceso para posteriormente degradar los sustratos usados en la fermentación (tamo de arroz y carboximetilcelulosa) ya que estos al ser polímeros de difícil degradación dificultan la producción enzimática por parte del microorganismo.

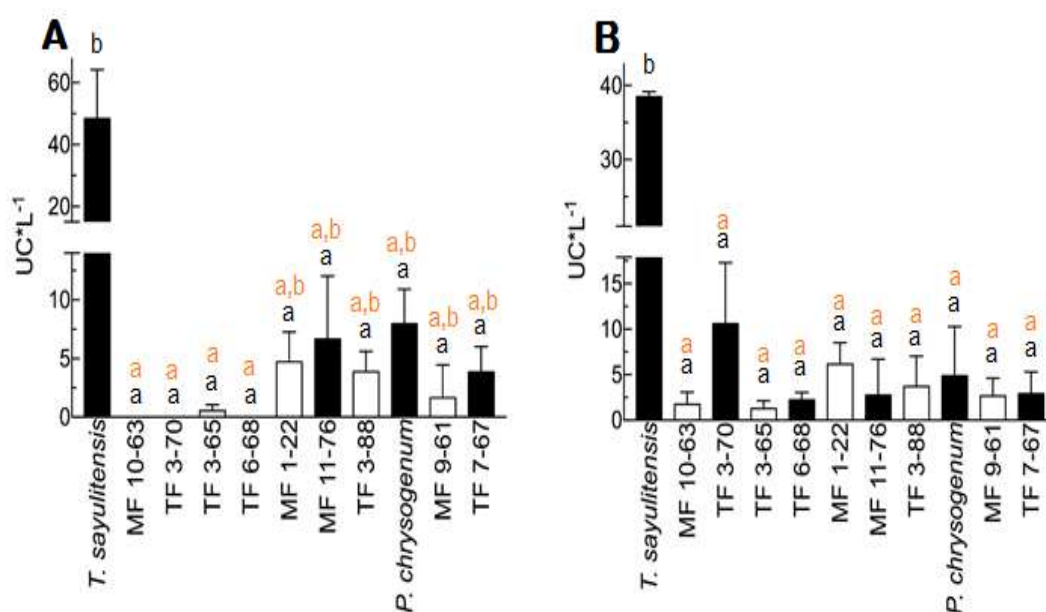


Figura 8. Actividad enzimática celulolítica de 11 aislamientos de hongos filamentosos evaluados en dos tipos de sustratos. Correspondiendo, A: Tamo de arroz y B: Carboximetilcelulosa. Se realizaron dos análisis estadísticos (a-b). Donde, Negro: diferencias estadísticas de los 11 aislamientos y Naranja: diferencias estadísticas sin *T. sayulitensis*.

6. CONCLUSIONES

De los 40 aislamientos de hongos filamentosos el 55% se encuentra viable, donde el 47.83% pertenecen a hongos celulolíticos y el 7.17% a hongos ligninolíticos, mostrando que

el método de conservación empleado fue efectivo en el caso de los hongos con actividad celulolítica, por lo contrario, para los hongos con actividad ligninolítica el método no fue del todo efectivo debido a que estos hongos son de micelio estéril lo que dificulta su viabilidad por periodos largos de conservación.

De los 23 aislamientos evaluados, 22 conservaron su actividad enzimática lignocelulolítica durante los 9 años de conservación, ya que la evaluación cualitativa demostró que los aislamientos evaluados tuvieron la capacidad de hidrolizar el medio con celulosa y la capacidad de oxidar el medio con lignina alcalina.

La evaluación cuantitativa en medio líquido demostró una mejor producción de unidades celulolíticas por la técnica FPasas a 50°C, esto se debe a que la temperatura se comportó como un factor físico de la reacción acelerando la producción de azúcares reductores.

Talaromyces sayulitensis fue el aislamiento con mayor actividad enzimática en los dos sustratos de fermentación evaluados (Tamo de arroz y CMC) y eso pudo deberse a que estos sustratos al ser de difícil degradación dificultaron la producción de enzimas para los demás aislamientos ya que no todos los microorganismos se comportan igual en los sustratos utilizados.

7. RECOMENDACIONES

Para la conservación de hongos con actividad ligninolítica se debe emplear otro tipo de métodos o monitorear constantemente los bancos de conservación ya que estos son de micelio estéril y dificultan su viabilidad a periodos largos de conservación. También se recomienda usar otros sustratos de fermentación líquida para la evaluación cuantitativa de hongos celulolíticos como la paja de trigo, bagazo de caña de azúcar y celulosa comercial. Para obtener mejores resultados en la cuantificación se recomienda trabajar simultáneamente las evaluaciones cuantitativas y cualitativas para la optimización de los medios líquidos y sólidos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalez P, Victoria L, Patricia S, Gómez M, Andrea P, Abad G. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia Exploitation of agroindustrial waste in Colombia Exploração de resíduos agroindustriais na Colômbia. 2018; Disponible en: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/rt/printerFriendly/2040/2251>
2. Huamán Q, Administro V, Sac P. Descripción de los efectos de los óxidos de carbono (CO₂ y CO) en ambientes interiores y exteriores Description on effects of carbon oxides (CO₂ y CO) in doorand outdoor environment. *Rev Investig Univ.* 2015;4(1):11–5.
3. Chávez Porras Á, Rodríguez González A. Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica. *Acad y Virtualidad.* 2016;9(2):90–107. Disponible en: <http://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/ravi/article/view/2004>
4. Javier Pantoja-matta A, Fernando Cuatin-inguilán M, Muñoz-muñoz D. Efecto del pretratamiento químico y enzimático en la deslignificación de biomasa agroindustrial típica del cauca effect of pretreatment chemical and enzymatic on deslignification of typical agroindustrial biomass of department cauca efeito do prétratament. *Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial.* 2015;13(1):45–5345. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n1/v13n1a06.pdf>

5. Ortiz-Moreno ML, Uribe Velez D. Aislamiento de hongos degradadores de lignina a partir de suelos con dos usos agrícolas (sabana de pastoreo y bosque secundario) de sabana inundable, Puerto Lopez (Meta). *Suelos Ecuatorianos*. 2017;37(1):70–4. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Martha_Ortiz-Moreno/publication/279752203_Aislamiento_de_hongos_degradadores_de_lignina_a_partir_de_suelos_con_dos_usos_agricolas_sabana_de_pastoreo_y_bosque_secundario_de_sabana_inundable_Puerto_Lopez_Meta/links/5599c
6. Gutiérrez-Rojas I, Matiz-Villamil A, Aguirre-Morales M, Reyes-Pineda E, Lemos-Gordo SN, Méndez-Pedraza JM, et al. Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos, y actividad b-glucosidasa en agrosistemas de arroz. *Univ Nac Colomb Inst Biotecnol*. 2012;89–109. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Urbe-Velez/publication/258048417_Conozcamos_el_componente_biologico_del_suelo_para_un_desarrollo_sostenible_del_cultivo_de_arroz/links/55c3ca9708aeca747d5faf70/Conozcamos-el-componente-biologico-del-suelo-para-
7. Moral NP, Gómez H, Beneyto LM. Residuos orgánicos y agricultura. 1995;
8. Chávez-Sifontes M, Domine ME. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial lignin, structure and applications: depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. 2013;4(4):15–46. Disponible en: http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/
9. Lucía M, Moreno O, Vélez DU. Determination of lignocellulolytic activity in a natural substrate of native fungi strains obtained from pasture savanna and of secondary forest from a tropical flooded savanna. *Ci suelo*. 2010;28(2):169–80. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v28n2/v28n2a05.pdf>
10. American Chemical Society. Chemical and engineering news: "news edition" of the American Chemical Society. [Internet]. *The American Chemical Society*; 1942. Disponible en: <https://cen.acs.org/articles/86/i49/Lignocellulose-Complex-Biomaterial.html>
11. Valverde A, Sarria B, Monteagudo J. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Sci Tech Año XIII*. 2007;1(37):255–60.
12. Davison BH, Parks J, Davis MF, Donohoe BS. Plant cell walls: Basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion BT - Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals. *Aqueous Pretreat plant biomass Biol Chem Converts to fuels Chem*. 2013; Disponible en: [papers3://publication/uuid/316A4F7F-F1A9-4229-B004-647D80CE17F7](https://www.researchgate.net/publication/316A4F7F-F1A9-4229-B004-647D80CE17F7)
13. Carroll A, Somerville C. Cellulosic biofuels. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:165–82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19014348>
14. Elizabeth Álvarez-Gutiérrez P, Corzo-González Z, Yañez-Ocampo G, Del Y, Pérez-Luna C. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre-tratamiento de Residuos Lignocelulósicos. *BioTecnología*. 2014;18(3).
15. Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojta -Wasilewska M, Cho N-S, et al. Review Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genet Biol*. 1999;27:175–85.

16. Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014 May 1;33:188–203. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114000999>
17. Dhawan S, Kaur J. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2007 Jan 10;27(4):197–216. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550701775919>
18. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Jun 27;67(5):577–91. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1904-7>
19. Francisco D, Arrebola A, Alfredo L, Fernández R, Menéndez RG. Métodos generales de conservación de microorganismos. *Finlay.* 2008. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262724715_Metodos_generales_de_conservacion_de_microorganismos
20. García-García M, Rocha-Zavaleta L, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA. Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water. *MethodsX.* 2014;
21. Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2005;25(1):136–45. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1994/199416547007.pdf>
22. Henao I, Franco-Correa M, Marín G. Evaluación de métodos de conservación para *aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. 2006;11(2):51–60.
23. Toscano Palomar L, Vertiz Pelaez E, Díaz LC, Guadalupe M, Moreno A, Velázquez ÁG, et al. Comparación de tres tecnologías en la preservación de conidias de hongos filamentosos y pruebas de viabilidad. 2015;15:125–34.
24. Oliveira I, Pereira JA, Bento A, Baptista P. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Ann Microbiol.* 2011 Jun 10;61(2):339–44. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0147-8>
25. Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 2006;161(6):361–8.
26. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* 2008 Nov 23;57(5):503–7. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-008-9276-8>
27. Thorn RG, Reddy CA, Harris D, Paul EA. Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(11):4288–92.
28. Mandels M, Weber J. The Production of Cellulases. In 1969. p. 391–414. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ba-1969-0095.ch023>
29. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.* 1987;59(2). Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue->

2/pac198759020257/pac198759020257.xml

30. Miller G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Disponible en. 1959;31(3):426–8.
31. Gato Y. Métodos de conservación y formulación. *Fitosanidad*. 2010;14(3):189–95.
32. Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginepro M, Declerck S, et al. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycol Res*. 2009;113(10):1027–38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
33. Richter DL, Kangas LC, Smith JK, Laks PE. Comparison of effectiveness of wood decay fungi maintained by annual subculture on agar and stored in sterile water for 18 years. *Can J Microbiol*. 2010;56:268–71.
34. Florencio C, Couri S, Farinas CS. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by trichoderma strains. *Enzyme Res*. 2012;2012.
35. Sazci A, Erenler K, Radford A. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *J Appl Bacteriol*. 1986;61(6):559–62.
36. Kocyigit A, Pazarbasi MB, Yasa I, Ozdemir G, Karaboz I. Production of laccase from *Trametes trogii* TEM H2: A newly isolated white-rot fungus by air sampling. *J Basic Microbiol*. 2012;52(6):661–9.
37. Kumar R, Dahiya JS, Singh D, Nigam P. Production of endo-1,4- β -glucanase by a biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum*. *Bioresour Technol*. 2000;75(1):95–7.
38. Conn E, Stumpf P, Bruening G, Doi R. Bioquímica Fundamental [Internet]. 5th ed. Limusa, editor. 131-181 p. Available from: <http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011>
39. Choudhary M, Sharma PC, Jat HS, Nehra V, McDonald AJ, Garg N. Crop residue degradation by fungi isolated from conservation agriculture fields under rice–wheat system of North-West India. *Int J Recycl Org Waste Agric*. 2016;5(4):349–60.
40. Hussain A, Shrivastav A, Jain SK. Cellulolytic Enzymatic Activity of Soft Rot Filamentous Fungi *Paecilomyces variotii*. *Adv Biores*. 2012;3(3):10–7.

9. ANEXOS

9.1 Codigos de los aislamientos, genero de cada aislamiento y su halo de hidrolisis.

Tabla 2. Halos de hidrolisis en centímetros de los 23 hongos viables.

Código	Genero	Halo (cm)			Promedio (cm)	DS
MF 9-61	<i>Paecilomyces</i> sp	7,5	7,8	7,5	7,7	0,2
MF 10-63	<i>Penicillium</i> sp	7,6	7,4	7,6	7,5	0,1
TF 3-70	<i>Penicillium</i> sp	7,5	7,5	-	7,5	0,0
HC1	<i>T. sayulitensis</i>	7,3	7,2	-	7,3	0,1
TF 3-88	<i>Aspergillus</i> sp	7	7,2	7,4	7,2	0,2
MF 11-76	<i>Aspergillus</i> sp	6,9	7,2	6,9	7	0,2
10-75	<i>P.chysogenum</i>	5,9	6,4	6,1	6,1	0,3
MF 1-22	<i>Aspergillus</i> sp	6,3	6	-	6,1	0,2
TF 3-65	<i>Paecilomyces</i> sp	5,6	5,7	5,7	5,7	0,1
TF 6-68	<i>Penicillium</i> sp	5,7	5,6	-	5,6	0,1
TF 7-67	<i>Penicillium</i> sp	5,6	5,6	-	5,6	0,0
MF 10-62	<i>Penicillium</i> sp	5,5	5,4	-	5,5	0,1
MF 14-57	<i>Penicillium</i> sp	5,4	5,2	-	5,3	0,1
MF 14-56	<i>Penicillium</i> sp	5,1	5,2	-	5,2	0,1
MF 12-59	<i>Penicillium</i> sp	5,2	5,1	-	5,1	0,1
TF 3-69	<i>Penicillium</i> sp	5,1	5,1	5,1	5,1	0,0
MF 10-60	<i>Penicillium</i> sp	5	4,8	5,1	5	0,2
MF 9-58	<i>Aspergillus</i> sp	4,6	4,5	-	4,6	0,1
TF 4-71	<i>Penicillium</i> sp	4,25	4,8	-	4,5	0,4
TF 12-02	<i>Penicillium</i> sp	4,4	4,4	-	4,4	0,0
MF 8-80	Micelio estéril	2,8	2,8	2,9	2,8	0,1
MF 3-86	Micelio estéril	0	0	-	0	0,0
MF 1-83	<i>P.ostreatus</i>	0	0	-	0	0,0

9.2 Halos de oxidación

Tabla 2. Halos de oxidación en centímetros de los 3 hongos ligninolíticos viables

Código	Genero	Halo (cm)			Promedio (cm)	DS
MF 8-80	Micelio estéril	0	0	0	0	0,0
MF 3-86	Micelio estéril	1	1,2	1,6	1,3	0,3
MF 1-83	<i>P.ostreatus</i>	6,2	5,7	5,3	5,7	0,5

9.3 Halos de hidrolisis y oxidación , aislamientos fungicos y fermentación líquida.

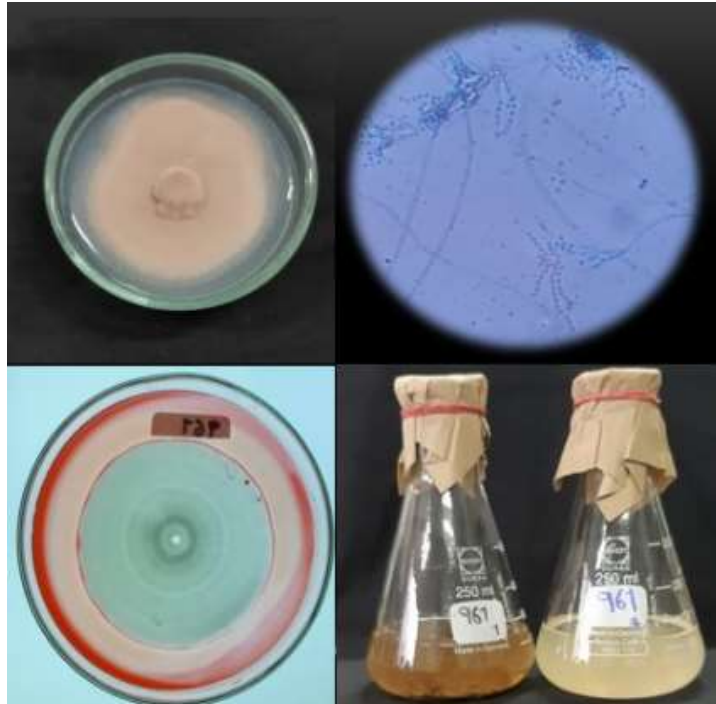


Figura 9. Aislamiento MF9-61 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.



Figura 10. Aislamiento MF10-63 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

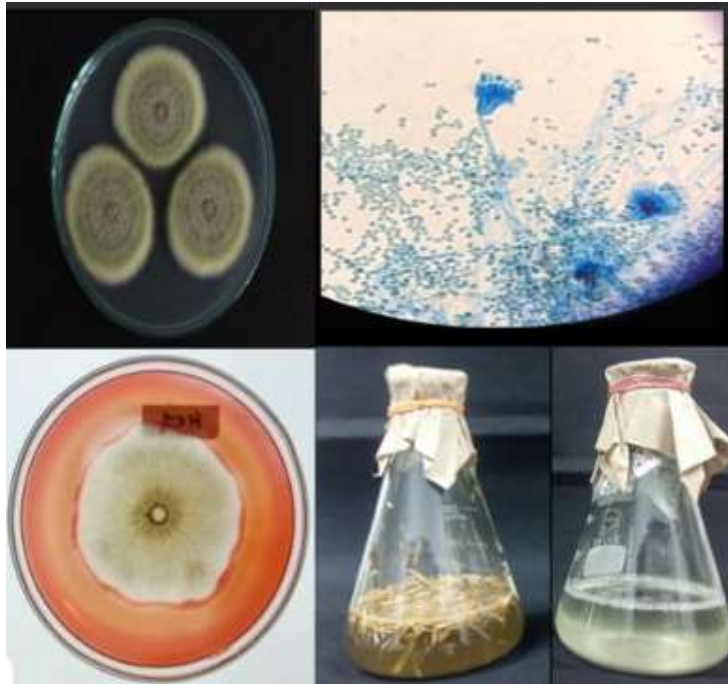


Figura 11. Aislamiento HC1 (*T. sayulitensis*) en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

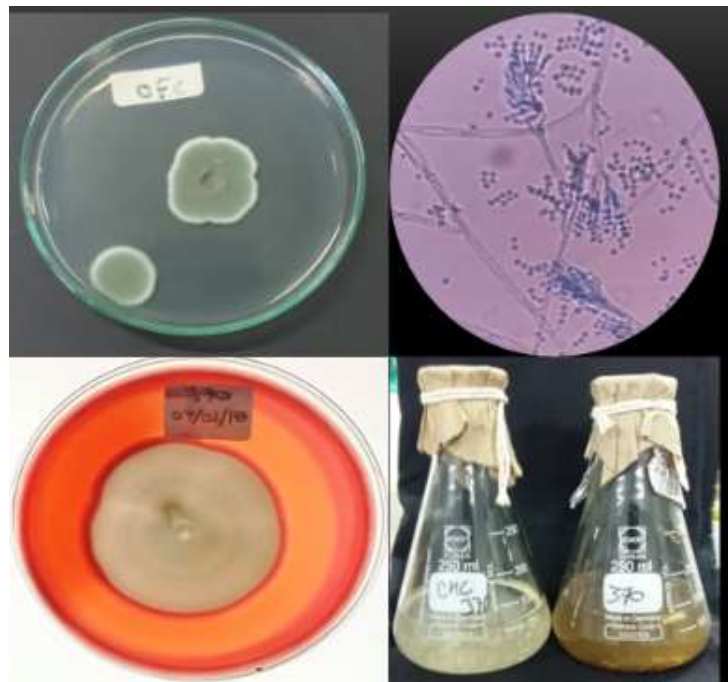


Figura 12. Aislamiento TF3-70 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

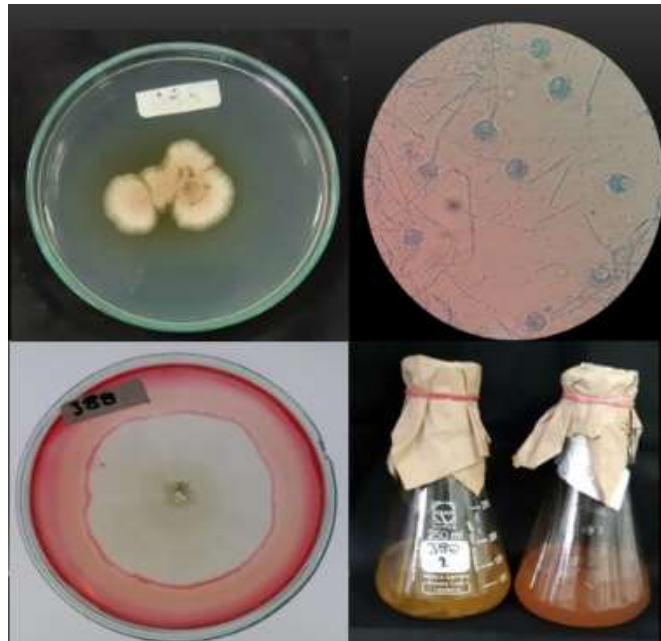


Figura 13. Aislamiento MF3-88 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.



Figura 14. Aislamiento MF11-76 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

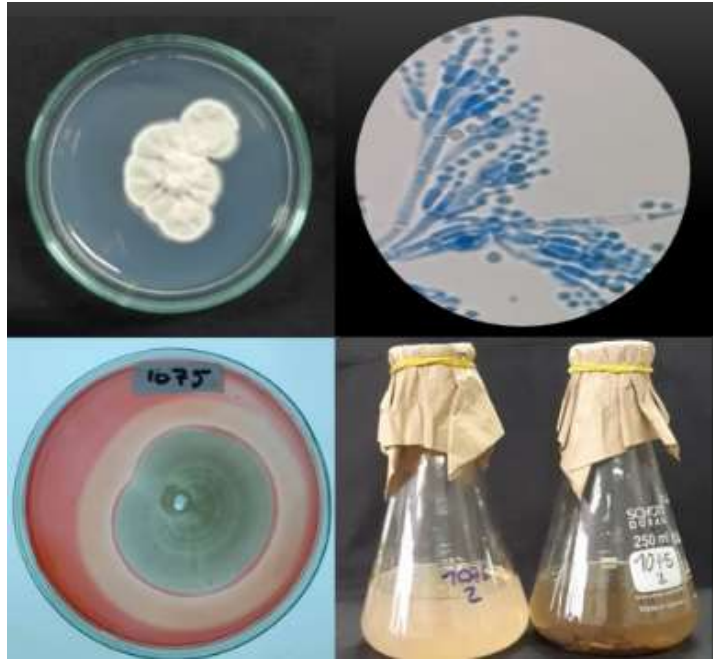


Figura 15. Aislamiento 10-75 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

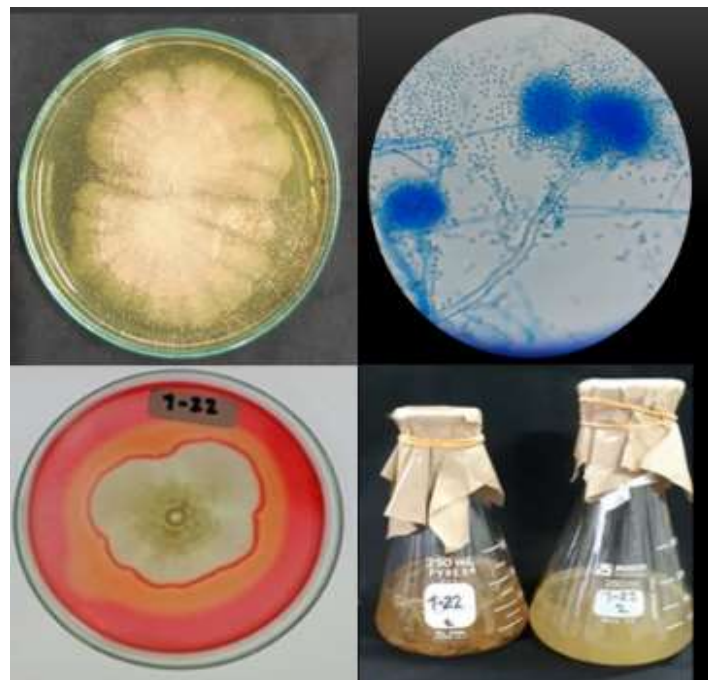


Figura 16. Aislamiento MF1-22 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

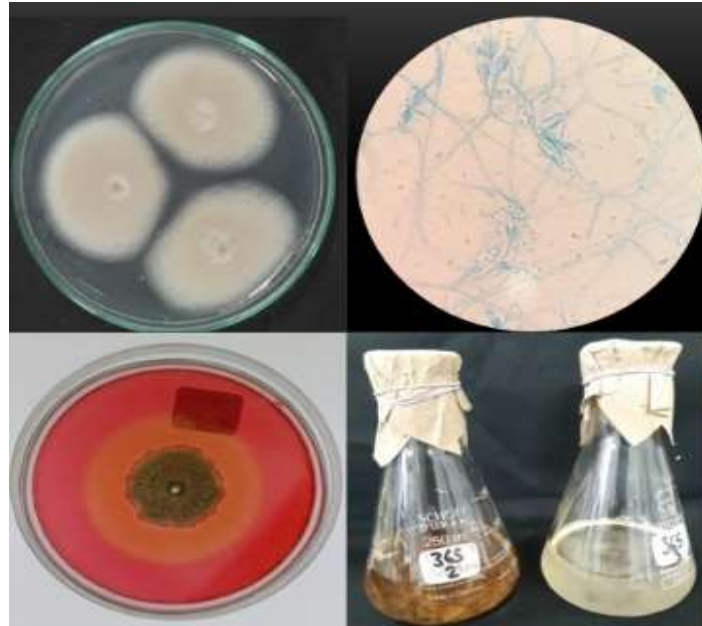


Figura 17. Aislamiento TF3-65 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

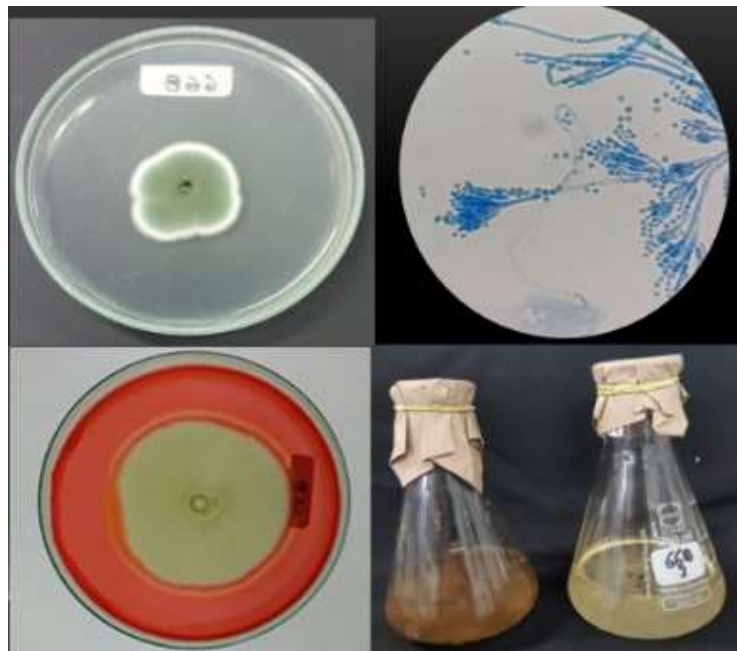


Figura 18. Aislamiento TF6-68 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.



Figura 19. Aislamiento TF7-67 en PDA, Microscopía, halo de hidrolisis y fermentación líquida.

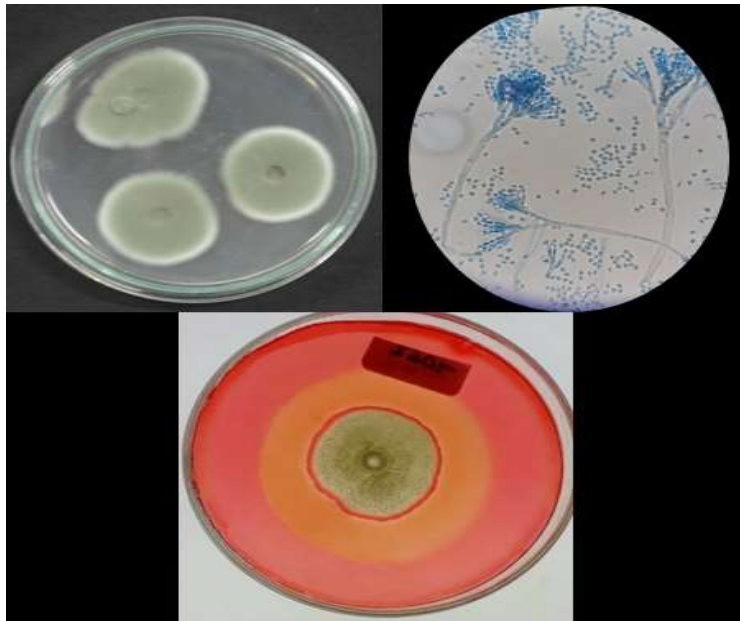


Figura 20. Aislamiento MF14-57 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

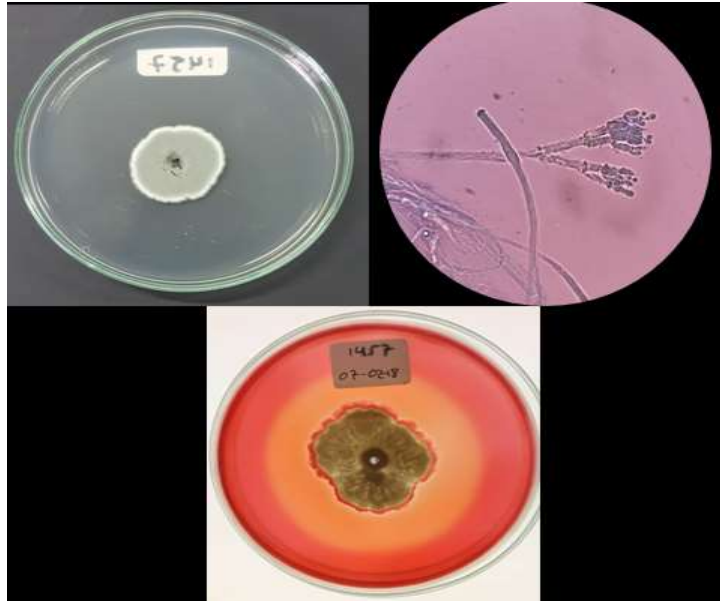


Figura 21. Aislamiento MF14-57 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

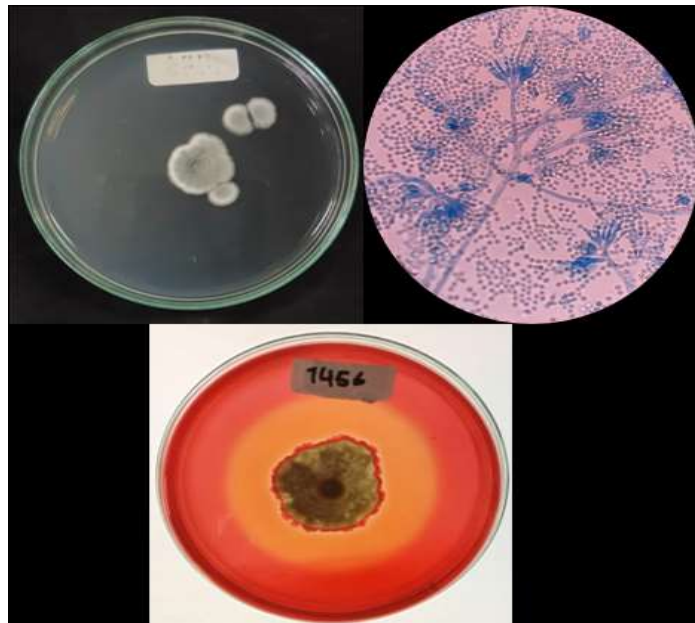


Figura 22. Aislamiento MF14-56 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

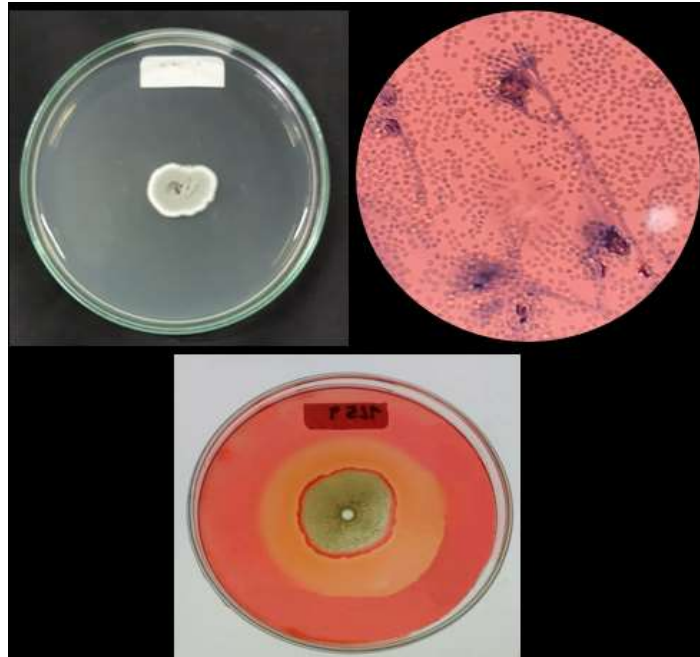


Figura 23. Aislamiento MF12-59 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

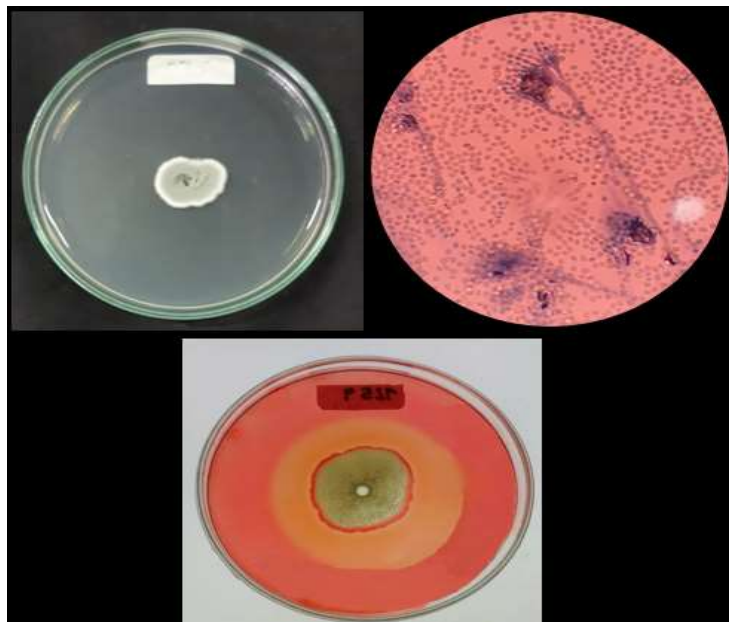


Figura 24. Aislamiento TF3-69 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.



Figura 25. Aislamiento MF10-60 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

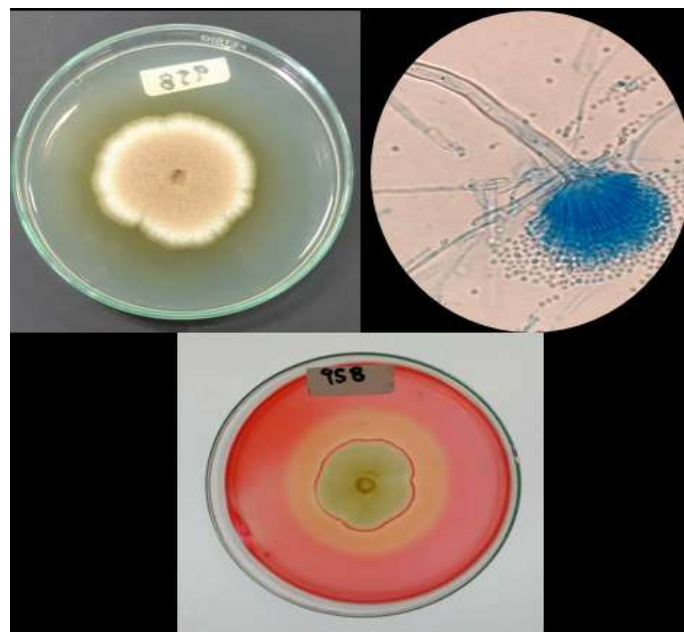


Figura 26. Aislamiento MF9-58 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

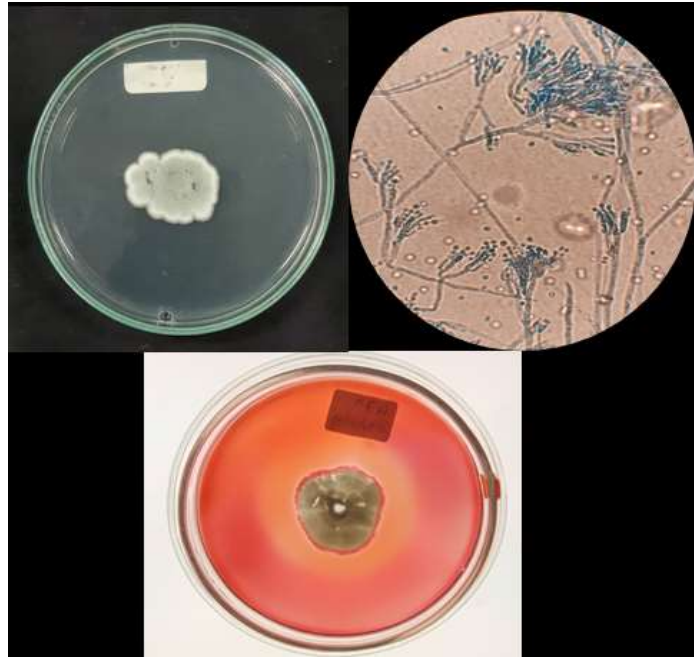


Figura 27. Aislamiento TF4-71 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.



Figura 28. Aislamiento TF12-02 en PDA, Microscopía y halo de hidrolisis.

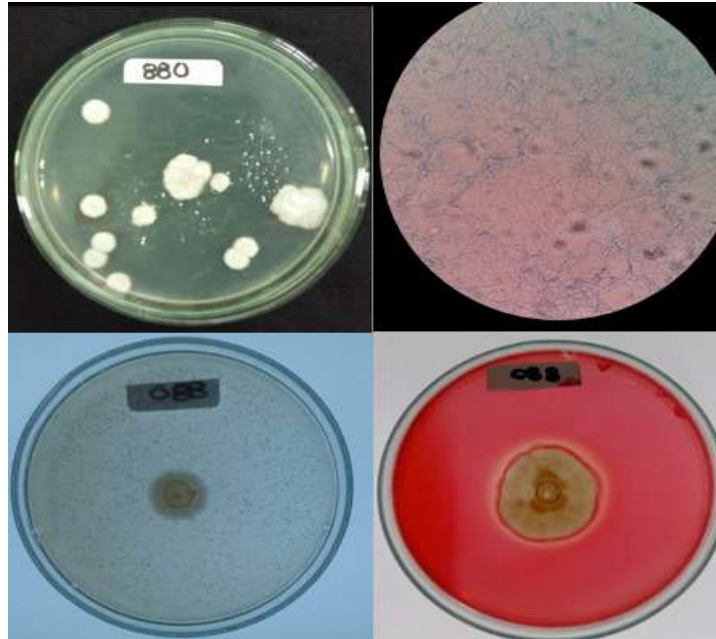


Figura 29. Aislamiento MF8-80 en PDA, Microscopía, halo de oxidación y halo de hidrolisis.

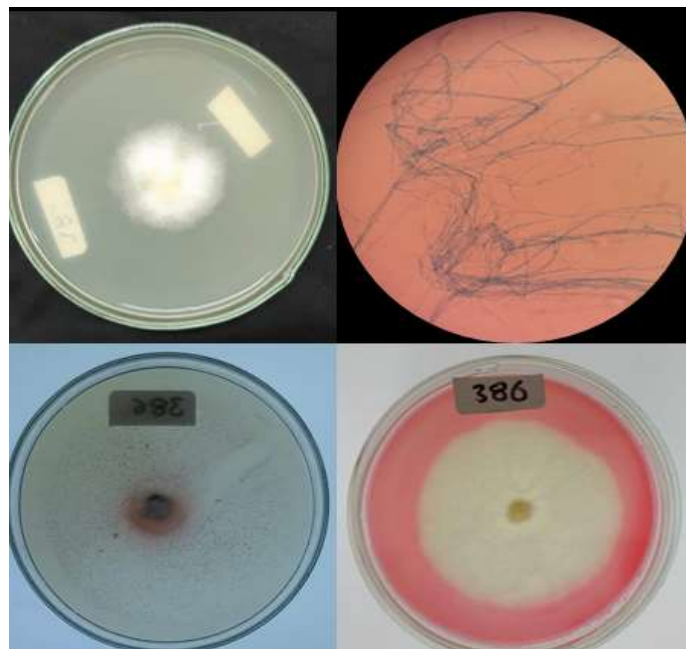


Figura 30. Aislamiento MF3-86 en PDA, Microscopía, halo de oxidación y halo de hidrolisis.

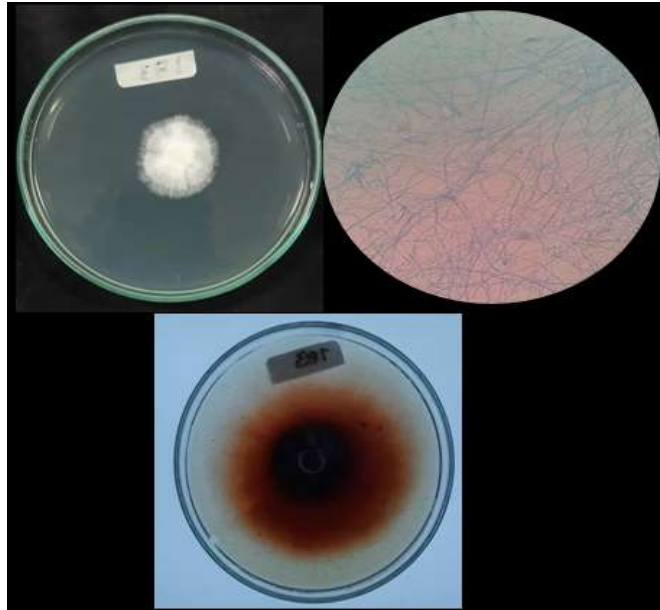


Figura 31. Aislamiento MF1-83 en PDA, Microscopía y halo de oxidación.

9.4 Curva patrón de glucosa para la determinación cuantitativa de unidades enzimáticas y azúcares reductores equivalentes a glucosa.

