



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA
DE HONGOS DE CORTEZA DE *Pinus hartwegii*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

BERENICE GALVÁN QUINTERO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Octubre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA
DE HONGOS DE CORTEZA DE *Pinus hartwegii*

PRESENTA

BERENICE GALVÁN QUINTERO

Asesor:

Dr. en C. Ángel Roberto Martínez Campos

Coasesora:

Dra. Cristina Burrola Aguilar

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Octubre 2018

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. MARCO TEÓRICO	4
Residuos Sólidos Urbanos (RSU)	4
Problemas que generan los RSU	5
Manejo y disposición de los RSU	5
Aprovechamiento energético de la biomasa	6
Biocombustibles	6
Primera generación	6
Segunda generación	7
Tercera generación	7
Cuarta generación	7
Materiales Lignocelulósicos	8
Celulosa	9
Estructura química de la celulosa	10
Hemicelulosa	11
Lignina	13
Hongos de la degradación y efectos sobre la madera	13
Degradación Blanda	14
Degradación Café	14
Degradación Blanca	14
Microorganismos lignocelulolíticos	14
Microorganismos Celulolíticos	15
Microorganismos Lignolíticos	15
Hidrólisis enzimática	16
Enzimas implicadas en la degradación de celulosa	16
Mecanismo de acción de enzimas extracelulares	16
Enzimas celulolíticas	17
Celulasas	17
Endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasa) (EC 3.2.1.4)	17
Exoglucanasas	17

β-glucosidasas (β-D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21)	18
Aplicaciones Industriales de las celulasas	19
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
VII. MATERIAL Y MÉTODO	22
Recolección de las muestras de corteza de <i>Pinus hartwegii</i>	22
Aislamiento, purificación y conservación de cepas fúngicas	22
Caracterización de hongos por técnicas convencionales	22
Evaluación de la capacidad celulolítica	23
Extracción de ADN	23
Evaluación de la presencia de celulasas	24
Cuantificación y comprobación de la presencia de ADN por electroforesis	24
PCR-Múltiplex	25
Análisis Estadístico	26
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Aislamiento y caracterización de hongos celulolíticos	27
Crecimiento y actividad celulolítica de los aislamientos	46
Evaluación de la presencia de celulasas	51
IX. CONCLUSIÓN	53
X. BIBLIOGRAFÍA	54
XI. ANEXOS	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición de los RSU en México	5
Figura 2. Estructura de las microfibrillas de la pared celular de las plantas	8
Figura 3. Estructura química de la celulosa	10
Figura 4. Organización de las fibras de celulosa	11
Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa	12
Figura 6. Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular	12
Figura 7. Monómeros precursores de la molécula de lignina	13
Figura 8. Hidrólisis de la celulosa	18
Figura 9. Representación esquemática del gel de electroforesis	24
Figura 10. Representación esquemática para PCR	26
Figura 11. <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
Figura 12. <i>Aspergillus flavus</i>	31
Figura 13. <i>Aspergillus flavus</i>	33
Figura 14. <i>Aspergillus niger</i>	35
Figura 15. <i>Absidia aff. corymbifera</i>	37
Figura 16. Cepa NTFV	39
Figura 17. Cepa POHCeB	41
Figura 18. Cepa POHCeBI	42
Figura 19. Cepa POHCeFi	43
Figura 20. Halos de hidrólisis de celulosa	46
Figura 21. Cinética de la velocidad de crecimiento y actividad celulolítica	47
Figura 22. Productos de PCR	51

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en biomasas lignocelulósicas en base seca	9
Tabla II. Primers para la identificación de celulasas	24
Tabla III. Master Mix PCR	25
Tabla IV. Cepas fúngicas aisladas de diferentes ambientes	27
Tabla V. Velocidad de crecimiento y halos de hidrólisis de celulosa	50

INDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Propiedades de los oligonucleótidos	61
ANEXO II. Medidas de las estructuras microscópicas de las cepas fúngicas	62

I. RESUMEN

Diversas actividades desarrolladas por el hombre a través de los años han generado un sin número de consecuencias medio ambientales de grave impacto, siendo una de las más importantes la producción descontrolada de toneladas anuales de residuos sólidos, de los cuales un porcentaje importante es material lignocelulósico. Además, grandes cantidades de desechos de celulosa son producidos en todo el mundo como resultado de actividades en la agricultura y en la industria; siendo la celulosa uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y de difícil degradación debido a su asociación con polímeros como la lignina y la hemicelulosa. En este trabajo se aislaron hongos filamentosos con actividad celulolítica; obteniendo un total de nueve cepas fúngicas, de las cuales cuatro fueron aisladas de corteza de *Pinus hartwegii* recolectadas del Volcán Pico de Orizaba, Veracruz y cinco de corteza de *P. hartwegii* provenientes del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. Ocho cepas fúngicas aisladas pertenecen al grupo de los ascomicetos y una corresponde a los zigomicetos. De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas de los aislados fúngicos se identificaron dos géneros: *Aspergillus* y *Absidia*. La actividad celulolítica fue evaluada mediante la prueba de rojo congo en placas de agar celulosa como única fuente de carbono descrita por (Teather *et al.*, 1982); la mayor capacidad de hidrolizar celulosa fue presentada por *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* y la cepa POHCeFi expresando valores de 0.472, 0.61 y 0.784 mm/hrs respectivamente. Las pruebas moleculares para la identificación de la actividad celulolítica mediante el uso de PCR no fue posible, ya que los primers empleados no amplificaron ninguna secuencia de los hongos aislados. Los resultados obtenidos indican que las cepas fúngicas que expresaron la mayor actividad celulolítica podrían ser utilizadas como alternativa biotecnológica en respuesta a los grandes volúmenes de materia lignocelulósica desechada que es uno de los problemas ambientales más importantes de la actualidad, además los aislados pueden ser aplicados en el futuro aprovechando la producción de un sustrato fermentable cuya utilidad podría ser la producción de biocombustibles de segunda generación.

II. INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal componente mayoritario de la biomasa, representando la fuente orgánica más económica, abundante y renovable del mundo (Alvarez–Castillo *et al.* 2012). Los residuos agrícolas, constituidos principalmente por raíces, hojas, tallos u otras partes de plantas, son una fuente de biomasa lignocelulósica, generalmente desechada y sin recibir tratamiento alguno. La celulosa es el compuesto orgánico de mayor abundancia en la naturaleza y en términos de producción anual, es uno de los polímeros más importantes sobre la Tierra; además, presenta gran importancia a nivel biológico e industrial. Es el principal componente en la mayoría de las fibras naturales como: algodón, lino, cáñamo, yute, sisal, etc. En general, la madera con base a su peso, está compuesta de 20-40% de lignina, 30-50% de celulosa, 9-28% de pentosanos y 0.2-20% de extractivos, presentándose diferencias cuantitativas entre coníferas y latifoliadas (Lima-Rojas, 2013). Sin embargo, su degradación es difícil, debido a la estructura misma de la celulosa y a su asociación con otros polímeros; como la lignina y la hemicelulosa (Moya, 2011). A pesar de ello, cada uno de estos componentes tiene propiedades físicas y químicas que los hacen sustratos de interés para ser usados en procesos biotecnológicos, debido a su bajo costo y a su amplia disponibilidad.

La alta concentración de celulosa en la corteza de coníferas constituye un sitio de alojamiento para microorganismos con la maquinaria enzimática necesaria para aprovechar dicho sustrato. Por lo tanto, cortezas parasitadas o con presencia de hongos en su superficie podría suponer la presencia de microorganismos con capacidad celulítica. Munero *et al.* (2005) mencionan que los hongos filamentosos pueden estar implicados durante el proceso de degradación de la corteza, ya que su presencia puede ser parásita o saprófita debido a su alta capacidad lignocelulolítica.

Ciertos microorganismos participan en la degradación de estos desechos, por medio de la secreción de enzimas hidrolíticas que tienen un papel fundamental en la despolimerización de los componentes orgánicos de los diferentes residuos. La producción de enzimas celulasas permite la degradación de la celulosa, componente principal de la pared celular de las plantas. Entre algunos géneros y especies de hongos que producen celulasas se encuentran: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Rhizoctonia*, *Trametes versicolor*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium* (Lynd *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista ambiental, la eliminación de desechos es uno de los problemas más grandes que deben enfrentar los países; la fracción lignocelulósica generada en grandes cantidades durante las actividades agrícolas, madereras y los residuos lignocelulósicos producidos por las actividades que realiza la población para la obtención de insumos, han sido objeto de muchas investigaciones que han llevado a su uso como sustratos en los procesos fermentativos, principalmente para la producción de combustibles y alimentos alternativos que aminoren los problemas derivados de la crisis energética, la escasez de proteínas y la contaminación ambiental (Montoya, 2008). Por lo tanto, en la medida que se aprovechen los materiales lignocelulósicos, se consigue un alto beneficio ecológico, al eliminar fuentes de contaminación por su manejo y al aprovechar la energía de los metabolitos del proceso de fermentación.

La importancia de este estudio radica en lograr el aislamiento, purificación e identificación de hongos lignocelulolíticos que se encuentran presentes en la corteza de *P. hartwegii*; en respuesta a los grandes volúmenes de materia lignocelulósica que ocasionan impactos ambientales desfavorables, generando una alternativa biotecnológica con la búsqueda de nuevos microorganismos celulolíticos capaces de degradar dichos residuos, y a su vez aprovechar la producción de un sustrato fermentable cuya utilidad podrá ser la producción de etanol.

III. MARCO TEÓRICO

Residuos Sólidos Urbanos (RSU)

La producción y el consumo de bienes y servicios generan inevitablemente la producción de algún tipo de residuo. Éstos pueden ser sólidos (ya sea de naturaleza orgánica o inorgánica), líquidos (que incluyen a los que se vierten disueltos como parte de las aguas residuales) y los que escapan en forma de gases.

Los RSU hacen referencia al conjunto de elementos heterogéneos resultante de desechos o desperdicios del hogar o de la comunidad en general. Actualmente, en su artículo 5 sección XXXIII, la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), define a los RSU como: *“Son los generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias, y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos, siempre que no sean considerados por esta Ley como residuos de otra índole”*.

Se puede considerar que los RSU son el resultado de las actividades que realiza la población para su subsistencia; el constante incremento de la población urbana, ha originado una mayor dinámica en actividades económicas, comerciales, educativas e industriales y, en consecuencia, un aumento en la cantidad de desechos.

En México, entre 2003 y 2011 la producción de RSU creció 25%; la generación de RSU alcanzó 53.1 millones de toneladas, lo que representó un aumento del 61.2% con respecto a 2003 (10.24 millones de toneladas más generadas en ese período. Si se expresa por habitante, alcanzó 1.2 kilogramos en promedio diariamente en el mismo año; de los cuales 70 por ciento se depositan en rellenos sanitarios y el resto termina en tiraderos a cielo abierto, representando un foco de contaminación y un riesgo para la salud por posibles intoxicaciones. El aumento en la generación de residuos sólidos urbanos puede explicarse como resultado de múltiples factores, reconociéndose entre los más importantes el crecimiento urbano, el desarrollo industrial, las modificaciones tecnológicas y el cambio en los patrones de consumo de la población. Algunos de los componentes importantes de los residuos que se producen en el país son: el papel y sus derivados (14.9%), residuos de jardinería 9.38 % y madera 1.25 % (Figura 1) (INEGI 2013).

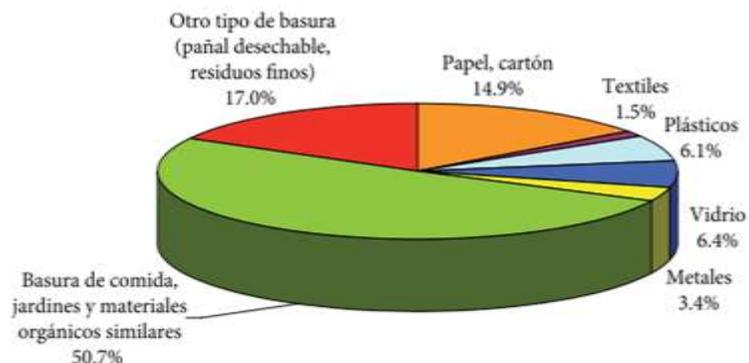


Figura 1. Composición de los RSU en México. (SEMARNAT 2012).

Problemas que generan los RSU

Debido a las alteraciones ecológicas provocadas por la inmensa cantidad de residuos generados, los RSU pueden tener varios efectos ambientales negativos tales como: contaminación biótica del agua (patógenos), contaminación química del agua; cuando son vertidos en cuerpos de agua superficiales alteran la estructura física del hábitat e impactan negativamente la calidad del agua; el agua subterránea de los acuíferos puede contaminarse por la infiltración de lixiviados derivados de los residuos que contienen materiales tóxicos depositados, contaminación de suelos (basuras depositadas), producción de olores (materia orgánica en descomposición), contaminación atmosférica por emisiones gaseosas producidas por fermentación anaerobia (metano), proliferación de vectores (ratas, cucarachas e insectos) asociados a los tiraderos puede provocar la transmisión de enfermedades como el cólera, disentería, leptospirosis y amebiasis, etc. (Alcaide-Tur, 2012).

Manejo y disposición de los RSU

El manejo de los RSU, involucra la generación y flujo de residuos, métodos de recolección, transporte, transferencia, sistemas de separación, valorización, aprovechamiento y disposición final, de los cuales derivan beneficios ambientales, sociales y económicos. A partir de principios de los noventa se establecieron como estrategias clave para el aprovechamiento racional de los residuos, la minimización en la producción de residuos sólidos y el reciclaje, además de fortalecerse la recolección, transporte, tratamiento y disposición en forma ambientalmente segura. El relleno sanitario es el método de disposición final más utilizado, ya que por su relación beneficio-costos es una alternativa factible dada la realidad económica de los municipios. Para este tipo de servicio el incremento de los volúmenes incide en la reducción de los costos, favoreciéndose la utilización de rellenos regionales. A nivel nacional, el 64% de los residuos generados se depositan en 88 instalaciones ya sea rellenos sanitarios o sitios controlados, y de ellos 49% son municipales y 18% regionales y 33% son operados por la iniciativa privada. Los rellenos sanitarios se regulan por la NOM083-SEMARNAT-2003, que establece las condiciones para su ubicación, diseño, construcción, operación y monitoreo.

Aunque no existen cifras oficiales, en todo el país, no son más de 30 los sitios que cumplen con esta norma, garantizando la no contaminación del subsuelo y mantos acuíferos y el correcto manejo de los lixiviados y gases generados (INEGI 2013).

Aprovechamiento energético de la biomasa

El aprovechamiento del material lignocelulósico obtenido de los RSU contribuye al beneficio y cuidado del medio ambiente. Además, como producto del tratamiento se podrían aprovechar la producción de un sustrato fermentable cuya utilidad puede ser la producción de biocombustible.

En la actualidad se ha incrementado el uso de la biomasa, en particular la derivada de residuos agrícolas, para la producción de combustibles y de otros productos químicos convirtiéndose en uno de los puntos clave en el desarrollo sostenible, dado que los residuos son renovables en contraste con la materia prima de origen fósil (Cortes Ortiz, 2011).

Biocombustibles

Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances en la tecnología, ésta clasificación se realiza por generaciones.

Primera generación

Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soya, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuete, entre otros. También se emplean como insumos a las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, y desperdicios sólidos orgánicos. Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas) y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogas (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenida a partir de los desperdicios orgánicos). Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad procesamiento, sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero y un balance positivo en dichas emisiones, pero tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos (Álvarez-Maciel, 2009).

Segunda generación

Se obtienen a partir de materias primas que no tienen usos alimentarios; los insumos utilizados son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etc. Mediante los procesos de segunda generación se produce etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2.5-dimetilfurano (DMF), entre otros. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético, pero su desventaja es la poca ganancia en disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos, respecto a los biocombustibles de primera generación (Álvarez-Maciel, 2009).

Tercera generación

Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verdeazules. Los procesos de obtención de biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel planta piloto (Álvarez-Maciel, 2009).

Cuarta generación

Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles. Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes (Álvarez-Maciel, 2009).

Materiales Lignocelulósicos

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, ésta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas (Alvarez–Castillo *et al.*, 2012).

Las paredes celulares de plantas están conformadas por polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, etc.). Los polisacáridos incluyen: celulosa y hemicelulosa, que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos. La lignina es un polímero polifenólico que se deposita en las paredes de las células de las plantas, gran parte de los compuestos fenólicos están presentes en la estructura de lignina (Oliva, 2003; Scheller, 2010) (Figura 2).

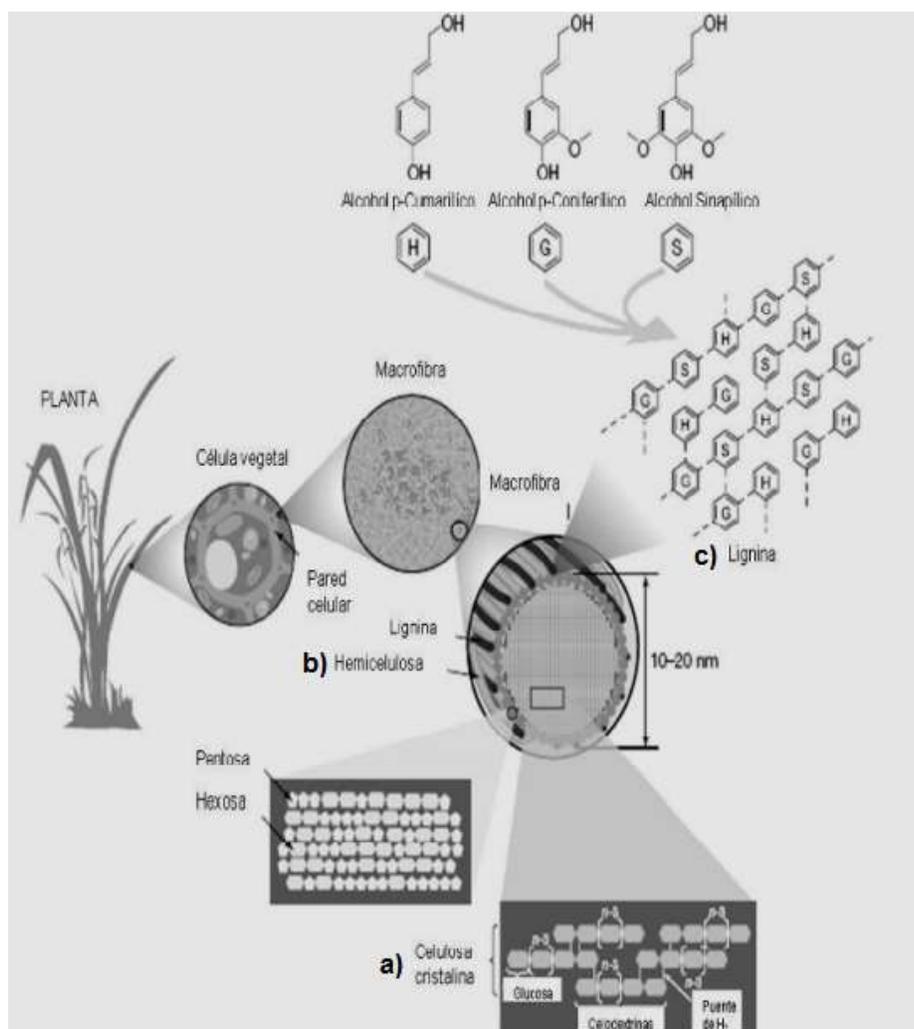


Figura 2. Estructura de las microfibrillas que forman la pared celular de las plantas.

Las microfibrillas están conformadas por los polisacáridos: a) celulosa, b) hemicelulosa y c) lignina. (Tomada de Rubin, 2008).

Las proporciones en las plantas de celulosa, hemicelulosa y lignina son variables: 20-55% de celulosa, 16-85% de hemicelulosa y de 15 a 40% de lignina (Howard *et al.*, 2003). En los residuos lignocelulósicos existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en biomásas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de Sun y Cheng (2002) y Balat (2010).

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Maderas duras	40-55	24-40	18-25
Maderas blandas	45-50	25-35	25-30
Cáscara de frutos	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Césped	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12
Bagazo de Caña	22	15	11
Tallo de maíz	39-47	26-31	3-5

Celulosa

La celulosa es el mayor componente de la biomasa vegetal y la base del ciclo del carbono sobre la Tierra (Tomás-Pejó, 2010). Su utilización por los microorganismos ocasiona el mayor flujo de materiales a la biosfera y es de gran interés en relación con la transformación y el movimiento del carbono a escala global. Además, es parte importante en los procesos de digestión anaeróbica y compostaje. Una de las características de la celulosa es su estructura cristalina, la cual es bastante resistente a la hidrólisis química y biológica; dicha estructura puede ser degradada mediante la acción de enzimas celulolíticas producidas por algunos microorganismos (Lynd *et al.*, 2002).

Estructura química de la celulosa

La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo β 1-4 que interactúan entre sí por medio de puentes de hidrógeno, lo que conlleva a regiones altamente ordenadas que le dan características de resistencia e insolubilidad (Figura 3) (Lynd *et al.*, 2002).

La celulosa presenta extremos asimétricos y aquellos que contienen el carbono anomérico (C_1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes (como el cobre, etc.) y se conocen como extremos reductores. Mientras que el C_4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

El polisacárido se sintetiza en la naturaleza a partir de moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando un arreglo tridimensional que es estabilizado mediante interacciones de Van der Waals. La unión de 30 moléculas lineales de entre 10,000 y 14,000 moléculas de glucosa conforman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se empaqueta en unidades mayores denominadas microfibrillas. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002).

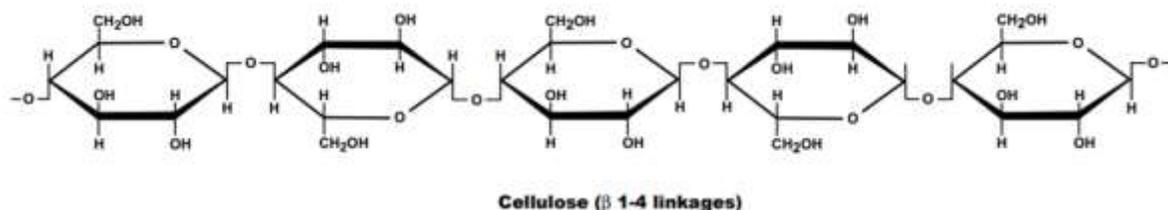


Figura 3. Estructura química de la celulosa. (Jacques K. et al, 2003).

Las regiones donde las microfibrillas presentan una estructura altamente ordenada se llaman regiones cristalinas y las regiones con una estructura menos ordenadas se denominan amorfas, por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino. Las dos formas cristalinas que se encuentran en la celulosa nativa, es decir, en las fibras naturales, son la celulosa I y la celulosa II, siendo la más abundante la celulosa I donde las cadenas de glucosa están orientadas paralelamente (Brown, 2003). Por el contrario, en la celulosa nativa II, que es sintetizada principalmente por algas y algunas bacterias, las cadenas de glucosa son antiparalelas (Brown, 2003).

La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las protofibrillas y microfibrillas condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Las diferencias en el grado de polimerización y peso molecular influyen en el comportamiento de la celulosa durante la hidrólisis, ya sea mediante el uso de enzimas o productos químicos. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar (Figura 4) (Zhang y Lynd, 2004).

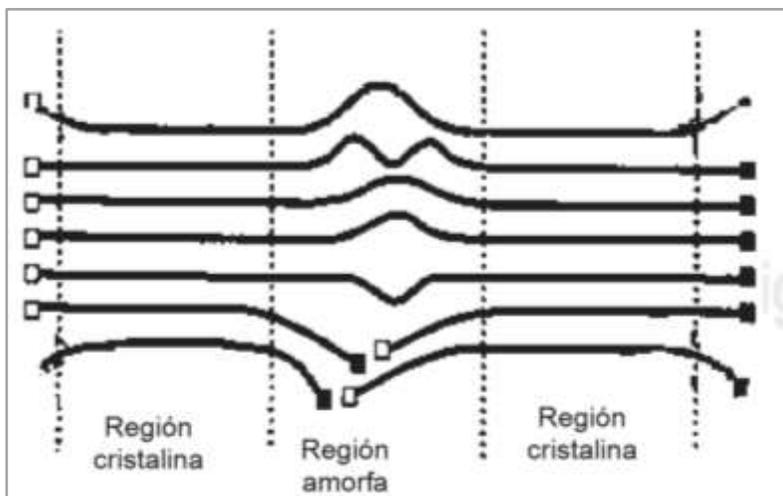


Figura 4. Organización de las fibras de celulosa.

La organización de las fibras de celulosa genera dos conformaciones: ordenadas, que comprenden la región cristalina, y desordenadas, que forman la región amorfa (Lynd *et al.*, 2002).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza se encuentra presente en la pared celular de las plantas, comprende del 20 al 35%, en peso seco (Martínez-Ávila *et al.*, 2010; Peters, 2006). Consta de polímeros formados por más de un tipo de azúcares de cinco átomos de carbono llamados pentosanos tales como la D-xilosa y L-arabinosa, y de seis átomos de carbono llamados hexosanos, como D-manosa, D-glucosa y D-galactosa, y por varios ácidos urónicos, como el ácido glucurónico y galacturónico. Su función principal es establecer la unión entre la celulosa y la lignina. Además, presentan ramificaciones y sustituciones, por lo que no tienen una estructura regular, dándole una conformación amorfa y fácilmente soluble (Figura 5). A diferencia de la celulosa, que siempre tiene la misma estructura y composición, las cadenas de hemicelulosa pueden variar entre especies de plantas. Las cadenas poliméricas individuales contienen de 50 a 100 unidades monoméricas de azúcares (Suesca-Díaz, 2012).

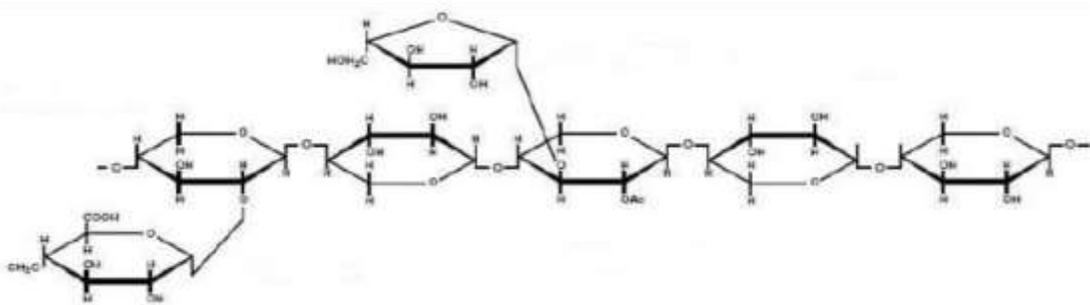


Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa. (Jacques K. et al, 2003).

Se han identificado dos tipos de hemicelulosa: en las maderas duras ésta existe mayormente en forma de xilanos, en las que los esqueletos homopoliméricos del xilano son cadenas de residuos de β -D-xilopiranososa con uniones 1,4. Mientras que las maderas suaves contienen principalmente glucomanano. Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa (Figura 6), al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico (compuesto fenólico abundante en la pared celular vegetal), dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

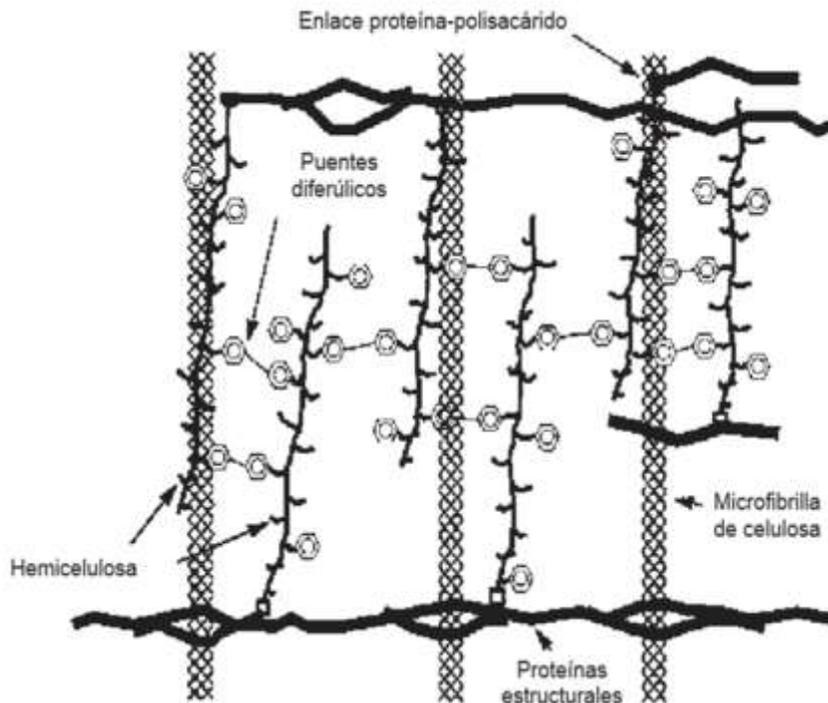


Figura 6. Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular. Las barras paralelas representan fibras de celulosa entrelazadas por las cadenas de hemicelulosa (unida entre sí por puentes diferúlicos) y proteínas estructurales (líneas negras) (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

Lignina

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica; representa entre 25 y 33% de la biomasa en madera de especies coníferas y entre 18 y 34 % de frondosas (Prinsen, 2010). Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada. Este polímero se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular y en las capas de la pared celular. Con las hemicelulosas forman un matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa.

En general, las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropanomonoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, cuyas estructuras se muestran en la Figura 7 (Prinsen, 2010).

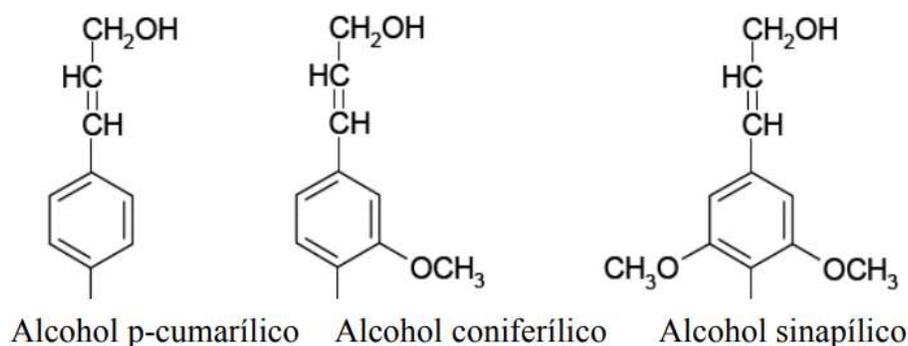


Figura 7. Monómeros precursores de la molécula de lignina. (Montoya, 2008).

Hongos de la degradación y efectos sobre la madera

Los hongos saprófitos o parásitos que intervienen en la degradación de la madera actúan colonizando la parte superficial de la corteza que básicamente está constituida por lignina, celulosa y hemicelulosa, los principales microorganismos colonizadores de este sustrato son hongos pertenecientes a las Clases Basidiomicota y Ascomicota (Deacon 2002; Chaparro y Rosas 2006; Collazos-Silva y Ortiz-Baca, 2014).

Por definición, los descomponedores de la madera son aquellos causantes de la pérdida de peso y cambios estructurales. Dependiendo de la descomposición de la madera de acuerdo al modo de ataque y de las condiciones en que los microorganismos degradadores crecen se distinguen tres tipos de degradación: blanda, café y blanca (Chaparro y Rosas 2006; Collazos-Silva y Ortiz-Baca, 2014).

Degradación Blanda

La madera pierde fuerza mecánica y se torna húmeda y esponjosa. Ocurre cuando el daño causado por el microorganismo es muy superficial. Es causada por Ascomicetos, e inicialmente puede caracterizarse por cadenas de cavidades longitudinales con puntos cónicos en la capa de la pared; alrededor de las hifas se genera una destrucción localizada de la celulosa alrededor de la hifa, formando una cavidad en la superficie externa de la madera, algunos de los hongos causantes de este tipo de pudrición son *Chaetomium globosum* y *Daldinia concentrica* (Chaparro y Rosas, 2006).

Degradación Café

Es causada principalmente por Basidiomicetos, los cuales degradan la hemicelulosa y la celulosa despolimerizada; los carbohidratos son removidos pero la lignina es modificada hasta cierto límite. La madera toma un color café oscuro debido a la degradación de la celulosa que es de color blanco, quedando el color café de la lignina residual; entre los hongos que causan la degradación café están: *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustres* y *Gloeophyllum trabeum* (Markham y Bazin, 1991; Chaparro y Rosas, 2006).

Degradación Blanca

Ocurre cuando los microorganismos que atacan la madera degradan profunda y completamente los componentes lignocelulósicos. Actualmente se sabe que los hongos de la degradación blanca están implicados en la degradación de la mayoría de las estructuras químicas que componen la madera incluyendo la celulosa, aunque la lignina es el principal compuesto degradado, por tal razón la madera toma una apariencia blanquecina, húmeda, blanda, esponjosa y en las etapas avanzadas la madera se debilita notablemente; la apariencia de la madera con degradación blanca es fibrosa, debido a que parte de la celulosa permanece intacta hasta etapas tardías del proceso; algunos de los hongos que causan pudrición blanca son: *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Saldarriaga, 2001; Chaparro y Rosas, 2006).

Una característica morfológica común de los hongos de la degradación de la madera es la presencia de capas extracelulares (envolturas hifales), que están compuestas de extensas estructuras de membranas y β -1,6-1,3 glucanos. Esta matriz probablemente juega un papel importante en la degradación, pero su función específica aún no se conoce.

Microorganismos lignocelulolíticos

Los materiales lignocelulósicos son muy abundantes en el planeta. Los vegetales y sus residuos, las agroindustrias y los subproductos que generan constituyen un excelente sustrato para el crecimiento fúngico. Los hongos cumplen un rol muy importante, ya que este tipo de materiales está compuesto principalmente de

polímeros que no pueden ser degradados por la mayoría de los otros microorganismos presentes en diferentes ecosistemas. Los hongos de la degradación blanca, pertenecientes al grupo de los Basidiomicetos son los degradadores de lignocelulosa más eficientes en el planeta (Howard *et al.*, 2003).

Microorganismos Celulolíticos

Siendo la celulosa uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal, una serie de microorganismos son capaces de degradarla, mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos; como en los hongos filamentosos y en algunos Actinomicetos o formando un complejo denominado "celulosoma", como en los clostridios y en bacterias del rumen. Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en hongos mesófilos, tales como *Trichoderma reesei*. El hongo *Trichoderma reesei* antes denominado *Trichoderma viride*, es el mejor productor de celulasa extracelular, por lo que la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo. Sin embargo, sus actividades hidrolíticas son afectadas por una serie de factores físicos y químicos que limitan su aplicación a nivel industrial (Lynd *et al.*, 2002).

Entre algunos géneros y especies de hongos que producen celulasas se encuentran: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Rhizoctonia*, *Trametes versicolor*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium* (Lynd *et al.*, 2002).

Entre las bacterias destacan algunas especies de los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida*. En el caso de los clostridios, *Clostridium cellulovorans* hidroliza la celulosa en condiciones anaeróbicas; en tanto que las especies celulolíticas de *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* la degradan en un ambiente aeróbico. Taxonómicamente, los géneros *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* se ubican en el Orden Actinomycetales y son comúnmente denominados actinomicetos (Murashima *et al.*, 2002).

Microorganismos Lignolíticos

Los hongos degradadores de lignina más conocidos son: *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus*, del grupo de los Basidiomicetos, pudridores blancos, con la capacidad de secretar enzimas extracelulares que degradan al polímero de lignina, los cuales han despertado gran interés en los últimos años por su potencial biorremediador y de los cuales en su mayoría también muestran actividad celulolítica (Saenz, 2009).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y secretarlas, facilitando su separación en los medios de cultivo (Oliva-Domínguez, 2003).

Enzimas implicadas en la degradación de celulosa

En el proceso de compostaje, los microorganismos participan por medio de la secreción de enzimas hidrolíticas que tienen un papel fundamental en la depolimerización de los componentes orgánicos de los diferentes residuos. Entre estas enzimas las más importantes son las celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas, fosfatasa y arilsulfatasas. Cuando las enzimas que producen los microorganismos son extracelulares pueden ser potencialmente útiles, en la degradación de diferentes sustratos. Estas enzimas extracelulares tienen ventajas con respecto a las intracelulares porque no necesitan técnicas de ruptura, para ser extraídas, presentan una estructura más compacta y son menos susceptibles a la degradación. Las enzimas extracelulares hidrolizan moléculas grandes como almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que son asimiladas por los microorganismos como fuente de carbono y energía. Adicionalmente, el uso de enzimas microbianas, especialmente celulasas y xilanasas extracelulares, ha ganado importancia debido a que los productos obtenidos de la hidrólisis de material lignocelulósico genera azúcares solubles, los cuales son indispensables en procesos de fermentación para la producción de combustibles, metabolitos y alimentos (Cruz *et al.*, 2009).

Mecanismo de acción de enzimas extracelulares

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta, el área activa de secreción enzimática. No se destaca que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio con el fin de mantener la actividad metabólica (Papinutti, 2003; citado en Montoya, (2008).

Las enzimas para la degradación de polímeros (no necesariamente polisacáridos) pueden emplear dos estrategias de ataque. Pueden actuar sobre el polímero aleatoriamente fragmentando efectivamente la molécula polimérica en oligómeros, siendo responsables de esta forma de ataque las endoenzimas. O bien, actuar a partir de un extremo (exoenzimas), generalmente de un extremo no reductor de la molécula, liberando monómeros o dímeros de modo secuencial.

Los sistemas se completan con enzimas capaces de actuar sobre oligómeros o dímeros, llevando a cabo la degradación completa del polímero. Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella, muchas de estas enzimas tienen una estructura particular que consiste en un dominio de unión al sustrato y un dominio catalítico unidos por una zona más laxa. En general, las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de su síntesis, es decir no se producen de modo constante, constitutivo, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y reprimida por azúcares fácilmente utilizables, en particular glucosa. Además, las enzimas extracelulares del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas. La síntesis de isoenzimas puede deberse a productos de genes diferentes, aunque también puede deberse a cambios postraduccionales como proteólisis, glicosilación, agregados cuaternarios. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes tales como la composición del medio de cultivo, pH, temperatura, etc. (Montoya, 2008).

Enzimas celulolíticas

Celulasas

La celulasa es una glicosil hidrolasa, producida por hongos, bacterias y algunos animales, no requieren cofactor en la actividad enzimática. Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa (Figura 8), que es la fuente de carbono más abundante en la Tierra (Marín-Alvarado, 2007).

El complejo celulolítico de hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad: endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasas (Oliva-Domínguez, 2003).

Endoglucanasas (1,4-β-D-glucan 4-glucanohidrolasa) (EC 3.2.1.4)

Actúan al azar sobre los enlaces β 1, 4 glucosídicos y su actividad parece estar dirigida principalmente sobre la celulosa soluble altamente polimerizada como lo es la carboximetilcelulosa (CMC); produciendo glucosa, celobiosa (disacárido) y celotriosa (trisacárido); esta enzima corta las cadenas de celulosa principalmente a partir de las regiones amorfas, proveyendo a las exoglucanasas más extremos para actuar y no actúa de manera significativa, sobre la celulosa cristalina, como las fibras de algodón (Saenz, 2009).

Exoglucanasas

Encargadas de hidrolizar los enlaces 1,4- β- glucosídicos; producen rupturas secuenciales en la molécula a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos grupos:

*Exocelobiohidrolasas, llamadas también celobiohidrolasas (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91): Liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor.

*Exogluconhidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74): Liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado (Oliva-Domínguez, 2003).

β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21)

Hidrolizan la celulosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta (celobiosa y las celodextrinas). El resultado final de la acción degradante del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa son dos moléculas de glucosa (Lynd *et al.*, 2002).

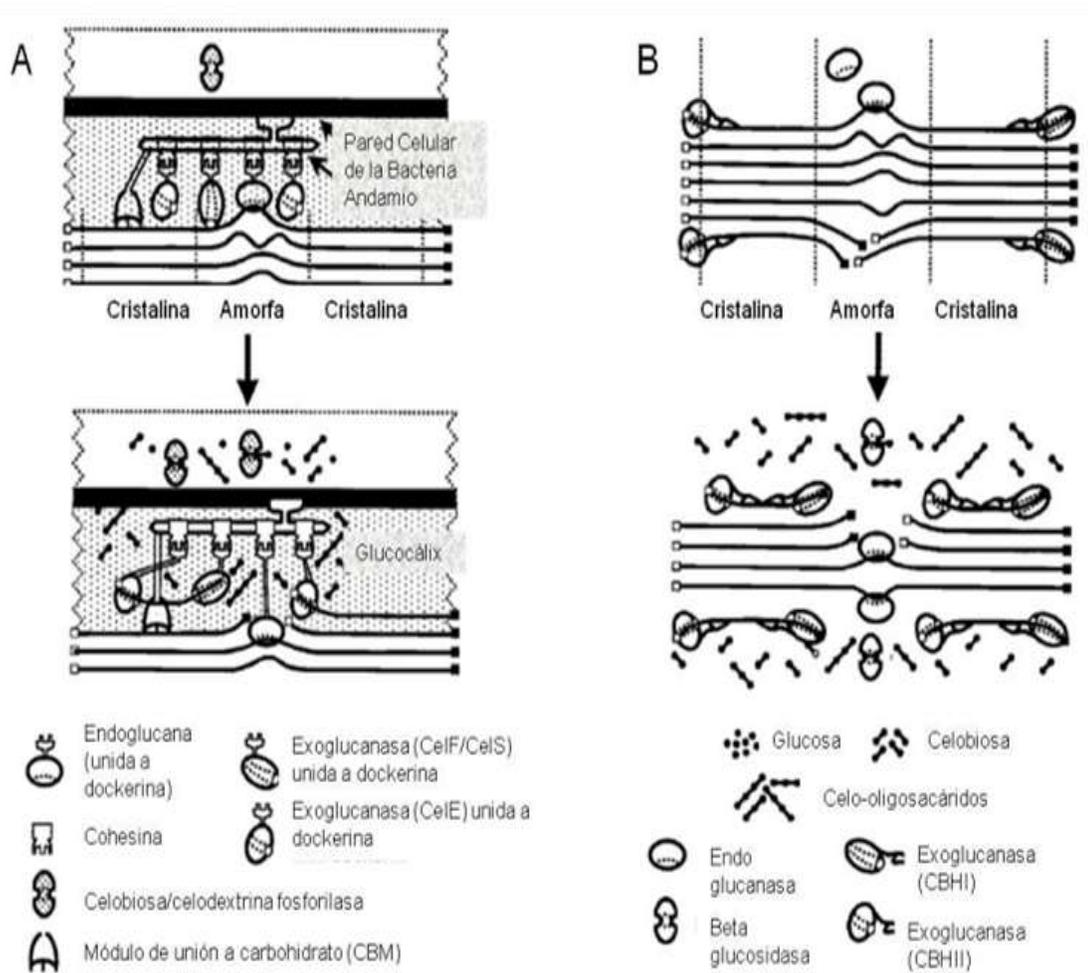


Figura 8. Hidrólisis de la celulosa. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B) (Lynd *et al.*, 2002).

Aplicaciones Industriales de las celulasas

Las celulasas son utilizadas en industrias alimenticias, de cervecería, de vino, alimentación animal, textil, de detergentes, del papel, así como también en la agricultura y en diversas investigaciones (Bhat, 2000). Esta gran gama de aplicaciones hacen de estas enzimas atractivas y demuestran su enorme valor comercial en la industria biotecnológica.

En la industria del papel, las celulasas y hemicelulasas son usadas en etapas de pretratamiento y permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento (Beilen *et al.*, 2002).

La industria textil, se ha convertido en una de las principales áreas donde se utilizan enzimas; las celulasas representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho que cerca del 70% de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Las aplicaciones más relevantes en esta área son: destinción de prendas para dar apariencia de gastado, tratamiento de las telas para eliminar imperfecciones de las fibras, preparación de la tela previa a tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido (Marín-Alvarado, 2007).

En cuanto a la industria alimenticia, las celulasas son utilizadas para hidrolizar componentes de las paredes celulares, con lo que se disminuye la viscosidad y se mantiene la textura en los jugos de frutas y a su vez liberan antioxidantes de la fruta. Así mismo, se utilizan celulasas del tipo endoglucanasas junto con xilanasas para la separación de gluten y almidón de la harina, gracias a la hidrólisis de arabinoxilano y almidón (Bhat, 2000).

En la industria cervecera y del vino, las celulasas son empleadas en el proceso de producción de la cerveza, en donde las celulasas del tipo endoglucanasa son utilizadas para la hidrólisis del enlace 1,4- β - glucosídicos de las semillas de cebada, lo que reduce la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación; con esto, se hace eficiente la etapa, y se favorece la etapa de filtración, logrando mejorar la calidad de la cerveza. En la industria del vino, celulasas del tipo β -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento del aroma del vino. Además, el uso de endoglucanasas es conocido para el mejoramiento en las eficiencias de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para a la obtención de un vino de mejor calidad y estabilidad (Bhat, 2000).

Las celulasas son utilizadas en los detergentes para lograr efectos como: remoción de manchas de suciedad atrapadas en las fibrillas de celulosa, suavidad permanente en la ropa, mejoramiento del color por la remoción de las pelusas formadas por la fibrilación (Marín-Alvarado, 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las actividades desarrolladas por el hombre a través de los años han generado un sin número de consecuencias medio ambientales de grave impacto, siendo una de las más importantes la producción descontrolada de toneladas anuales de residuos sólidos. En México se producen 53.1 millones de toneladas que son desechadas en sitios insuficientes y sin recibir tratamiento alguno; entre los desechos sólidos generados diariamente, un porcentaje importante son materiales lignocelulósicos como el papel y sus derivados ocupando un 14.9 % del total, residuos de jardinería 9.38 % y madera 1.25 %, los cuales no son aprovechados. Además, grandes cantidades de desechos de celulosa son producidos en el mundo entero como resultado de actividades en la agricultura y en la industria. Debido a la composición biológica de los residuos sólidos, los desechos de la agricultura y la industria en un alto porcentaje de celulosa, éstos pueden ser utilizados por algunos microorganismos como fuente nutricional, acelerando así el proceso de degradación bajo condiciones controladas; por lo tanto, la utilización de microorganismos con actividad celulolítica representa una de las opciones con mayor viabilidad en la solución a esta problemática, ya que permitiría la degradación de los residuos lignocelulósicos generados por el hombre.

Los hongos saprofitos son organismos que de forma natural contribuyen en la descomposición de desechos lignocelulósicos presentes en los bosques; estos han sido un foco importante de estudio, debido a la producción de enzimas lignocelulósicas que pueden ser utilizadas en: industria alimenticia, de cervecería, de vino, textil, de detergentes, del papel, en la agricultura y en diversas investigaciones.

Por lo tanto; es de gran importancia realizar la búsqueda de nuevos microorganismos (hongos) con capacidad celulolítica; por ello en este estudio se busca el aislamiento de hongos celulolíticos a partir de corteza de *Pinus hartwegii*, los cuales pueden representar una alternativa biotecnológica prometedora para combatir uno de los problemas medioambientales que actualmente se vive, además dichos aislados pueden ser aplicados en el futuro, por ejemplo para la producción de biocombustibles de segunda generación.

V. HIPÓTESIS

Hongos saprófitos aislados de corteza de *Pinus hartwegii* producirán *in vitro* celulasas, capaces de degradar biomasa constituida por celulosa.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad celulolítica de hongos aislados de la corteza de individuos de *Pinus hartwegii*.

Objetivos Particulares

- Identificar cortezas de *P. hartwegii* con presencia de hongos parásitos o saprófitos en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca y en el Volcán Pico de Orizaba.
- Aislar de las cortezas de *P. hartwegii* seleccionadas la microbiota presente y seleccionar aquellos con actividad celulolítica.
- Comparar la microbiota celulolítica aislada entre el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca y el Volcán Pico de Orizaba.
- Evaluar la actividad celulolítica de los hongos aislados e identificar la presencia de enzimas celulolítica.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de las muestras de corteza de *Pinus hartwegii*

Se realizaron muestreos dirigidos en la corteza de árboles de *P. hartwegii* en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca y en el Volcán Pico de Orizaba. Las cortezas de *P. hartwegii* se seleccionaron tomando como criterio el desarrollo de hongos en la superficie de la corteza y su deterioro, manifestado por el cambio de color, crecimiento invasivo del hongo y textura de la misma. Las muestras fueron tomadas y depositadas en bolsas ziploc para su posterior procesamiento.

Aislamiento, purificación y conservación de cepas fúngicas

Las muestras obtenidas fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la UAEMéx. Para el aislamiento se tomó aproximadamente 1 g de las muestras colectadas de corteza de *P. hartwegii* y se siguió la técnica de dilución serial decimal de Cano-Ruera (2006). Se efectuaron diluciones hasta 10^{-8} y de la dilución 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} y se tomó una alícuota de 1 ml y con cada una se inocularon por triplicado cajas Petri con medio de cultivo sólido con la siguiente composición: 5 g/L celulosa 0.1 g/L sulfato de manganeso, 0.2 g/L sulfato de magnesio, 2 g/L fosfato monobásico de potasio y 15 g/L de agar-agar. Los cultivos fueron incubados por 72 horas a 28 °C.

Para llevar a cabo la purificación de todas las colonias desarrolladas en medio sólido de celulosa; se empleó la técnica de transferencia a medio sólido por punción (Cano-Ruera, 2006). El medio sólido para el desarrollo de las colonias fue agar dextrosa sabouraud y agar dextrosa y papa, la siembra se realizó por triplicado. La técnica de transferencia a medio sólido por punción fue aplicada hasta obtener muestras puras de cada uno de los organismos aislados. Los aislados puros fueron inoculados por punción en placas de celulosa como única fuente de carbono para verificar la expresión de celulasas de cada una de las cepas aisladas. Todas las cepas aisladas se encuentran cultivadas en medio de cultivo agar dextrosa sabouraud y agar dextrosa y papa y resguardadas en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la UAEMéx.

Caracterización de hongos por técnicas convencionales

Con cada aislado puro se procedió a realizar microcultivos siguiendo la metodología de Espadas-Resendiz *et al.* (2003) y a través de técnicas clásicas en micología se procedió a realizar su caracterización. La identificación taxonómica se hizo con claves especializadas y de acuerdo al Index Fungorum (2018) y a Mycobank (2018). Para determinar objetivamente los colores macroscópicos expresados en cada una de las cepas se utilizaron códigos de colores obtenidos de los colores web, de acuerdo con la página HTML Color Codes (COLOR CODES, 2018).

Evaluación de la capacidad celulolítica

Previo a cualquier estudio cinético los hongos fueron mantenidos y crecidos en agar celulosa con la finalidad de evitar la presencia de fase lag. Para evaluar la capacidad de degradar celulosa, se sembró por triplicado cada aislado en cajas Petri con medio sólido de celulosa (agar) como única fuente de carbono y con la composición descrita anteriormente; los cultivos fueron incubados a 28 °C. La velocidad de crecimiento y su relación con el halo de hidrólisis generado fue evaluada a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. El medio fue revelado con solución de rojo congo al 0.1 % (p/v) (Teather *et al.*, 1982). El colorante se dejó actuar durante 15 minutos y se lavó con una solución de cloruro de sodio 1 M. Se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestadas por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros con ayuda de un vernier electrónico.

Extracción de ADN

En matraces erlenmeyer de 250 ml se realizaron cultivos de cada una de las cepas aisladas en medio líquido Sabouraud, para ello con un asa bacteriológica se tomaron esporas de cada caja Petri de las diferentes cepas; cada una de ellas fue inoculada en cada matraz erlenmeyer por duplicado. Los cultivos fueron incubados a 30°C por 72 horas y una agitación de 160 rpm.

En los tiempos indicados se retiraron los matraces erlenmeyers, el micelio (biomasa) se filtró y se procedió con la extracción de ADN, siguiendo la metodología de Doyle y Doyle (1987), presentando algunas modificaciones. La biomasa de la cepa fúngica fue enfriada en un mortero con hielo seco y macerada con pistilo hasta obtener un polvo. Las muestras fueron colocadas en microtubos y en una gradilla fría, posteriormente se agregaron 500 µl de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (buffer de extracción) a cada tubo y se agitó brevemente en un vórtex. Todas las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 55 °C en un baño de agua. Las muestras se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a tubos limpios. A cada tubo se le agregaron 250 µl de la solución cloroformo-isoamilalcohol 24:1 y la solución se mezcló por inversión. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto y la fase acuosa superior se transfirió a microtubos limpios. A cada tubo se le agregó 50 µl de acetato de amonio 7.5 M, seguido de 200 µl de isopropanol absoluto frío y se homogenizó por inversión durante un minuto. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm; el sobrenadante se decantó y se agregaron 200 µl de etanol 70%. Todos los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se eliminó con una micropipeta, las muestras se dejaron secar boca abajo en papel toalla durante 10 minutos y 5 minutos en gradillas. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

Evaluación de la presencia de celulasas

Se sintetizaron cuatro pares de primers que se consideran asociados a las actividades más representativas de expresión de celulasas (Tabla II). Para la elección de los primers se hizo una búsqueda en la literatura de los genes que codifican celulasas para los organismos que se esperaba obtener; los primers seleccionados para flanquear dichos genes fueron validados mediante Blast en la base de datos del Genbank. Se realizó un análisis de los primers sintetizados en Genbank para determinar las longitudes de amplificación que es flanqueado por éstos pares de primers. Los tamaños de amplificación esperados y las celulasas para las que flanquean se describen en la Tabla II y se visualizan en la Figura 9.

Tabla II. Primers para la identificación de celulasas.

Primer	Celulasa (amplicon pb)	Autor
1.-EngA (5-GCT GGT TCC GCG TTG GCTGTG C-3) EngAR (5-GCATCTGCGACCCACCCCCTAGTT-3)	Endo-1,4-beta-glucanasa. (1204 pb).	Habib-Onsori <i>et al.</i> , (2005)
2.-CbhT (5-ACTCTACCTACCCGACGGAC-3) CbhTR (5-CGAGCATTCCAGCAAAGGTG-3)	1,4-beta-celobiohidrolasa y ExgP. (519 pb)	Edwards <i>et al.</i> , (2008)
3.-ExgP (5-AACCCTTATCGCATGGGCAA-3) ExgPR (5-TGCCACTTGTCTACAGGCAC-3)	Exo-celobiohidrolasa. (736 pb)	
4.-Eng7F (5-CAGGATGGTGGTAAGAGCACGAG-3) Eng7FR (5-CCACAAGGAAGCTTCTCCATCTC-3)	Endoglucanasa tipo C. (360 pb)	Salinas-Vaccaro (2009).

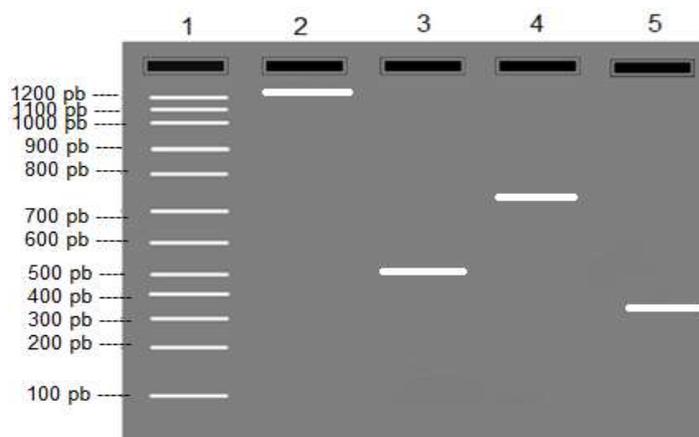


Figura 9. Representación esquemática del gel de electroforesis:

Carril:

- 1 Marcador de ADN
- 2 Endo-1,4-beta-glucanasa. (1204 pb).
- 3 1,4-beta-celobiohidrolasa y ExgP. (519 pb)
- 4 Exo-celobiohidrolasa. (736 pb)
- 5 Endoglucanasa tipo C. (360 pb)

Cuantificación y comprobación de la presencia de ADN por electroforesis

El DNA obtenido se diluyó con TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) a una concentración de 1:100; la muestra diluida fue cuantificada por espectrofotometría (Thermo Scientific Genesys G10S-UV-Vis), las mediciones se realizaron por triplicado a 260 nm y 280 nm, posteriormente se ajustó la solución de DNA a una concentración de 50 µg/µL.

Se observó la integridad del ADN extraído de las nueve cepas fúngicas en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (p/v), con solución amortiguadora de Tris-acetato-EDTA (TAE) teñida con bromuro de etidio, empleando el procedimiento descrito por Hames & Rickwood (1990). La corrida de los ácidos nucleicos se realizó a 80 V durante 30 min. Para visualizar el ADN se utilizó un transiluminador de luz UV. La integridad del ADN extraído se determinó por apreciación visual considerando que su perfil en la electroforesis correspondiera a una banda íntegra con poca o nula presencia de un barrido a de DNA a lo largo del carril electroforético.

PCR-Múltiplex

La temperatura de alineamiento de cada par de primers se obtuvo de ThermoFisher; página web en la que se introduce el par de primers y automáticamente proporciona datos como temperatura de fusión y temperatura de alineamiento, además la etiqueta proporcionada por el fabricante (Sigma-Aldrich) para cada uno de los primers contenía los mismos datos; éstos datos se consideraron para determinar cuáles primers eran viables para ser usados en la PCR-Múltiplex (Anexo II).

Utilizando el DNA obtenido y los primers asociados a la actividad celulasa se realizaron una serie de reacciones de PCR según se explica a continuación en la Tabla III. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tabla III. Master Mix PCR.

Master Mix				
	[] Inicial	[] Trabajo	[] 25 tubos	1 Tubo
Agua HPLC estéril	--	--	456.25 µl	18.25 µl
Buffer	10 X	1 X	62.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂	50 mM	2 mM	25 µl	1 µl
DNTPs	10 mM	0.2 mM	12.5µl	0.5µl
Primer 1	10 µM	0.25 µM	15.625 µl	0.625 µl
Primer 2	10 µM	0.25 µM	15.625µl	0.625 µl
Taq	5 µ/µl	0.2 µ/µl	12.5 µl	0.5 µl
DNA	50 mg/µl	50 ng/µl	1 µl	1 µl

Los reactivos se agregaron siguiendo el orden en el que se ubican en la tabla. [] Hace referencia a la concentración.

Se llevaron a cabo las amplificaciones de los primers # 2, 3 y 4 por medio de la técnica de PCR-Múltiplex (Figura 10), usando un termociclador con desnaturalización a 94°C durante 90 s, alineamiento a 62°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 45 s, con extensión final a 72°C durante 180 s (Habib-Onsori *et al.*, 2005).

Para la amplificación del primer # 1 (Figura 10), el programa utilizado para la PCR fue el siguiente: desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 72°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min con extensión final a 72°C por 10 min (Salinas-Vaccaro, 2009).

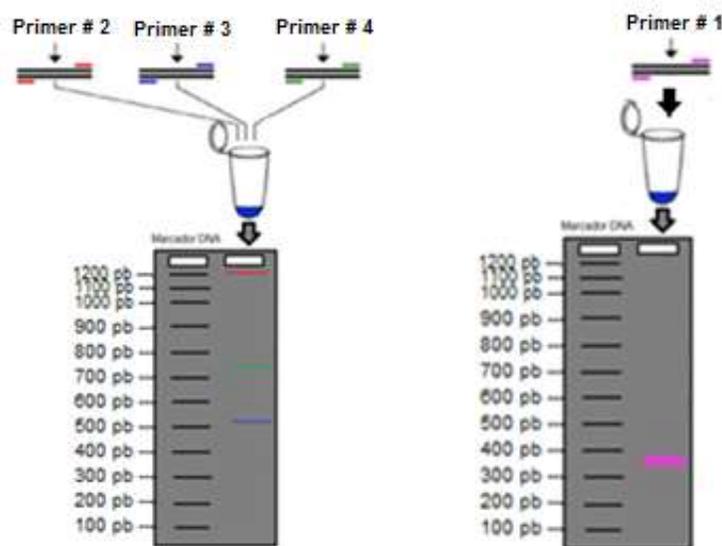


Figura 10. Representación esquemática de primers para PCR-Múltiplex y PCR convencional.

Pares de primers utilizados en la PCR-Múltiplex (lado izquierdo) y PCR convencional (lado derecho) y sus respectivas bandas esperadas en el gel.

Análisis Estadístico

Los análisis de la velocidad específica de crecimiento y velocidades de síntesis de celulasas, representada como el crecimiento del halo de hidrólisis en placas de rojo congo se realizaron por triplicado; los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de factor único. Se evaluaron las diferencias significativas entre los aislados en cada punto mediante comparaciones múltiples de medias usando la prueba de Tukey-Kramer, $P < 0.05$. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software estadístico SAS.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización de hongos celulolíticos

De las diferentes muestras de corteza de *P. hartwegii* recolectadas del Volcán Pico de Orizaba se logró aislar nueve cepas fúngicas, de las cuales cuatro fueron identificadas como celulolíticas, mientras que del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca se aislaron siete cepas de hongos y sólo cinco presentaron actividad celulolítica. Al final se obtuvieron nueve aislamientos con capacidad de crecimiento sobre medio de cultivo sólido de celulosa como única fuente de carbono, lo que demostró su capacidad celulolítica. De las nueve cepas fúngicas aisladas se encontraron ocho especies pertenecientes al grupo de los Ascomicetos y una correspondiente a los Zigomicetos (Tabla IV).

De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas que presentaron los aislados fúngicos y siguiendo claves dicotómicas se identificaron dos géneros: *Aspergillus* y *Absidia*.

Tabla IV. Cepas fúngicas aisladas de diferentes ambientes

Cepa	Claves para hongos con actividad celulolítica	Especie determinada	Lugar de origen	Clasificación de las cepas fúngicas
1	NTFV	Sin identificar	Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca	Ascomiceto
2	NTHABI	<i>Aspergillus niger</i>		Ascomiceto
3	NTNVr	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Ascomiceto</i>
4	NTHAB	<i>Aspergillus flavus</i>		Ascomiceto
5	NTNn	<i>Absidia</i> aff. <i>Corymbifera</i>		Zigomiceto
6	POHCeB	Sin identificar	Volcán Pico de Orizaba	Ascomiceto
7	POHCeBI	Sin identificar		Ascomiceto
8	POHCeVr	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Ascomiceto
9	POHCeFi	Sin identificar		Ascomiceto

Comparando los dos sitios de muestreo, seleccionados por ser bosques de coníferas y compartir condiciones ambientales y climáticas similares, se encontró que la microbiota presente en ambos sitios es diferente, pues no se aisló ninguna especie en común (Tabla IV), a pesar de que la mayoría de las cepas del Volcán Pico de Orizaba no fueron identificadas las estructuras microscópicas y macroscópicas observadas no corresponden a ninguna de las especies identificadas del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, éstos resultados incrementan la diversidad de hongos con capacidad celulolítica que pueden ser de interés en la producción de nuevas celulasas con mayor eficiencia en la degradación de celulosa que las que actualmente se conocen, obteniendo una opción biotecnológica para tratar elevados volúmenes de material lignocelulósico que no reciben tratamiento y que afectan directamente el medioambiente.

***Aspergillus fumigatus* Fresenius**

Características Macroscópicas

Colonias de crecimiento rápido en agar dextrosa Sabouraud (60-70 mm, 28°C, 3 días), aterciopeladas, vellosas con margen blanquecino (#D2CEC2); el color inicialmente es blanco (FFFFFF) virando en aproximadamente dos días a un verde azulado (#828F86) por la producción de conidias. El reverso de la colonia es beige (#C6B985) (Figura 11 A, B).

Características Microscópicas

Micelio hialino septado con conidióforos cortos, lisos de 111-(197)-273 μm de longitud y 6-(7)-8 μm de diámetro (Figura 11 F), vesícula de 13-(19)-26 μm de diámetro y cabezas conidiales uniseriadas, columnares con fiálides de 5-(6)-7 x 2.1-3 μm ocupando 2/3 partes de la parte superior de la vesícula (Figura 11 C, D). Los conidios forman una compacta columna sobre la vesícula, son de color verde (#D0F5A9), de 2 a 3 μm de diámetro (Figura E).

Material estudiado

Estado de Veracruz. Volcán Pico de Orizaba. 16/Noviembre/2016. Ángel Rolando Endara Agramont, Ángel Roberto Martínez Campos. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. POHCeVr.

Las características reportadas anteriormente coinciden con lo reportado por (Gómez de Membrillera, 1950; Abarca, 2000; Malbrán, 2016) en la descripción de *Aspergillus fumigatus*.



Figura 11. *Aspergillus fumigatus*. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 3 días, C) disposición columnar de las fiálides cubriendo 2/3 partes de la vesícula (40x), D) cabeza conidial uniseriada (100x), E) Conidios (100x), F) conidióforo liso y micelio septado (10x).

***Aspergillus flavus* Link**

Características Macroscópicas

Las colonias se desarrollan rápidamente sobre agar Sabouraud; el color es amarillo-verdoso (#9B8F2D) con bordes blanquecinos en los primeros 4 días de crecimiento, posterior a este periodo las colonias viran a verde pardo (#74602B). La textura es pulverulenta con surcos radiales, granulosa, se puede observar la presencia de esclerocios después de tres días de crecimiento (Figura 12 A). El reverso de la colonia es amarillento (#BDAD72) y después pardo claro (#9F7239) (Figura 12 B).

Características Microscópicas

Los conidióforos no ramificados de pared gruesa son hialinos, rugosos, de 560-(988)-1346 μm de longitud y de 8-(11)-16 μm de diámetro (Figura 12 D). Las vesículas son globosas o subglobosas de 13-(39)-53 μm de diámetro produciendo fiálides uniseriadas de 6-(8)-9 x 3-(3.4)-4.5 μm o biseriadas de 7-(8)-9 x 3.5-(4)-4.4 μm alrededor de la vesícula (Figura 12 C, E). Los conidios son de color verde amarillentos (#9D812D), lisos o finamente rugosos, globosos o subglobosos con un diámetro de 4 -(4.2)-5 μm de diámetro (Figura 12 F).

Material Estudiado

Estado de México. Zinacantepec. Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. 16/Enero/2017. Ángel Rolando Endara Agramont. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. NTNVR.

De acuerdo con las características macroscópicas presentes en la colonia y la descripción microscópica observada y reportada por Gómez de Membrillera (1950); Guarro-Artigas y Calvo-Torras (1978) y Abarca (2000); la descripción de la cepa corresponde a *Aspergillus flavus*.

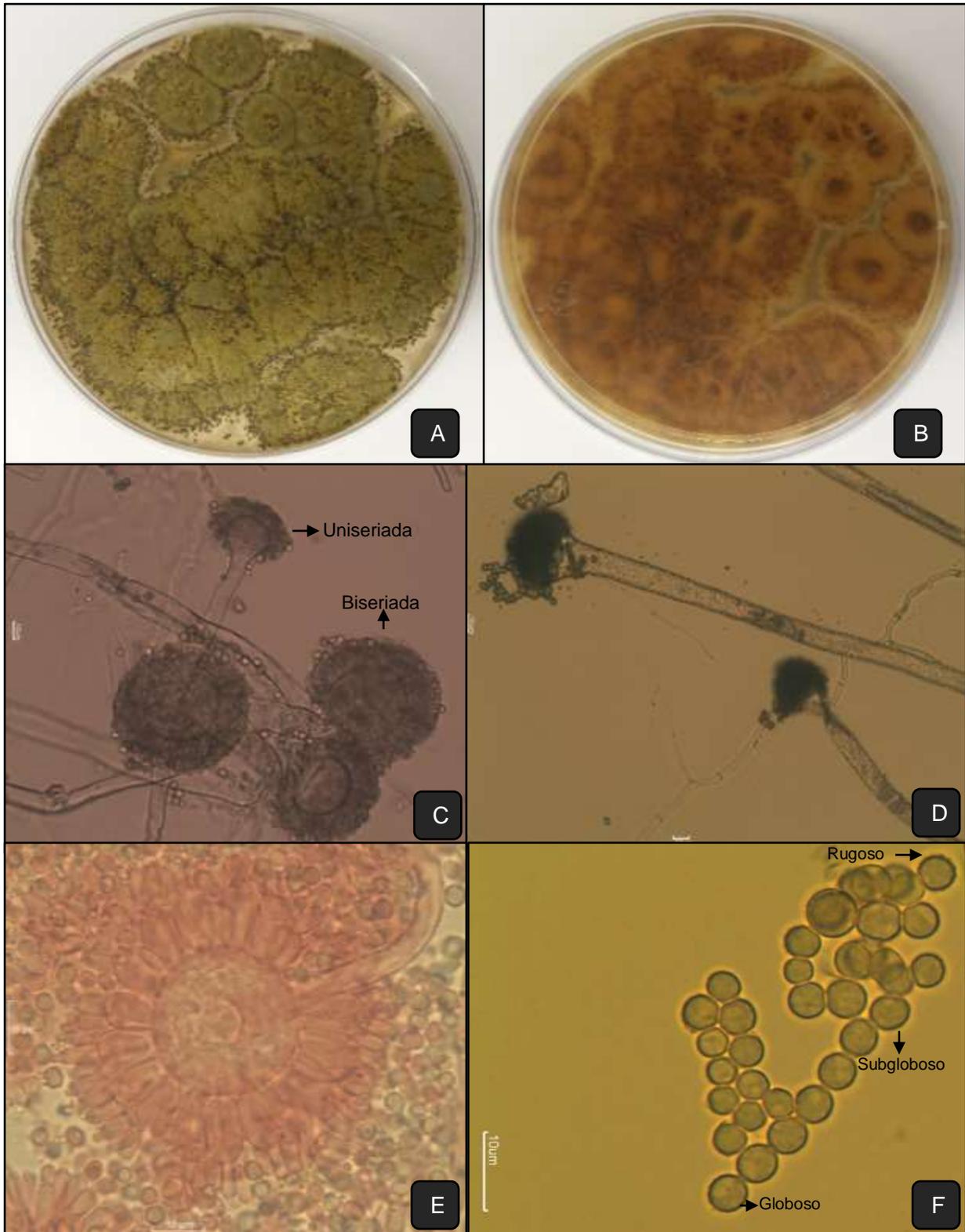


Figura 12. *Aspergillus flavus*. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 8 días, C) cabeza conidial uniseriada y biseriada con disposición radial (40x), D) Conidióforo hialino rugoso y micelio septado (10x), E) vesícula con fiálides biseriadas en disposición radial (100x), F) conidios globosos, subglobosos lisos y ligeramente rugosos (100x).

***Aspergillus flavus* Link**

Características Macroscópicas

Las colonias presentan rápido crecimiento en agar Sabouraud (65-75 mm, 4 días, 28°C); el color es amarillo-verdoso (#9B8F2D) con bordes blanquecinos (#D2CEC2) en los primeros 4 días de crecimiento, posterior a este periodo las colonias toman un color verde pardo (#74602B). La textura es pulverulenta, granulosa con surcos radiales, existe la presencia de esclerocios abundantes en la zona marginal a los ocho días de desarrollo (Figura 13 A). El reverso de la colonia es amarillento (#BDAD72) y después pardo claro (#9F7239) (Figura 13 B).

Características Microscópicas

Presentan micelio septado con conidióforos no ramificados de pared gruesa son hialinos y rugosos, de 629-(885)-1263 µm de longitud y de 6-(12) -19 µm de diámetro (Figura 13 C, E). Las vesículas son globosas de 25-(32)-41 µm de diámetro produciendo fiálides uniseriadas de 7-(7.4)-9.5 x 2-(3.2)-3.7 µm o biseriadas alrededor de la vesícula (Figura 13 D). Los conidios son de color verde amarillento (#9D812D), lisos o finamente rugosos, esféricos o subesféricos con un diámetro de 3.5- (4)-4.5 µm de diámetro (Figura 13 F).

Material Estudiado

Estado de México. Zinacantepec. Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. 16/Enero/2017. Ángel Rolando Endara Agramont. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. NTHAB.

De acuerdo con Gómez de Membrillera (1950); Guarro-Artigas y Calvo-Torras (1978) y Abarca (2000), la descripción realizada corresponde a *Aspergillus flavus*.

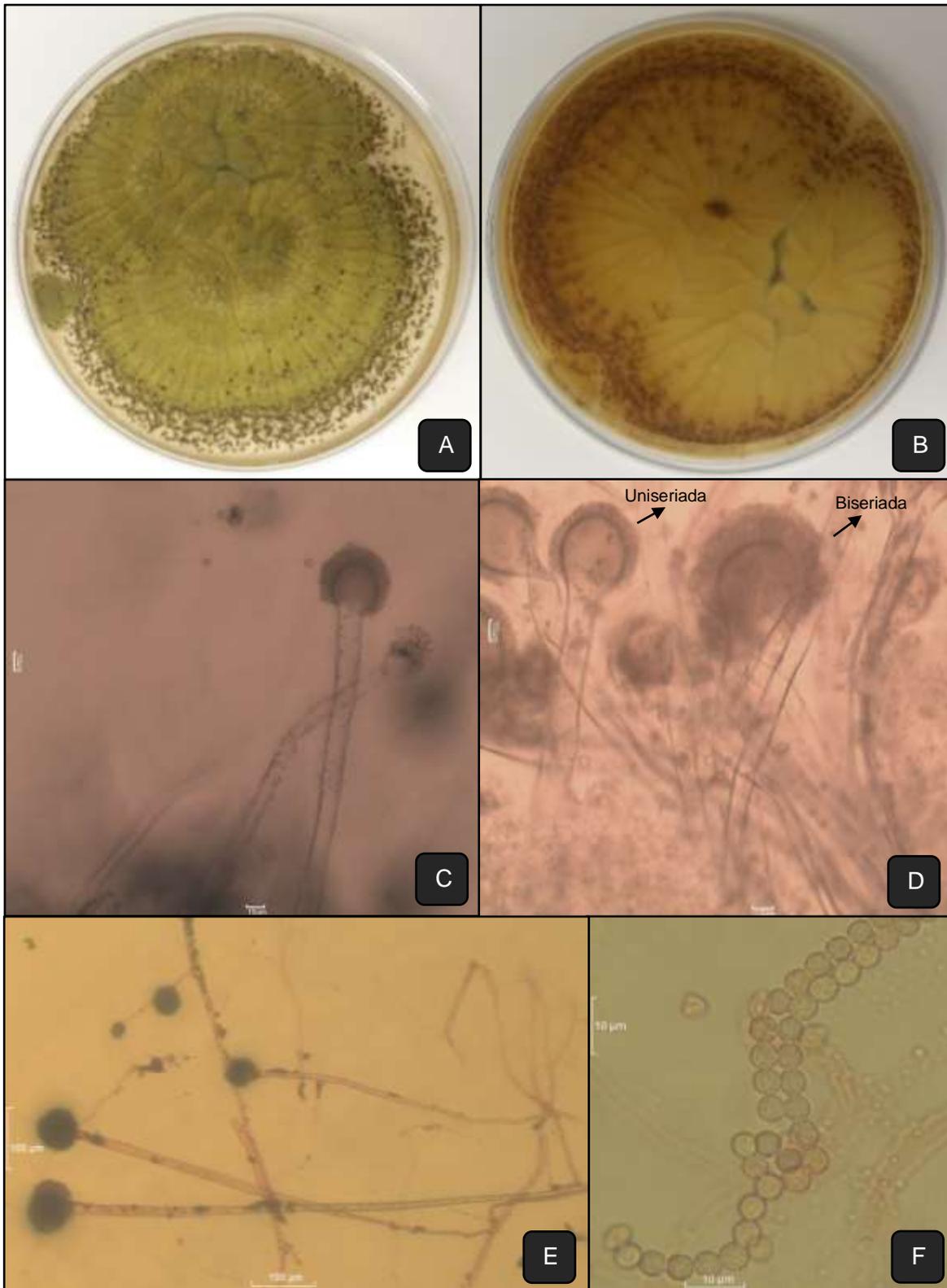


Figura 13. *Aspergillus flavus*. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 8 días, C) conidióforo hialino rugoso (40x), D) cabezas conidiales uniseriadas y biseriada con disposición radial (40x), E) conidióforos con masa de esporas en la parte apical y micelio septado (10x), F) conidios globosos y subglobosos lisos (100x).

Aspergillus niger Tiegh.

Características Macroscópicas

Las colonias son de rápido desarrollo sobre agar Sabouraud (60-70 mm, 28°C, 4 días), el color de las colonias al principio es blanco (FFFFFF), luego es negro (000000) con bordes blancos y textura granular (Figura 14 A). El reverso de la colonia es incoloro (Figura 14 B).

Características Microscópicas

Los conidióforos son hialinos de pared lisa y miden 580-(1045)-1759 μm de largo y de 15-(16)-17 μm de diámetro (Figura C). La vesícula es globosa con 42-(53)-61 μm de diámetro y produce fiálides alrededor de ella (Figura 14 F). Las fiálides son biseriadas, las ramas primarias miden 9-(18)-20 μm de largo, mientras que las secundarias son cortas y miden 7-(8)-10 μm de longitud (Figura 14 D), a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 3.5- (4)-4.7 μm de diámetro, de color marrón a negro (#522D01) (Figura 14 E).

Material Estudiado

Estado de México. Zinacantepec. Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. 16/Enero/2017. Ángel Rolando Endara Agramont. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. NTHABI.

De acuerdo con Gómez de Membrillera (1950); Guarro-Artigas y Calvo-Torras (1978) y Abarca (2000), las características macroscópicas y microscópicas presentes en la colonia, corresponden a las observadas en *Aspergillus niger*.

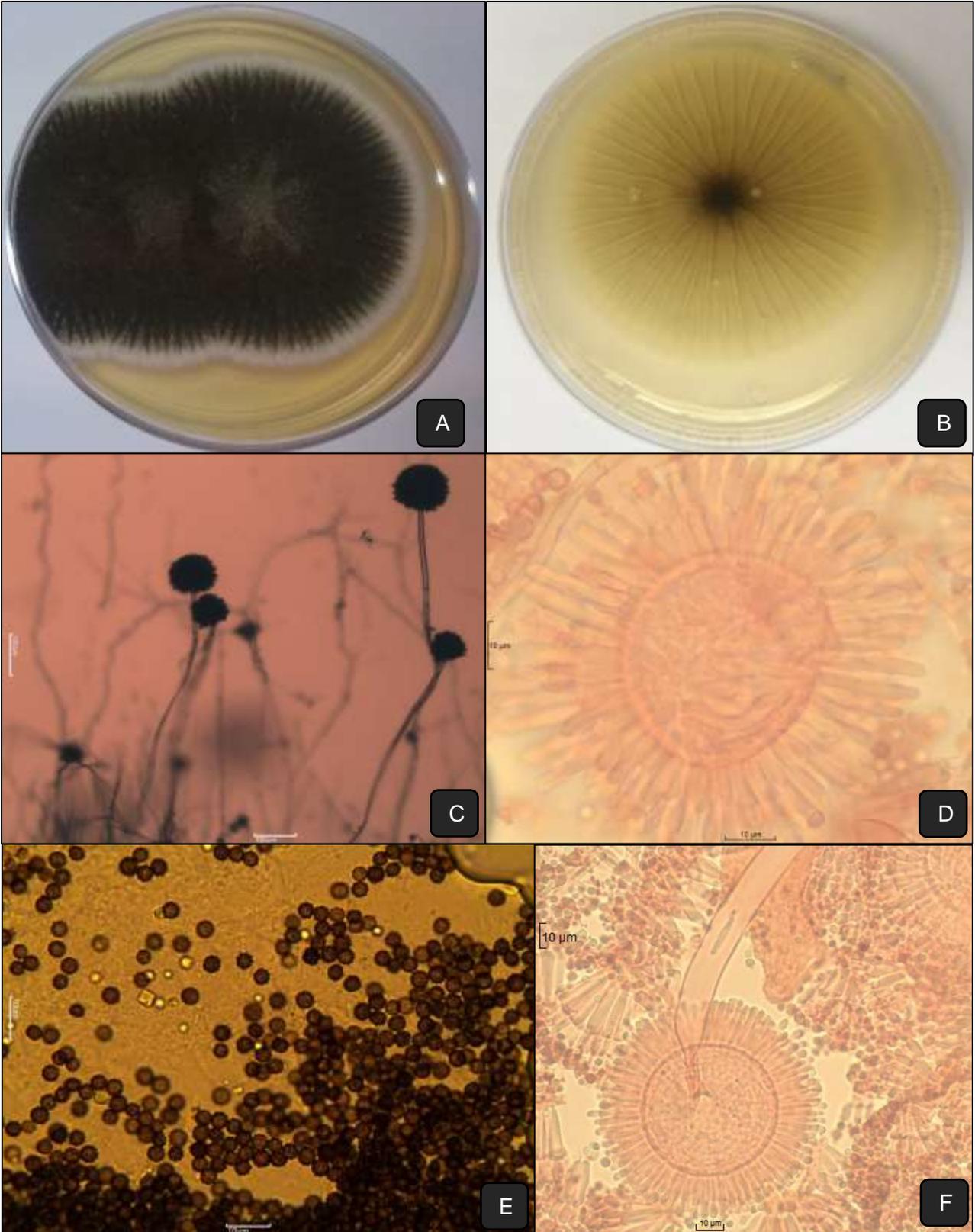


Figura 14. *Aspergillus niger*. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 5 días, C) conidióforos rectos con masa de esporas en la parte apical (10x), D) vesícula con fiáldes biseriada con disposición radial (100x), E) conidios globosos y rugosos (100x), F) cabeza conidial biseriada (100x).

Absidia* aff. *corymbifera

Características Macroscópicas

Las colonias son de rápido desarrollo sobre agar Sabouraud, cubren completamente la superficie de la caja Petri en un periodo de cuatro días, el color de las colonias al inicio del crecimiento es blanco (FFFFFF), luego vira a color gris (#8B897C) y al envejecer la colonia toma un color café claro (D2B48C), la textura es lanosa (Figura 15 A). El reverso de la colonia es incoloro (Figura 15 B).

Características Microscópicas

El micelio es macrosifonado, hialino, cenocítico y ramificado dando lugar a la producción de abundantes esporangióforos de 12 (22) 41 μm (Figura 15 D, E), no se observó la presencia de rizoides, la columela es globosa o periforme (Figura 15, C), presenta esporangiosporas redondas de 3 a 5 μm de diámetro (Figura 15, F).

Material Estudiado

Estado de México. Zinacantepec. Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. 16/Enero/2017. Ángel Rolando Endara Agramont. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. NTNn.

De acuerdo con las características macroscópicas presentes en la colonia y la descripción microscópica observada y reportada por Malbrán (2016) y Guarro (2012), la descripción de la cepa corresponde al género *Lichtheimia*, anteriormente llamado *Absidia*.

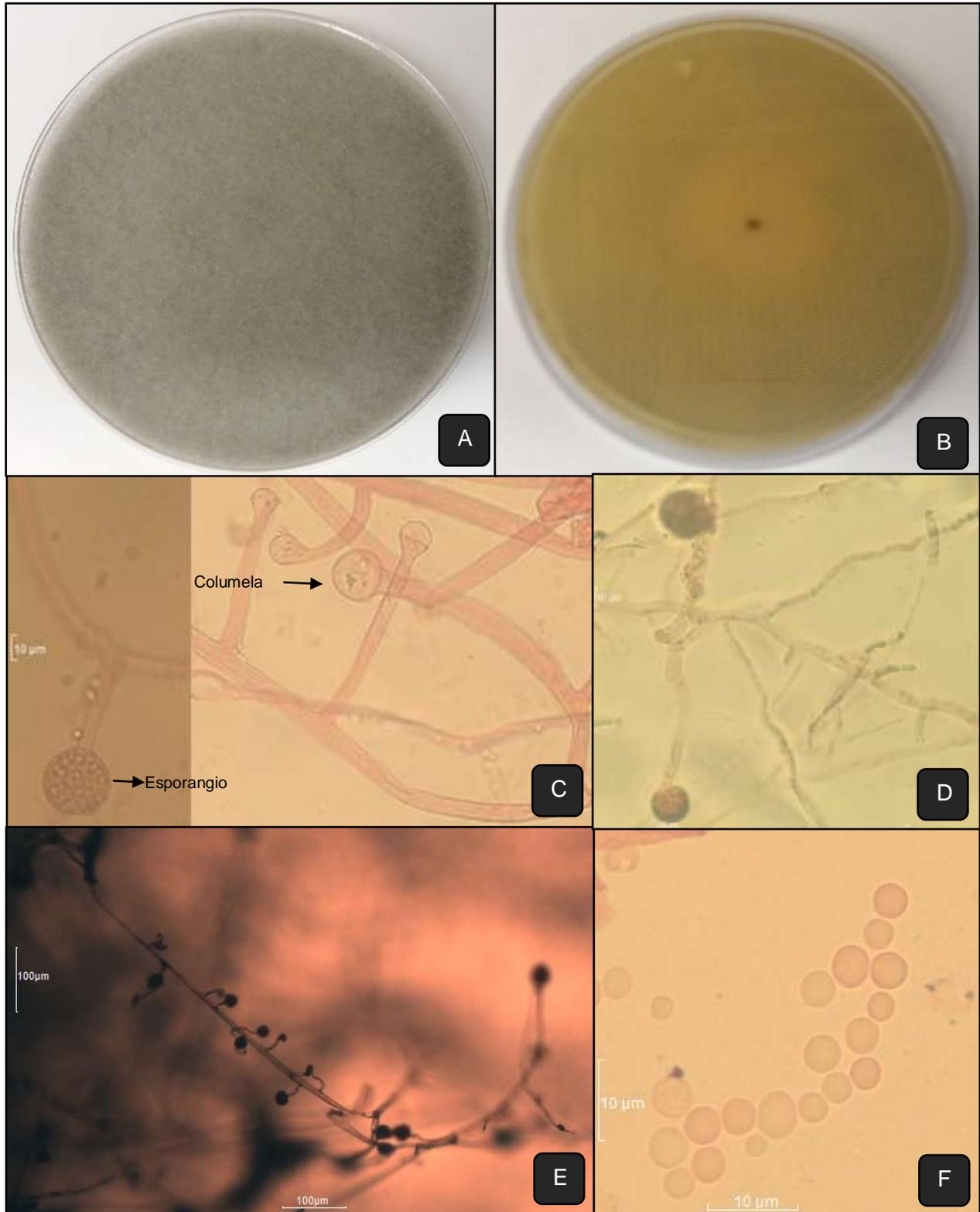


Figura 15. *Absidia* aff. *corymbifera*. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 4 días, C) esporangióforo con esporangios es la parte apical y esporangióforo sin esporangio (columela visible) (40x), D) esporangioforos con masa de esporangiosporas en la parte apical y micelio cenocítico (40x), E) micelio cenocítico ramificado por la producción de esporangios (10x), F) esporangiosporas (100x).

Cepa NTFV

Características Macroscópicas

Colonias de crecimiento rápido en agar dextrosa Sabouraud (50-60 mm, 28°C, 3 días), inicialmente el micelio cubre en su totalidad la superficie de la caja Petri, dando un aspecto incoloro, posteriormente la colonia toma colores que van de verde (#3E471C), amarillo (#837917) y blanco (FFFFFF) conforme ésta va madurando, se desarrolla de forma plana y extendida con aspecto húmedo (Figura 16 A). El reverso de la colonia es incoloro (Figura 16 B).

Características Microscópicas

Micelio hialino septado de 2.81 μm de grosor con presencia abundante de clamidosporas de 4-(6.7)-8 μm de diámetro (Figura 16 C). Los conidios son de color verde (#CFE99C), lisos y ovalados de 3.4- (3.7)-4.5 x 2.1- (2.3)-2.4 (Figura 16 D).

Material Estudiado

Estado de México. Zinacantepec. Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. 16/Enero/2017. Ángel Rolando Endara Agramont. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. NTFV.

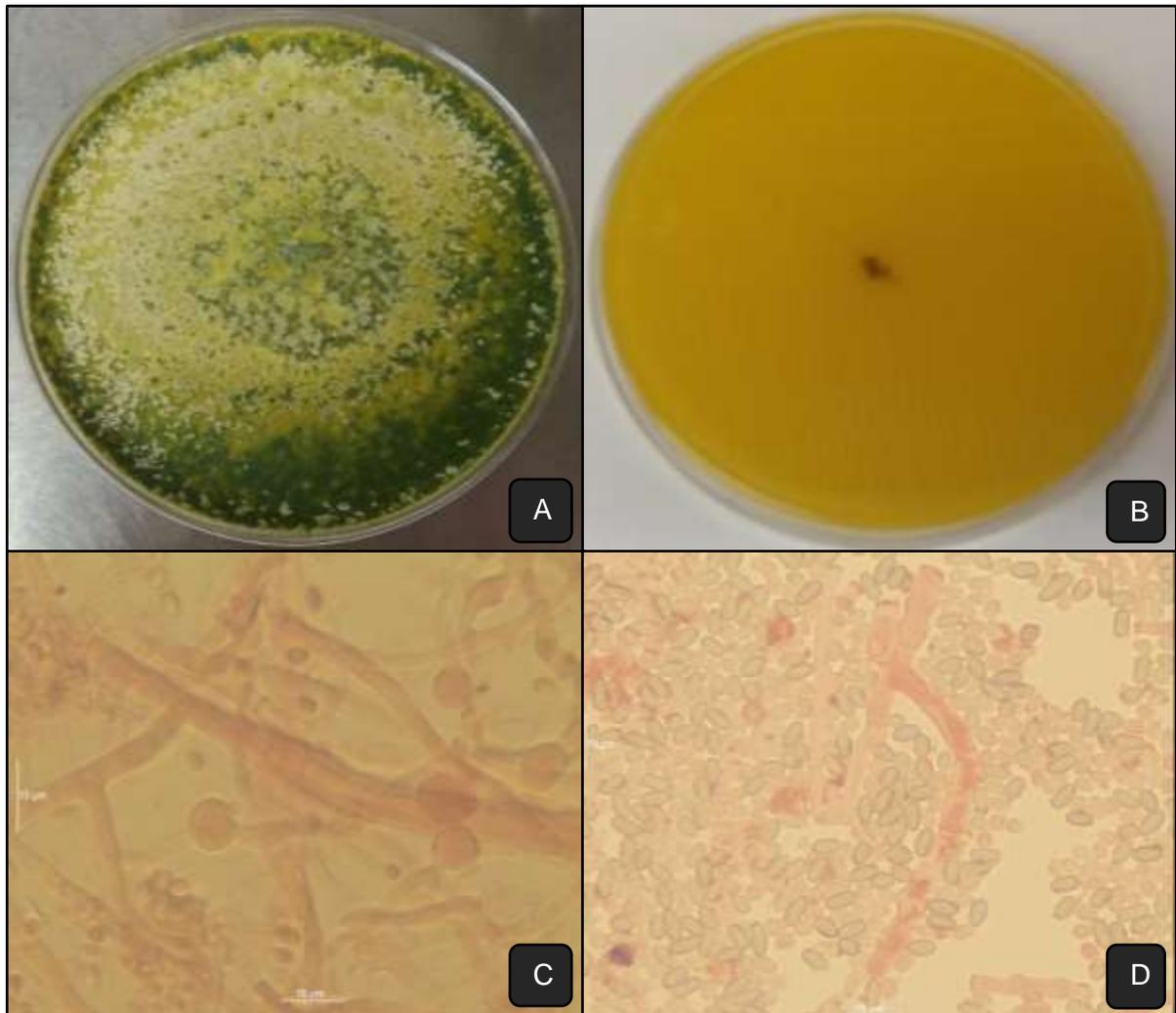


Figura 16. Cepa NTFV. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 10 días, C) micelio septado con clamidosporas (100x), E) Conidios ovalados y micelio septado.

Cepa POHCeB

Características Macroscópicas

Las colonias se desarrollan moderadamente sobre agar Sabouraud, cubren el total de la superficie de la caja en 14 días, la colonia es circular, plana de color blanco (FFFFFF) y textura algodonosa, en la superficie presenta surcos radiales y formación de exudados de color amarillo (Figura 17 A). El reverso de la colonia es incoloro (Figura 17 B).

Características Microscópicas

Micelio hialino septado de 2.1 μm con escasa presencia de clamidosporas de 6.3-(7.842)-9.7 x 6-(7.4)-9 μm (Figura 17 C, D).

Material Estudiado

Estado de Veracruz. Volcán Pico de Orizaba. 16/Noviembre/2016. Ángel Rolando Endara Agramont, Ángel Roberto Martínez Campos. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. POHCeB.



Figura 17. Cepa POHCeB. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 14 días, C) micelio septado (100x), E) Clamidosporas (100x).

Cepa POHCeBI

Características Macroscópicas

Las colonias se desarrollan lentamente sobre agar Sabouraud, en 14 días cubren la mitad del total de la superficie de la caja, presenta color café (#4A2908) en el centro y amarillo (#C4A952) en la parte media con bordes blanquecinos (FFFFFF0), textura aterciopelada con aspecto seco (Figura 18 A). El reverso del a colonia es incoloro (Figura 18 B).

Características Microscópicas

Micelio hialino, septado de 2.5 μm con presencia de clamidosporas de 3.2-(3.9)-4.8 μm (Figura 18 C, D).

Material Estudiado

Estado de Veracruz. Volcán Pico de Orizaba. 16/Noviembre/2016. Ángel Rolando Endara Agramont, Ángel Roberto Martínez Campos. Aislamiento de corteza de *Pinus hartwegii*. POHCeBI.

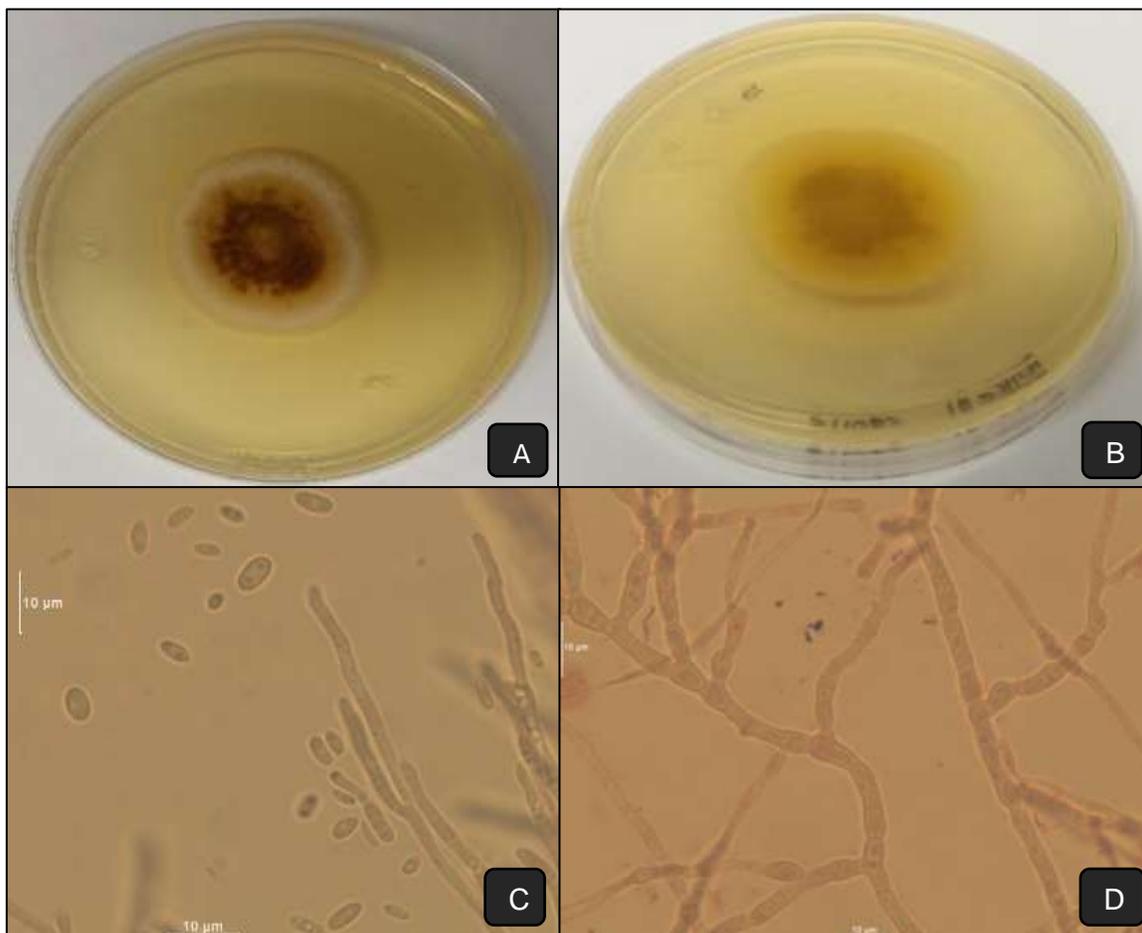


Figura 18. Cepa POHCeBI. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 10 días, C) esporas asexuales (100 x), D) micelio septado (100 x).

Cepa POHCeFi

Características Macroscópicas

Las colonias son de rápido desarrollo sobre agar Sabouraud, cubren completamente la superficie de la caja Petri en un periodo de cuatro días, la colonia presenta elevaciones del micelio que en los primeros dos días es blanco (FFFFFF) y después vira a gris claro (C0C0C0) que se va oscureciendo conforme la colonia madura, la textura es algodonosa (Figura 19 A). El reverso de la colonia se va haciendo oscuro día a día hasta llegar a un tono totalmente negro (Figura 19 B).

Características Microscópicas

Micelio septado de $3.24 \mu\text{m}$ con escasa presencia de clamidosporas intercalares de $6.5\text{-}(7.9)\text{-}9.3 \times 6.2\text{-}(7.54428571)\text{-}9.5 \mu\text{m}$ (Figura 19 C, D).

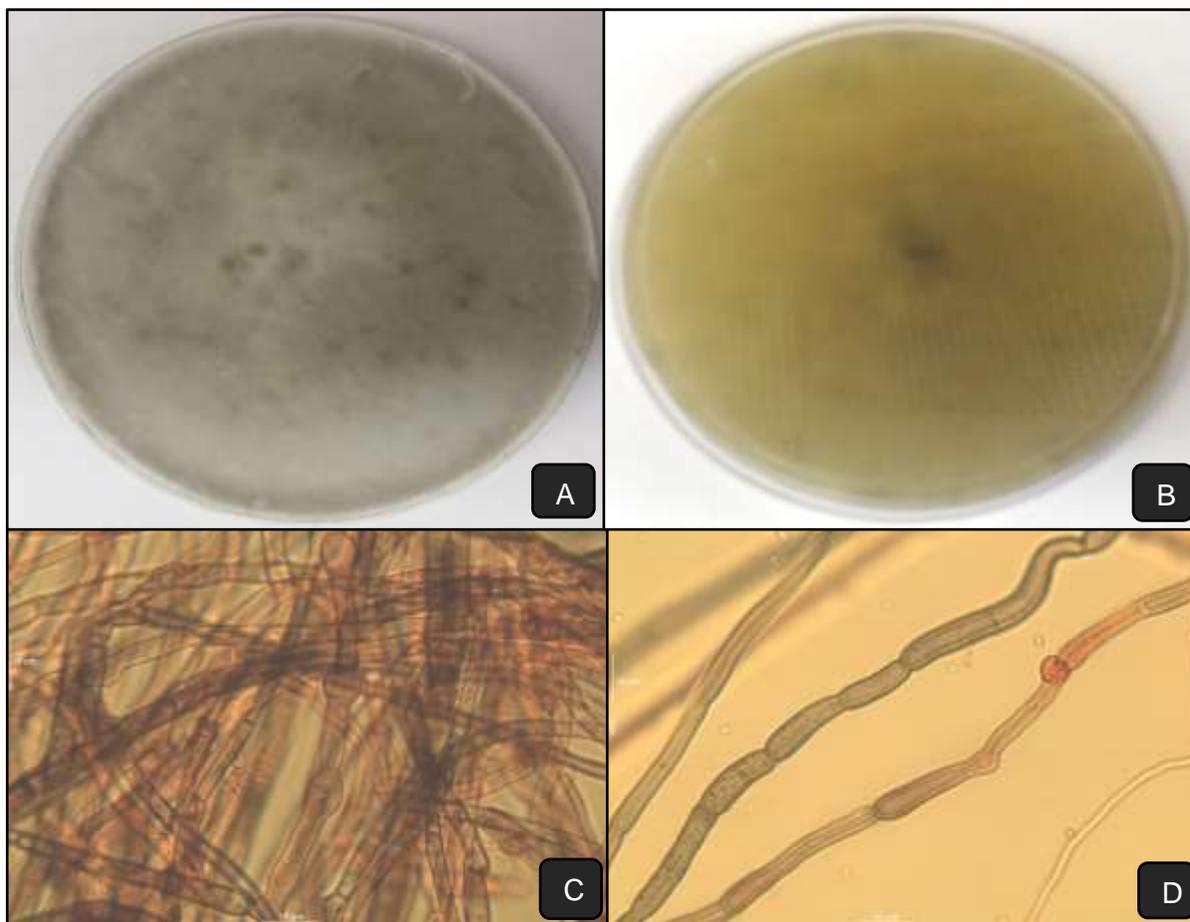


Figura 19. Cepa POHCeFi. A) Anverso de la colonia, B) reverso de la colonia: agar dextrosa Sabouraud, 28 °C, 4 días, C) clamidosporas intercalares (100x), E) micelio septado (100x).

La identificación hasta nivel de especie de cada uno de los hongos aislados es importante, ya que permite contrastar los resultados obtenidos con lo que ya previamente ha sido descrito por otros autores y ayuda a conocer las características particulares de cada uno de los organismos, sin embargo, aunque se han logrado importantes avances en la identificación de hongos filamentosos aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies.

De las nueve cepas aisladas, cuatro corresponden al género *Aspergillus* y una al género *Absidia*, el cual actualmente ha sido reubicada dentro del género *Lichtheimia*. No fue posible identificar las cuatro cepas restantes, debido a la ausencia de estructuras microscópicas definidas que permitieran la identificación como lo ha propuesto Barnett y Hunter (1998). Además, no necesariamente con el hecho de contar con estructuras microscópicas nos permitirá poder definir con certeza el grupo de estudio al que pertenecen tal como lo ha evidenciado Unda *et al*, (2011) al mencionar que la identificación basada en la morfología en algunas ocasiones presenta un importante grado de dificultad sobre todo para distinguir especies cercanas, en las que las características fenotípicas son muy similares; es por eso que las técnicas moleculares han encontrado un campo de acción para la identificación de las especies, obteniendo así resultados con mayor rapidez y fiabilidad. Es conveniente emplear el uso de estas técnicas para determinar el género y especie de las cepas que no pudieron ser identificadas.

Para llevar a cabo el crecimiento de las cepas aisladas fue necesario contar con un sustrato que proporcionara los nutrientes necesarios para el desarrollo de las cepas, para ello se emplearon dos medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA) y agar sabouraud dextrosa. Ésta elección de medios de cultivo se hizo teniendo en cuenta que Hernández-Mansilla y Rosón-Álvarez (2005) realizaron una comparación de los medios de cultivo: agar papa dextrosa (PDA), agar czapek dox (industrial oxid), agar soya, agar sabouraud dextrosa (SDA), (industrial oxid) y agar extracto de malta y obtuvieron que el agar papa dextrosa (PDA) y agar sabouraud dextrosa fueron los más eficientes para el desarrollo de las colonias en estudio. Ocho de las nueve cepas evaluadas tuvieron un mejor desarrollo en agar dextrosa sabouraud pues en ellas las estructuras macroscópicas se desarrollaron con mayor definición en comparación con los crecimientos en PDA, este comportamiento de las cepas está en concordancia con lo que mencionan Cañedo y Ames (2004) quienes indican que en agar sabouraud debido a su composición los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien, sin embargo la cepa POHCeFi expresó características como la difusión de pigmento en el medio de cultivo agar papa dextrosa, lo cual es útil para el diagnóstico de la especie, tal como lo reporta López y López, 2004, quienes evaluaron diferentes medios de cultivo para determinar la expresión de los diferentes caracteres, resaltando la importancia de la difusión del pigmento al medio para la identificación de la especie.

El hongo aislado de corteza de *P. hartwegii* que se encontró con mayor frecuencia corresponde al género *Aspergillus*, coincidiendo con Collazos-Silva & Ortiz-Baca (2014) y Orellana Merino (2014), quienes han reportado este género como uno de los más frecuentes; dos de las cepas aisladas pertenecientes a este grupo resultaron ser *A. flavus* y las otras dos fueron *A. fumigatus* y *A. niger*; en sus estudios Abarca (2000) menciona que las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos, debido a ello se esperaba que por lo menos alguno de los aislados correspondiera al género *Aspergillus* sp. De igual forma se ha registrado aislamiento de *Aspergillus* sp. a partir de despojos vegetales, muestras de tierra, muestras de suelo de bosques, aserrín y madera en descomposición (Bastawde, 1992; Cruz *et al.* 2009; Karegoudar *et al.*, 2013; Martínez *et al.* 2001).

Diferentes géneros de mucorales y ascomicetes tales como *Aspergillus* y *Fusarium* han sido objeto de diversos estudios debido a que son causantes de infecciones en el hombre (Guarro, 2012; Mellado *et al.*, 2002). Algunas de las cepas fúngicas aisladas e identificadas coinciden con géneros y especies que han sido reportados como patógenos para el ser humano, tales como: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* y *Absidia* (Abarca, 2000; Guarro, 2012; Malbrán 2016; Mellado *et al.*, 2002). Sin embargo, su estudio es necesario, ya que a pesar de que presentan características patógenas tienen aplicaciones importantes en la industria textil, en la industria de producción de detergentes, en la producción de alimentos, la industria del papel y en la formulación de medicamentos (Llenque-Díaz *et al.*, 2015; Vásquez-Vanegas, 2013). Los hongos filamentosos aislados en este estudio son capaces de producir una gran variedad de enzimas que son aprovechadas en diversos sectores industriales; específicamente *Aspergillus* spp. ha sido aplicado en la producción de pectinasas, xilanasas y celulasas (Beltrán-Gómez *et al.* 2007; Llenque-Díaz *et al.*, 2015); para *Fusarium* spp. se ha reportado actividad celulolítica, amilolítica, pectinolítica y proteolítica (Valencia-Guerrero *et al.*, 2011) y producción de lacasas (Tangarife-Morales, 2016).

Crecimiento y actividad celulolítica de los aislamientos

Las nueve cepas fúngicas aisladas crecieron en celulosa como única fuente de carbono y mostraron actividad celulolítica representada por los halos de hidrólisis observados alrededor de los crecimientos en las placas de agar celulosa (Figura 20), fue evidente que cada cepa tuvo crecimiento y actividad celulítica diferentes.

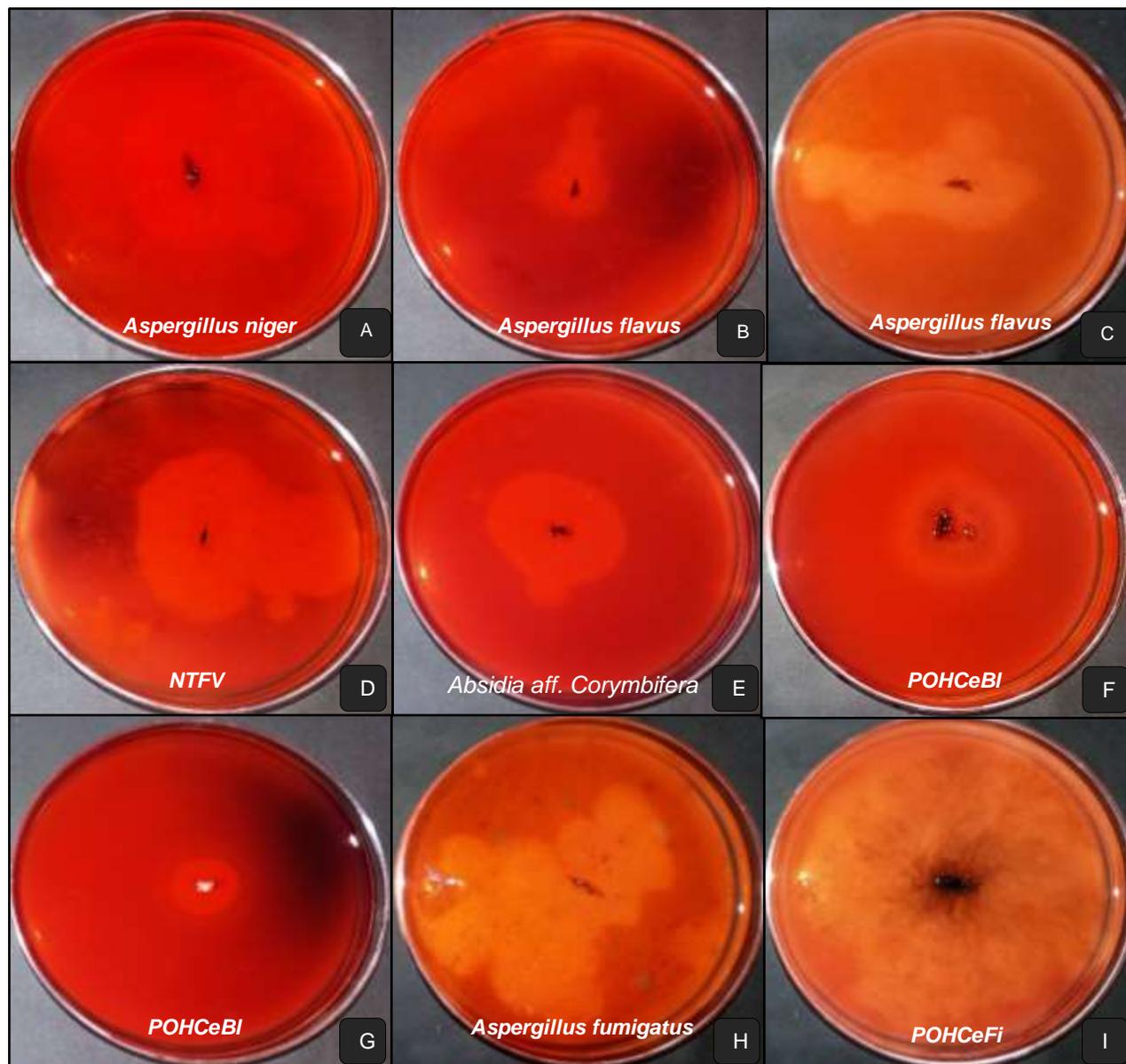


Figura 20. Halos de hidrólisis de celulosa. Evaluación de actividad celulolítica en las cepas fúngicas aisladas; 72 horas de incubación. A-E corresponde a los organismos recuperados del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, F-J provienen del Volcán Pico de Orizaba.

La velocidad de crecimiento y la actividad celulolítica de los aislados siguieron el perfil que se muestra en la Figura 21, en la que se observan dos etapas, una que va de 24 a 96 horas y otro de 96 a 144 horas; se observa que tanto la velocidad de crecimiento como la actividad celulolítica se representa por medio de una función lineal simple del tipo crecimiento del hongo= $mc \cdot t + \text{diámetro inicial}$, donde mc =pendiente de la función lineal ajustada del crecimiento (mm/h), excepto para POHCeB y POHCeBl donde la pendiente de la velocidad de crecimiento fue menor en la etapa inicial que en la segunda. La actividad de hidrólisis= $ma \cdot t + \text{diámetro inicial}$, donde ma = pendiente de la función lineal ajustada de la actividad de hidrólisis (mm/h), para éste caso la actividad celulolítica de las dos cepas de *A. flavus* y NTFV presentaron mayor actividad en la etapa dos que en la uno.

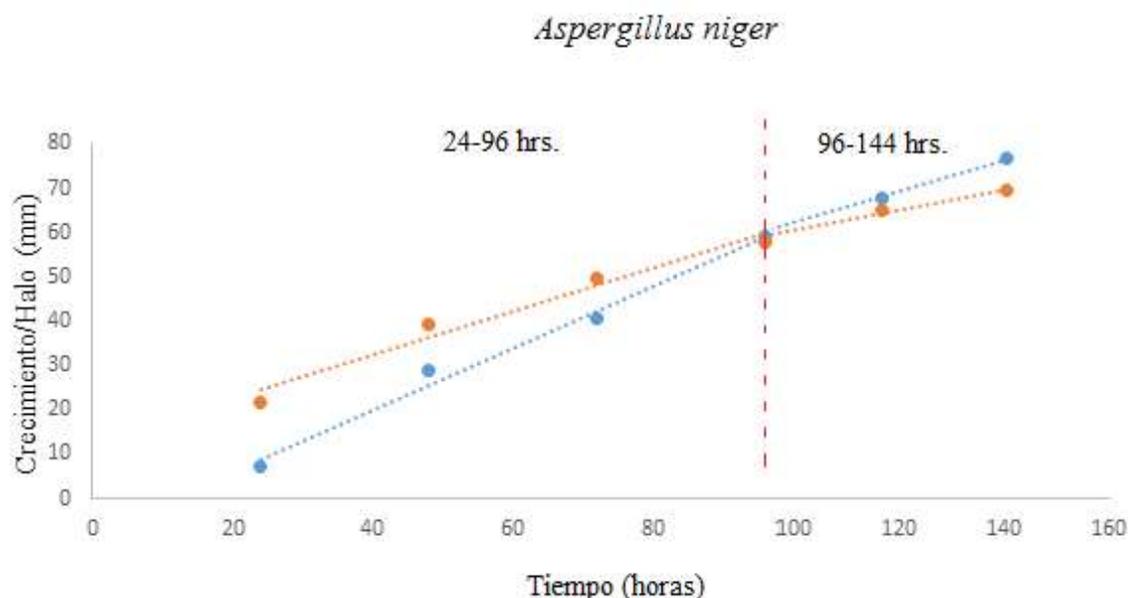


Figura 21. Cinética de la velocidad de crecimiento (Azul) y actividad celulolítica (Anaranjado).

La mayor velocidad de crecimiento para siete cepas y actividad celulolítica para 6 de las cepas se presentó durante la primera etapa (0-96 hrs), probablemente porque los microorganismos primeramente atacan la estructura amorfa de la celulosa microcristalina, pues ésta es una región donde las fibras contienen torceduras y espacios en sus microfibrillas lo cual permite la formación de microporos y capilares lo suficientemente espaciosos para permitir la penetración de moléculas como las enzimas celulolíticas, haciéndola más fácil de degradar para obtener los azúcares requeridos por los microorganismos (Lynd *et al*, 2002; Zhang y Lynd, 2004).

Sin embargo después de que se consume la parte amorfa de la celulosa sólo queda disponible la estructura más ordenada y cristalina de la celulosa, siendo ésta más difícil de degradar debido a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno ((Martínez-Anaya *et al*, 2008), afectando el crecimiento lineal que se observa en la segunda etapa (96-144 hrs), ya que el desarrollo sigue siendo exponencial pero con velocidades de crecimiento y actividad celulolítica inferiores a las de la primera etapa.

Los resultados obtenidos de la prueba de Tukey, tabla IV demuestran que no todos los hongos con actividad celulolítica presentan la misma capacidad para hidrolizar celulosa; de acuerdo a los valores de actividad específica obtenidos con la evaluación de las actividades hidrolíticas cualitativas (presencia de halo de hidrólisis) se encontró que de las nueve cepas fúngicas aisladas, *Aspergillus fumigatus*, y la cepa POHCeFi provenientes del Volcán Pico de Orizaba fueron las que expresaron la mayor capacidad de hidrolizar celulosa obteniendo valores de, 0.61 y 0.784 mm/hrs, respectivamente *Aspergillus niger* proveniente del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca alcanzó 0.472 mm/hrs y fueron estadísticamente diferentes contra el resto de las cepas ($p \leq 0.05$).

Para la primera etapa de crecimiento, el hongo *Aspergillus niger* proveniente del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, *Aspergillus fumigatus*, y la cepa POHCeFi del Volcán Pico de Orizaba presentaron la máxima velocidad de crecimiento alcanzando 0.734, 0.648 y 0.637 mm/hrs respectivamente, mostrando diferencias significativas con el resto de las cepas evaluadas. Sin embargo, en la segunda etapa de velocidad de crecimiento la cepa POHCeB del Pico de Orizaba fue la que presentó mayor velocidad con 0.39 mm/hrs. Por otro lado, *Aspergillus niger* y la cepa POHCeFi no presentaron diferencias estadísticas entre ellas y a diferencia de la etapa uno donde fueron las de máximo crecimiento en la etapa dos éste decayó, pero a pesar de eso resultaron ser los terceros en velocidad. Mientras que, *Aspergillus fumigatus* mostró una disminución en su crecimiento ubicándolo en el quinto lugar de velocidad de crecimiento con 0.277 mm/hrs; probablemente esto se debe a una disminución de nutrientes en el medio de cultivo afectando de forma directa el crecimiento de las cepas que un principio mostraron rápido desarrollo.

Para la primera etapa de producción del halo de hidrólisis los hongos POHCeFi y *A. fumigatus* correspondientes al Volcán Pico de Orizaba no presentaron diferencias estadísticas entre ellos y obtuvieron las mayores actividades 0.784 y 0.61 mm/hrs respectivamente. Sin embargo, fueron estadísticamente diferentes de *A. niger* proveniente del Nevado de Toluca que resultó ser el segundo en actividad con 0.472 mm/hrs.

En la segunda etapa NTFV con 0.452 mm/hrs fue el que expresó mayor actividad de hidrólisis y presentó diferencias estadísticas con las dos cepas de *Aspergillus flavus* que fueron las segundas en actividad hidrolítica alcanzando 0.381 y 0.393 mm/hrs (Tabla V). Es evidente como las cepas fúngicas que en la primera etapa se encontraban expresando mayor actividad celulítica, en la segunda etapa decayeron; este comportamiento de la actividad celulasas puede deberse a que las celulasas producidas se dan de manera inducida y las condiciones para que este proceso se pueda llevar a cabo en cada una de las cepas fúngicas depende de la reacción que cada hongo exprese ante el medio donde se lleva a cabo su desarrollo; ya que algunos pueden presentar el fenómeno de represión catabólica, en donde el producto final de la hidrólisis enzimática es responsable de la regulación negativa a nivel transcripcional; este mecanismo evita que el hongo sintetice una cantidad excesiva de celulasas cuando existe disponibilidad de otras fuentes de carbono más fácilmente asimilables (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2015).

La disminución de la actividad celulasas después de las 96 horas de crecimiento en la cepa POHCeFi, *A. fumigatus* y *A. niger* puede deberse a que la glucosa ejerce un efecto represor sobre la transcripción de los genes encargados de promover la producción de celulasas (Gutiérrez-Rojas *et al*, 2015; Nazir *et al*, 2010), por lo tanto como en la primera etapa estas cepas fúngicas ya habían producido suficiente glucosa para llevar a cabo su desarrollo, ya no era necesario continuar con el mismo ritmo de secreción de celulasas en la segunda etapa, pues de manera natural se estaba llevando a cabo una represión de los genes promotores.

Además, Nazir *et al*, (2010) encontraron que la inducción de la producción de enzimas celulasas está asociada con la presencia de distintos metabolitos; comprobaron que la adición de fructosa y celobiosa en su medio de cultivo dio como resultado una regulación al alza de la actividad de endoglucanasa (EG) en *A. terreus*, mientras que la adición de manitol, etanol y glicerol reprimieron selectivamente la expresión de celulasas. Por lo tanto, cada uno de los hongos aislados puede hidrolizar la celulosa en diferentes tiempos dependiendo de las necesidades y metabolitos que cada hongo presente.

Tabla V. Velocidad de crecimiento y halos de hidrólisis de celulosa.

Cepa Fúngica	ETAPA 24-96 horas (E1)		ETAPA 96-144 horas (E2)		24-96 horas	96-144 horas
	Velocidad de crecimiento (mm/hora)	Halo de hidrólisis (mm/hora)	Velocidad de crecimiento (mm/hora)	Halo de hidrólisis (mm/hora)	E1/E2	H1/H2
NTFV	0.586 abc	0.392 b c	0.209 fed	0.452 a	2.8011 a	0.8681 c
NTHABI (<i>Aspergillus niger</i>)	0.734 a	0.472 b	0.342 cb	0.264 bc	2.1437 ba	1.8369 ba
NTHAB (<i>Aspergillus flavus</i>)	0.441 cde	0.229 d	0.207 ed	0.381 ba	2.1229 ba	0.6404 c
NTNVr (<i>Aspergillus flavus</i>)	0.517 bcd	0.341 c	0.172 f	0.393 ba	3.016 a	0.8796 c
NTNn (<i>Absidia aff. Corymbifera</i>)	0.422 de	0.37 c	0.195 fe	0.204 b	2.2144 ba	1.8148 ba
POHCeB	0.349 ef	0.359 c	0.39b	0.338 bac	0.9215 dc	1.063 bc
POHCeBI	0.223 f	0.316 cd	0.305 cbd	0.298 bac	0.7335d	1.0599 bc
POHCeVr (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	0.648 ab	0.61 a	0.277 ced	0.270 bc	2.341 ba	2.2653 a
POHCeFi	0.637 ab	0.784 a	0.327 cb	0.293 bac	1.7831 bc	2.4162 a

Los datos corresponden a la media de al menos tres datos por cada cepa fúngica correspondientes a la media de la velocidad específica de crecimiento y al consumo del sustrato evaluado como el halo de hidrólisis en medio sólido de celulosa como única fuente de carbono.

RELACIÓN **E1/E2** CRECIMIENTO— Muestra la relación existente entre la etapa uno y la etapa dos de la velocidad de crecimiento, para determinar en qué etapa se lleva a cabo el mayor crecimiento.

RELACIÓN **H1/H2** HALO DE HIDRÓLISIS— Muestra la relación existente entre la etapa uno y la etapa dos del consumo del sustrato, evaluada como el halo de hidrólisis de celulosa observado por revelado con rojo congo; para determinar en qué etapa se lleva a cabo el mayor consumo de celulosa.

Las letras son o no las diferencias estadísticas existentes entre las diez cepas aisladas en donde medias dentro de la misma columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Por otro lado en los estudios de Maku y Godiya, (2010) realizaron aislamientos de hongos mesófilos de suelo y recuperaron *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. como los principales productores de celulasas; algunas de estas especies empatan con los resultados obtenidos en esta investigación y coinciden con lo obtenido por Madamwar y Patel (1992), donde evaluaron la capacidad celulolítica de *Aspergillus niger* y se encontró como uno de los mejores hongos celulolíticos; en este estudio fue uno de los organismos que mayor actividad presentó. Además Gutierrez *et al*, (2012) aislaron de hojas de bambú, hojas de mango y lascas de madera *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* y *Trichoderma reesei*, y probaron su actividad celulolítica, observaron que *A. niger* generó halos de hidrólisis de 0.3 mm/h y *Trichoderma reesei* destacó sobre todos los aislados produciendo halos de 0.5 mm/h, haciendo una comparación con los resultados obtenidos la cepa *A. niger* aislada en este estudio generó halos de 0.47 mm/h en las primeras 72 horas, se observa que son mayores a los reportados, incluso la cepa POHCeFi generó un halo de hidrólisis de celulosa de

0.78 mm/hrs, éste valor de hidrólisis es superior a la cepa de *Trichoderma reesei* aislada por dichos autores; por lo tanto se puede deducir que algunas de las cepas recuperadas de corteza de *Pinus hartwegii*, presentan una elevada actividad celulolítica.

En los estudios realizados por Gopinath *et al*, 2005 obtuvieron resultados donde la máxima actividad celulolítica la obtuvieron *Absidia corymbifera*, *A. níger*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani*, *Mucor racemosus*, *Paecilomyces variotii*, y *Syncephalastrum racemosum*, de igual forma reportan actividad en otros de sus aislados como *A. fumigatus* y *A. flavus*, pero con menor eficiencia; algunos de los organismos aislados coinciden con los que se recuperaron como *A. fumigatus* y *A. flavus* y *Absidia corymbifera*.

Evaluación de la presencia de celulasas

Las pruebas moleculares para la identificación de la actividad celulolítica mediante el uso de PCR para determinar celulasas específicas en cada uno de los aislados no fue posible, ya que los primers empleados no amplificaron ningún gen coincidente con los hongos aislados, indicando así la ausencia de las celulasas para las cuales son específicos los primers utilizados (Figura 22). Sin embargo, existe la expresión de celulasas en las diez cepas fúngicas aisladas, ya que con la prueba de rojo congo se evidenció su expresión al generar halos de hidrólisis en el sustrato cuya única fuente de carbono era la celulosa.

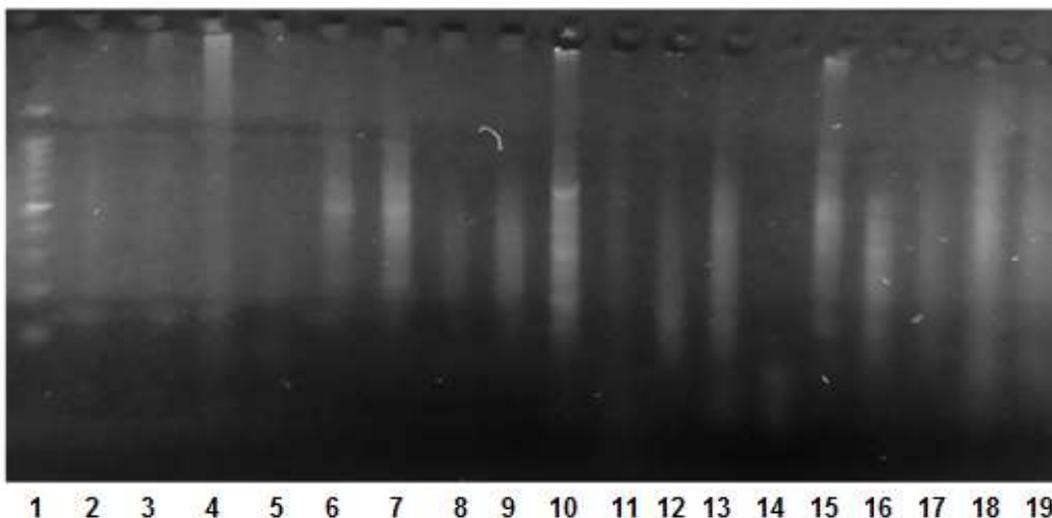


Figura 22. Productos de PCR.

Carril: 1) Marcador de DNA, 2) *Aspergillus niger*, 3) *Aspergillus niger*, 4) Cepa NTFV, 5) Cepa NTFV, 6) *Aspergillus flavus*, 7) *Aspergillus flavus*, 8) *Aspergillus flavus*, 9) *Aspergillus flavus*, 10) *Absidia aff. Corymbifera*, 11) *Absidia aff. corymbifera*, 12) Cepa POHCeB, 13) Cepa POHCeB, 14) Cepa POHCeBl, 15) Cepa POHCeBl, 16) Cepa POHCeFi, 17) Cepa POHCeFi 18) *Aspergillus fumigatus*, 19) *Aspergillus fumigatus*.

Debido a la diversidad de las categorías específicas de genes funcionales, que le confieren a los organismos la capacidad de degradar la celulosa es difícil que con tan pocos pares de primers pudiera existir alguna coincidencia. Diversos autores coinciden en que los mecanismos de acción para la producción de las celulasas son diferentes en cada organismo, ya que las familias de genes lignocelulolíticos fúngicos tienen historias evolutivas complejas, caracterizadas por múltiples eventos independientes de pérdida / adquisición de genes que afectan a copias homólogas y esto conduce a la presencia de una o varias copias, muy similares o divergentes, por genoma, dando paso a la existencia de varias familias de genes que codifican enzimas activas ante polímeros como la celulosa, la diferencia existente entre las secuencias codificantes para celulasas se encuentra hasta en organismos pertenecientes al mismo género (Barbi *et al.*, 2014; Habib-Onsori *et al.*, 2005; Irina *et a.*, 1999).

Debido a los resultados obtenidos es recomendable que en trabajos futuros se pueda complementar este tipo de estudio con otras herramientas, como el análisis de proteínas, mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); ya que mediante la secuenciación de cada una de las proteínas expresadas en el gel por cada aislado y con la verificación de dicha secuencia en la base de datos del Genbank, es posible identificar las diferencias existentes entre las secuencias y de ésta forma atribuir a un gen en específico la capacidad que le proporciona a cada hongo para degradar celulosa.

IX. CONCLUSIÓN

- Se aislaron siete cepas fúngicas de corteza de *P. hartwegii* en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, pero solo cinco tuvieron actividad celulolítica; de los cuales empleando técnicas convencionales dos cepas fueron identificadas como *A. flavus*, una como *A. niger* y una como *Absidia aff. corymbifera*.
- Se aislaron nueve cepas fúngicas de corteza de *P. hartwegii* en el Volcán Pico de Orizaba de las cuales solamente cuatro presentaron actividad celulolítica, con la caracterización por técnicas convencionales solo se identificó una cepa correspondiente a *A. fumigatus*.
- De los nueve hongos aislados de corteza de *P. hartwegii* que presentaron actividad celulolítica, los aislados *Aspergillus fumigatus* y la cepa POHCeFi del Volcán Pico de Orizaba fueron los que mostraron mayor actividad celulolítica, alcanzaron actividades de 0.61 y 0.784 mm/hrs respectivamente, los valores obtenidos por éstas cepas fueron mayores a los de *Aspergillus niger* del Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca, quien alcanzó 0.472 mm/hrs, siendo así el tercero con mayor actividad celulolítica.
- Las pruebas moleculares mediante el uso de PCR para la identificación de las enzimas celulolíticas para cada una de las cepas fúngicas aisladas no permitieron dicha identificación, ya que los primers usados no expresaron ninguna coincidencia con los hongos aislados.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M.L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17 (79-84).
- Alvarez-Castillo, A., Salgado-Delgado, R., García-Hernández, E., Domínguez-Domínguez, M.M., Granados-Baeza, M.M., Aguirre-Cruz, A., Carmona-García, R., Morales-Cepeda, A., Herrera-Franco, P.J., Licea-Claverie, A., Mendoza-Martínez, A.M. (2012). Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 140-150.
- Álvarez-Maciél, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63-89.
- Alcaide-Tur, A. (2012). Residuos sólidos urbanos, una consecuencia de la vida (tesis de licenciatura inédita). Universitat Jaume, España.
- Balat, M. (2010). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875.
- Barbi, F., Bragalini, C., Vallon, L., Prudent, E., Dubost, A., Fraissinet-Tachet, L., Marmeisse, R., Luis, P. (2014). PCR Primers to Study the Diversity of Expressed Fungal Genes Encoding Lignocellulolytic Enzymes in Soils Using High-Throughput Sequencing. *PLOS ONE*. 9(12): 1-22.
- Barnett, H., Hunter B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4ª ed. APS Press. St. Paul Minnesota.
- Bastawde, K.B. (1992). Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 45-49.
- Beilen J. B., Li Z. (2002) *Enzyme Technology: an overview*. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338-344.
- Beltrán-Gómez, A.C., Fonseca-Aldana, O. Y., y Guerrero-León, Y.R. (2007). Evaluación de la aplicación de la enzima pectinasa obtenida a partir de *Aspergillus niger*, en el proceso de producción de pulpa de arazá (*eugenia stipitata* sororia) concentrada al vacío. Tesis de Ingeniería. Universidad de la Salle. Bogotá.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
- Cano-Ruera S. (2006). *Métodos de Análisis Microbiológico*. Normas ISO, UNE. Analiza Calidad.

- Cañedo V., Ames T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- Castillo-Avila, G.N. (2010). Aislamiento de hongos lignocelulolíticos a partir de residuos agroindustriales de plátano (tesis de maestría inédita), Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.
- Castillo-Guerra, D.A., Viteri-Flórez, P.A., Viteri-Rosero, S.E. (2015). Desarrollo y evaluación de un inóculo de hongos celulolíticos. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 18(1), 217-226.
- Castillo-Tamayo, E.C. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica y enzimofuncional de hongos lignocelulolíticos 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 (tesis de licenciatura inédita), Escuela Politécnica del Ejercito. Sangolquí.
- Chaparro, D. y Rosas D. (2006). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso (tesis de pregrado)). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Collazos-Silva, L.A., Ortiz-Baca, R.S. (2014). Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, para la producción de etanol celulósico en Lambayeque, 2012. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- COLOR CODES. (2018). HTML Color Codes. En Línea. <https://html-color-codes.info/>
- Cortes Ortiz, W.G. (2011). Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. Ciencia y tecnología aeronáutica. (6), 41-46.
- Crawford, D.L. y McCoy, E. (1972). Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiasticus*. Applied microbiology. 24:1, 150-152.
- Cruz, N., Castellanos, D., Argüello, H. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 3 (2), 1-13.
- Edwards, I.P., Upchurch R.A., y Donald, R. Z. (2008). Isolation of Fungal Cellobiohydrolase I Genes from sporocarps and forest soils by PCR. Applied and environmental microbiology. 74 (11), 3481-3489.
- Espadas R. M., Zita-Padilla, M.A. (2003). Manual de Laboratorio de Micología Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- Friedmann, A., y Penne, R. (2009). Biocombustibles alternativa de negocios verdes. USAID. 1-79.
- Gaitan, D.M. y Pérez, L.I. (2007). "Aislamientos y evaluación de Microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*"). Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá-Colombia.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Hilda, A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*. 46:119–126
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30(1):33–39.
- Gutierrez, L.; Perez, J.; Uribe, M. (2012). Evaluación in vitro de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*. 1(1): 7-15.
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., Montoya D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*; 32(1):1–12.
- Habib-Onsori, H., Raza-Zamani, M., Motallebi, M., y Zarghami, N. (2005). Identification of over producer strain of endo-1,4glucanase in *Aspergillus* species: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. 4(1), 26-30.
- Hames, B.D., Rickwood, D. (1990). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 2nd ed., Oxford University Press, New York
- Hernández-Mansilla, A. A., Rosón-Álvarez, C. (2005). Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodis webber* en medios de cultivo convencionales. *Fitosanidad*. 9 (3); 61-63.
- Herrera-García, M. (2011). Capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza para degradar residuos lignocelulósicos (tesis doctoral inédita), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Henao, I.; Franco, M.; Marín, G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Scientarium*. 11(2): 52-60
- Howard R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12), 602-619.
- Index Fungorum. 2018. Search Index Fungorum. En línea: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>

- INEGI. Residuos Sólidos Urbanos. Censo Nacional de Gobiernos Municipales y Delegacionales 2013.
- Irina, K., Xin-Liang, L., Huizhong, Ch., Sang-Ki, CH., Lars, L. (1999). Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding celk, a major cellulosome component of clostridium thermocellum: evidence for gene duplication and recombination. Journal of bacteriology. 181 (17), 5288–5295.
- Karegoudar, T. B., Krishnan, T., Levin, R.E., y Netrusov, A. (2013). Screening of Fungi Isolated from Environmental Samples for Xylanase and Cellulase Production. ISRN Microbiology. 1-7.
- Lima-Rojas, L. (2013). Evaluación de la composición química y propiedades físicas de madera y corteza de cuatro coníferas para la producción de bioenergía (tesis de licenciatura inédita), Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, Nuevo León.
- López, D., López, M. O. (2004). Influencia del ph y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en cuba. Fitosanidad, 8 (3), 7-11.
- Llenque-Díaz, L.A., Muñoz-Ríos, M., Espejo-Vargas, E., y Moreno-Ruiz, A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. Ciencia y Tecnología. 11 (4); 39-49.
- Lynd, L.R, Weimer, P.J., Van, W.H., y Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology. 66(3), 506–577.
- Madamwar, D., y Patel, S. (1992). Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. World Journal. of Microbiology. and Biotechnology. 8, 183-186
- Mandels, M., y Reese E.T., (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, 73, 269-278.
- Marín-Alvarado, R.M. (2007). Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico (tesis de licenciatura inédita), Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Martínez, A. E., Chiocchio, V. M., y Godeas, A. M. (2001). *Hyphomycetes* celulolíticos en suelos de bosques de nothofagus, tierra del fuego. Gayana. Botánica, 58(2), 123-132.
- Martínez-Anaya. C., Balcázar-López. E., Dantán-González. E., Folch-Mallol. J.L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50 (3, 4), 119 – 131.

- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., y Rodríguez-Tudela, J.L. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. . *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 20(10):523-30.
- Montoya, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa* (tesis de maestría inédita), Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
- Moya, L.A. (2011). Determinación de la capacidad celulolítica in vitro de consorcios de hongos provenientes de suelo del bosque alto andino y tusas de palma de aceite (*Eleaeis quinensis Jacq*) en descomposición sobre dos sustratos: tusa y celulosa microcristalina (tesis de maestría inédita), Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá.
- Munero, P., Gonzalez, J., Pérez, C., Manso, M., y Díaz, F. (2005). Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de Hyphomycetes nativos de la provincia de Villa Clara. 32(3), 21-24.
- Murashima K, Kosugi A y Doi R. (2002). "Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*". *Journal Bacteriology*.
- Mycobank (2018). MYCOBANK Database. En Línea: <http://www.mycobank.org/>
- Nazir, A., Soni, R., Saini, H.S., Kaur, A., Chadha, B.S. (2010). Profiling differential expression of cellulases and metabolite footprints in *Aspergillus terreus*. *Appl Biochem Biotechnol*; 162:538–547.
- Oliva-Domínguez, J.M. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *kluyveromyces marxianus* (tesis doctoral inédita), Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Orellana Merino, M. A. (2014). Selección de hongos lignocelulolíticos para obtener jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir de bagazo de *Saccharum officinarum* L., "caña de azúcar", en lambayeque, 2013. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Peláez, A.; Meneses, M.; Miranda, L.; Magias, M.; Bárcena, R.; Loera, O. 2008. ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. *Archivos de zootecnia*. 57(217): 25-33
- Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal*. 1, 806-814
- Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas (tesis doctoral inédita), Universidad de Sevilla. Sevilla

- Reese, E.T., Siu, R.G., y Levinson H.S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. 59, 485-497
- Rubin, E.M. (2008) Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 4: 841-845.
- Saddler, J.N. (1982). Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme system. *Enzyme Microbiology Technology*. 4, 414-418.
- Salinas-Vaccaro, A.A. (2009). Identificación y clonación de nuevas celulasas para la producción de bioetanol de segunda generación (tesis de licenciatura inédita). Universidad de Chile. Chile.
- SEMARNAT (2012). Cuarta Comunicación Nacional de México ante la Convención de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. México.
- Scheller, H.V. y Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61, 263-289.
- Suesca-Díaz, A. (2012). Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica (tesis de maestría inédita), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1–11.
- Szczodrak, J.; Rogalski, J.; Ilczuk, Z. (1984). Cellulolytic activity of molds. Evaluation of the utility of cellulosic wastes for biosynthesis of cellulases and xylanase by *Aspergillus terreus* F-413. *Acta Microbiológica Polónica*. 33, 217.
- Tangarife-Morales, Y. (2016). Evaluación de la separación y purificación de lacasa a partir de *Fusarium* spp. para su aplicación en materiales lignocelulósicos. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Teather R. M y Wood P.J. (1982). Use of Red-Polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*. 43(4), 777-780.
- Tomás-Pejó, E. (2010). Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso (tesis doctoral inédita), Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Unda, F., Agüero J., Farinas, M.C., Martínez-Martínez L. (2011). Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(4):282–285
- Vaca-Proaño, M.C. (2011). Estudio cinético de la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y lignolítica a partir del hongo *Pleurotus Ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz (tesis de maestría inédita), Escuela Politécnica Nacional.

- Valencia-Guerrero, M.F., Quevedo-Hidalgo, B., Franco-Correa, M., Díez-Ortega, H., Parra-Giraldo, C.M., Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 16 (2): 147-159.
- Vásquez-Vanegas, A. M. (2013). Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Universidad Iberoamericana. México.
- Zhang, H.Y. y Lynd, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88 (7), 797-779.

XI. ANEXOS

ANEXO I. Propiedades de los oligonucleótidos.

Primers	% CG	T° de fusión (°C)	T° Alineamiento
EngA (5-GCT GGT TCC GCG TTG GCT GTG C-3) EngAR (5-GCA TCT GCG ACC CCA CCC CCT AGT T-3)	68.18% 64.00%	78.5 77.3	63.5
CbhT (5-ACT CTA CCT ACC CGA CGG AC-3) CbhTR (5-CGA GCA TTC CAG CAA AGG TG-3)	60 55	62 68	52.6
ExgP (5-AACCCTTATCGCATGGGCAA-3) ExgPR (5-TGCCACTTGTCTACAGGCAC-3)	50 55	68.3 64	52.8
Eng7F (5-CAGGATGGTGGTAAGAGCACGAG-3) Eng7FR (5-CCACAAGGAAGCTTCTCCATCTC-3)	56.52 52.17	68.9 67.2	53.7

ANEXO II. Medidas de las estructuras microscópicas de las cepas fúngicas con actividad celulolítica aisladas

➤ Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca

NTNvr (<i>Aspergillus flavus</i>)							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Vesícula	22	13.13	38.670	52.6	21.91	38.873	55.1
Conidios	10	4.01	4.204	4.77	3.82	4.341	4.89
Conidióforo	19	559.7	988.3263	1346.4	7.9	11.211	16.3
Masa de Esporas	16	61	105.243	200.3	51.3	98.635	228.3
Fiálides Uniseriadas	17	6.2	7.5	8.6	2.5	3.4252	4.5
Fiálides biseriadas	10	7.4	8.24	9.4	3.5	4.08	4.4

NTHAB (<i>Aspergillus flavus</i>)							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Vesícula	12	25.4	31.7916	41.8	22.9	30.9416	44.6
Conidióforo	12	628.6	884.85	1263	6.4	12.18333	19
Conidios	13	3.5	4.053846	4.5	3.7	4.0538461	4.5
Fiálides uniseriadas	14	7	7.4642857	9.5	2.3	3.24285	3.7

NTHABI (<i>Aspergillus niger</i>)							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Vesícula	4	42.6	52.575	61.3	47.8	52.525	56.3
Conidióforo	9	580.3	1045.37	1759.3	15	16.1	17
Conidios	14	3.5	4.03571	4.7	3.7	4.0642	4.3
Fiálides P.	10	9.3	17.81818	20.8	5.7	6.16	6.9
Fiálides S.	10	Min=6.9 P= 8.4 Max= 10.2					

NTNn (<i>Absidia aff. corymbifera</i>)						
	Largo			Ancho		
	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Esporangios	12.12	22.322	41.16	10.94	21.89	41.31
Esporangióforo	46.52	153.799	381.97	4.7	9.7328	16.26
Esporangiosporas	3.54	4.357	5.09	3.52	4.655	5.87
Micelio	Promedio=9.033					

NTFV							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Clamidosporas	15	3.71	6.71533333	7.96	2.17	5.84933333	7.59
Conidios	10	3.4	3.729	4.53	2.15	2.303	2.49
Micelio	12	Promedio=2.81833333					

➤ **Volcán Pico de Orizaba**

POHCeVr (<i>Aspergillus fumigatus</i>)							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Vesícula	13	12.8	19.0307692	26.6	11.2	16.6784	19.1
Conidióforo	13	111.6	197.123077	272.6	6.1	6.907692	7.8
Conidios	10	2.02	2.39	2.68	1.75	2.182	2.76
Fiálides	21	5.2	6.23	7	2.1	2.146153	2.9

POHCeB							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Clamidosporas	5	6.3	7.842	9.71	6.1	7.458	9
Micelio	11	Promedio=2.12					

POHCeFi							
	n	Largo			Ancho		
		Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo
Clamidosporas	7	6.59	7.97714286	9.23	6.25	7.54428571	9.55
Micelio	14	Promedio=3.24857143					