

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Aislamiento de hongos filamentosos con actividades
ligninolíticas en Calamagrostis nitidula Pilger**

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo.

AUTOR

Janet Laura Huanaco

ASESOR

Pedro Castellanos Sánchez

Lima – Perú

2008

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no hubiese sido realizado sin las personas que se mencionan a continuación, quienes con su conocimientos, apoyo y paciencia hicieron posible esta tesis.

Agradezco al Dr. Juan Sabatier Cadalso, por su alto grado de conocimiento en el tema de la lignina.

A mi asesor Ph. D. Pedro Castellanos Sánchez por su conocimiento y dedicación, por haberme inculcado el deseo de seguir investigando.

Al Dr. Oscar Tovar y la Magíster Maria Isabel La Torre, quienes me ayudaron en la identificación del material botánico y me brindaron el apoyo necesario para aprender sobre las gramíneas en el Herbario San Marcos.

Al profesor Enrique Escobar Guzmán por brindarme su apoyo en la utilización del espectrofotómetro.

A Dios, por no haberme dejado nunca en los momentos difíciles, y por las oportunidades que siempre me da.

A Renzo Quiroz B. quien me acompaña en todo momento y quien prestó apoyo e incentivo a que culmine este trabajo.

A mis amistades y colegas: Rony Velasco A., Mirella Mendoza, Nilda Castro A., Marina Vargas, Nancy Lucas A. quienes siempre me apoyaron sean con sus consejos y alegría en el transcurso de la tesis.

A los profesores miembros del jurado: Magda Chanco, Patricia Woll y Carmen Mendez, por las correcciones y asesoramiento en la redacción y elaboración de esta Tesis.

Finalmente mi agradecimiento a la Lic. Irene Napanga - Clínica Universitaria de la UNMSM, al personal administrativo y empleados de la Facultad de Ciencias Biológicas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Material y Métodos	7
IV. Resultados	14
V. Discusión	22
VI. Conclusiones	26
VII. Recomendaciones	27
VIII. Referencias bibliográficas	28
IX. Anexo	
Tablas	34
Figuras	37
Clave de identificación para <i>Aspergillus melleus</i> Yukawa	47

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de hongos filamentosos en una planta forrajera del país *Calamagrostis nitidula* Pilger, hierba anual que pertenece a la familia Poaceae. Las Poaceas presentan un 14 % de lignina, este polímero tiene un alto grado de resistencia al ataque microbiano y es considerado un componente anti-calidad por su impacto negativo en la disponibilidad nutricional de la planta, debido a que la lignina disminuye la accesibilidad de los polisacáridos estructurales y otros componentes de la pared celular. El aislamiento de los hongos se realizó en medio mínimo Czapeck teniendo a la lignina como única fuente de carbono en un 0.2% estos caldos fueron inoculados con fracciones de *Calamagrostis nitidula* Pilger, posteriormente estos hongos fueron aislados en Agar papa dextrosa (APD) e identificados según sus características morfológicas y microscópicas. Se aislaron e identificaron los siguientes géneros: *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Helicomyces*, *Mucor* y *Aspergillus*, este último fue identificado como *Aspergillus melleus* Yukawa y resultó ser la única cepa capaz de degradar la lignina. Se determinó cualitativamente y cuantitativamente la capacidad de degradación de la lignina inoculando cada cepa en tubos con caldo Czapeck, con 0.2% lignina y 1% glucosa, la coloración inicial de este caldo fue de color café, al cabo de 7 días se leyó al espectrofotómetro en una longitud de onda de 560 nm. De todas las cepas fúngicas aisladas únicamente la cepa PD5F identificada como *Aspergillus melleus* Yukawa fue capaz de virar el medio del color café a amarillo (prueba cualitativa) degradando un 80 % de la lignina (prueba cuantitativa).

ABSTRACT

Fungi were isolated from a forage grass *Calamagrostis nitidula* Pilger, an annual plant belonging to the Poaceae family. Members of the Poaceae family have 14 per cent of lignin, a polymer highly resistant to the microbial attack, and considered as an anti-quality component by its negative impact to the nutritional readiness. Lignin diminishes the accessibility to the structural polysaccharides and other components of the cell wall. The isolation of the fungi was carried out in Czapeck minimum medium; containing 0.2 % lignin as the only carbon source, these broths were inoculated with fractions of *Calamagrostis nitidula* Pilger. Then fungi were isolated in the culture medium APD and identified according to their morphological and microscopic characteristics. The following genus were isolated and identified: *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Helicomyces* *Mucor* and *Aspergillus*. The last one was identified as *Aspergillus melleus* Yukawa because was able to degrade the lignin. The capacity of lignin degradation was determined qualitatively and quantitative inoculating each strain in test tubes containing Czapeck broth, lignin 0.2% and glucose to 1%, the starting color of this broth was brown, after 15 days, it was read to the spectrophotometer at 560 nm. Of all the strains isolated, only the strain PD5F identified as *Aspergillus melleus* Yukawa was able to turn the medium starting color (brown) to yellow (qualitative test), degrading 80% of the lignin (quantitative test).

INTRODUCCIÓN

La pared celular de los tejidos vegetales está conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; estos componentes son atacados por hongos que poseen la capacidad enzimática para degradarlos; dependiendo de cómo se realice el ataque se distinguen dos grupos fúngicos: los que ocasionan la podredumbre parda (degradación de celulosa y hemicelulosa) y los que ocasionan la podredumbre blanca (degradación de lignina) (Olvera, 2003). Los hongos con actividades ligninolíticas se vienen estudiando desde hace dos décadas en “pajas”, como las de trigo, la cascarilla de arroz y en madera (Steffen et al, 2002), porque la lignina es un polímero complejo que tiene alto grado de resistencia al ataque microbiano y es considerado como un componente anti-calidad; por su impacto negativo en la disponibilidad nutricional de la fibra de la planta (Moore y Jung, 2001).

El Perú cuenta con una diversidad de pastizales silvestres nativos (pastos forrajeros) pertenecientes a la familia Poaceae (gramíneas) que crecen en altitudes por encima de 3500-3800 msnm, sobre todo en la región alto andina; entre los cuales, los llamados “pajonales” ocupan áreas extensas y están formados por especies de los géneros *Stipa*, *Festuca* y *Calamagrostis*. Estas comunidades de plantas son las únicas fuentes de alimento para la ganadería de las zonas alto andinas teniendo un bajo valor nutritivo (5% de proteína y 35.4 % de fibra cruda) y baja digestibilidad debido a la lignina. (Choque y Sotomayor, 1989, Tovar, 1993; Didier et al, 1994); es por este motivo que se seleccionó para el trabajo a *Calamagrostis nitidula* Pilger.

El estudio de la biodegradación de la lignina en esta especie silvestre sería muy ventajoso a largo plazo en nuestro país, porque permitiría aprovechar los contenidos celulares atrapados por la lignificación de la planta, aumentando la digestibilidad de este forraje para la ganadería de la región alto andina (Fondevila, 1998); ya que en la actualidad los rumiantes, dependientes exclusivamente de las plantas en el libre pastoreo, obtienen solo un 30 % de la energía digestible consumida de la pared celular del forraje (Didier et al, 1994; Ramírez et al, 2002).

En nuestro país no hay información sobre la microbiota que participa en la degradación de la lignina; es por esto que el presente trabajo representa un primer aporte al estudio de los hongos ligninolíticos, donde se han aislado 12 géneros de hongos filamentosos a partir de *Calamagrostis nitidula* Pilger, evaluándose también la capacidad de degradar el polímero de la lignina para cada cepa, y obteniendo como resultado una cepa con actividades ligninolíticas la cual ha sido identificada como *Aspergillus melleus* Yukawa, hongo de los forraje.

II. ANTECEDENTES

La lignina es un polímero natural amorfo que actúa como agente aglutinante entre los componentes del vegetal y está constituido por unidades del tipo p-hidroxifenil propano. La lignina se origina por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes parahidroxicinámicos. Las maderas suaves o gimnospermas están constituidas fundamentalmente por unidades guayacílica (G), mientras que las maderas duras (angiospermas dicotiledóneas) por unidades guayacílica (G) y siringílica (S) y las plantas anuales (angiospermas monocotiledóneas) tienen los tres precursores: guayacílica (G), siringílica (S) y p-hidroxibencílica (H) (Sabatier, 1992). La lignina es el segundo constituyente en peso (15-30%) y en importancia del reino vegetal (Sabatier, 1992, Mäkelä et al, 2002).

La lignina químicamente es heterogénea y tiene una estructura muy compleja. Los monómeros son todos derivados del fenilpropano y su complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. La diferencia en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi; por ejemplo: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (Olvera, 2003). Estudios previos muestran que de la degradación de los lignocelulósicos se obtienen compuestos fenólicos como ácidos cumáricos, sinápico y cafeicos, estos compuestos son monómeros de la molécula de la lignina (Loborzewski y Paszczyński, 1985).

Los hongos que tienen sistemas ligninolíticos pertenecen principalmente a la clase de los Basidiomycetes y son llamados hongos de la podredumbre blanca, entre los cuales hay especies saprófitas (Steffen et al, 2002; Olvera,

2003). Además, existen Ascomycetes que han sido estudiados en la degradación de la lignina como *Fusarium oxysporum* (Valenzuela et al, 2001), *Penicillium sp.* y sobre todo el género *Aspergillus* (Prado et al, 1993; Cardoso y Costa, 1994; Valenzuela et al, 2001; Ahammed y Prema, 2002) entre ellos, las especies de *A. niger* (Conesa et al, 1999; Marquez et al, 2007), *A. flavus* (Betts y Dart, 1989), *A. japonicus* (Milstein et al, 1983) y *A. fumigatus* (Kadam y Drew, 1985). También se han registrado hongos levaduriformes con la capacidad de degradar lignina, como *Candida sake*, *Cryptomyces laurentii*, *Rhodotorula glutinis* (Olvera, 2003).

Los hongos descomponedores de paja son un grupo ecológicamente importante de microorganismos involucrados en el reciclamiento del carbono en los suelos y su hábitat es la parte superior de los suelos en bosques y prados, que son ricos en materia orgánica como la celulosa, hemicelulosa y lignina provenientes de plantas muertas (hojas y ramas). La biodegradación de la lignina es un paso clave para el reciclamiento de carbono en los ecosistemas terrestres, donde los basidiomicetes degradan los polímeros de la madera facilitando la utilización de la celulosa por poblaciones microbiales. El objetivo del estudio de la capacidad que presentan estos hongos para degradar lignina es reducir el costo de energía y químicos; y/o disminuir el impacto medioambiental en la manufactura de pulpeo de papel con el propósito de desarrollar alternativas biotecnológicas para un medioambiente sano (Martinez, 2002).

La degradación de la lignina es de naturaleza oxidativa y es realizada por un conjunto de enzimas agrupadas conocidas como enzimas ligninolíticas o peroxidasas ligninolíticas, quienes catalizan la oxidación del peróxido de hidrógeno (este proceso a sido identificado como una reacción clave en el

proceso degradativo de la lignina). Entre estas peroxidases tenemos tres tipos de enzimas: lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Kawai et al, 2002; Koroleva et al, 2002; Mäkelä et al, 2002; Polanco et al, 2002). Estas enzimas pueden actuar individualmente o sinérgicamente aumentando la degradación de la lignina. (Koroleva et al, 2002). La MnP y la lacasa (isoenzimas) varían de acuerdo a la composición del medio de crecimiento y la concentración de los sustratos: sin manganeso no se detecta la actividad de la MnP, y en medios de cultivo sin cobre la cantidad de lacasa es insignificante (Polanco et al, 2002). La enzima MnP es una de las principales oxidorreductores involucradas en la degradación de lignina, es una proteína hemoglucosilada producida por casi todos los hongos que colonizan madera (Steffen et al, 2002). La lacasa utiliza el oxígeno como aceptor de electrones para liberar el hidrógeno de los grupos hidroxilos de las sustancias fenólicas; sin embargo, la lacasa no puede individualmente oxidar las sustancias no fenólicas. La lignina esta formada por compuestos fenólicos (10-20%) y no fenólicos (80-90%). El rompimiento de los enlaces no fenólicos es necesario para que se degrade la lignina, en esto participa la LiP oxidando los enlaces no fenólicos de lignina, pero la LiP no puede ser detectada en muchos hongos ligninolíticos. (Kawai et al, 2002; Koroleva et al, 2002; Pérez et al, 2002).

La biodegradación de lignocelulosa es un proceso bioquímico complejo y todavía no está completamente estudiado. En los lignocelulósicos, la lignina protege a la celulosa y a la hemicelulosa contra la degradación enzimática de otros hongos o bacterias. Para la biotransformación de los lignocelulósicos se ha estudiado que la interacción de la celulasas, D-glucosa oxidasa y peroxidases fúngica intervienen en su biotransformación (Loborzewski y

Paszczynski, 1985). El modelo más común de ataque en hemicelulosas y celulosas es con una degradación simultánea de los polisacáridos y lignina, no obstante, en otros casos se ha observado una degradación selectiva de lignina. (Daina et al, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRA VEGETAL

Se procedió a recolectar dos tipos de muestras de *Calamagrostis nitidula* Pilger: muestra de paja erguida que consistió de hojas vivas de la planta colectada (PE) y muestra de paja descompuesta que consistió de hojas caídas en el suelo circundante de la planta colectada (PD). Esta colecta se realizó en la localidad de Ticlio ubicado en la provincia de Huarochiri del departamento de Lima a 4800 msnm. La recolección se realizó con bolsas de propietileno de primer uso e instrumentos estériles, luego las muestras fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.

3.1.2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA BOTÁNICA

El material biológico fue recolectado y se guardó en una prensa de madera entre secantes para su posterior traslado al Herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM (Cerrate, 1964). La etiquetación fue realizada una vez identificada. Para el estudio de las muestras se utilizó un estereoscopio con ocular micrométrico y siguiendo una clave dicotómica (Tovar, 1960, 1993), para esto se observaron las características de las hojas e inflorescencias y se realizaron las medidas correspondientes; además se observó al estereoscopio las espiguillas para el reconocimiento y la medición de glumas, lema, pálea, arista y la raquilla, realizándose los respectivos esquemas debido a que todos estos datos son importantes en la determinación de la especie.

3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS LIGNINOLÍTICOS

El aislamiento e identificación de los hongos ligninolíticos se realizó en el Laboratorio de Parasitología Humana y Animal y en el Laboratorio S20 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2.1. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS DE *Calamagrostis nitidula* Pilger

A. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y PRIMER AISLAMIENTO

Las muestras colectadas de *Calamagrostis nitidula* Pilger fueron procesadas en el laboratorio el mismo día de la colecta, la muestra se cortó en trozos pequeños y se sembró en medio líquido Czapeck teniendo a la lignina como única fuente de carbono 0.2% (Lignin álcali low sulfonate content, ALDRICH). El medio líquido Czapeck-Lignina fue llevado a un pH 5.5.

La muestra de paja erguida (PE) se sembró por triplicado y la muestra de paja descompuesta (PD) se sembró en 6 frascos. Estos frascos se incubaron en condiciones de laboratorio, a una temperatura de laboratorio de 25 °C y con una humedad relativa de 65 %, en condiciones estáticas y en oscuridad.

Los cultivos líquidos fueron evaluados durante 30 días. Una vez observado el crecimiento superficial y la producción de gas se tomó un inóculo de cada frasco y se sembró en placas petri conteniendo Agar Czapeck-Lignina al 0.2 %, a pH 5.5 por dos métodos: a) por estriado y b) puntura.

En este aislamiento los inóculos se sembraron en 18 placas con medio Czapeck-Lignina como sigue: a) de la muestra de paja erguida, seis placas petri con los códigos P1E, P1P, P2E, P2P, P3E, P3P; b) de la muestra de paja descompuesta, doce placas petri con los códigos PD1E, PD1P, PD2E, PD2P, PD3E, PD3P, PD4E, PD4P, PD5E, PD5P, PD6E, PD6P. Estas placas

se cultivaron a temperatura de laboratorio 25 °C y con una humedad relativa de 65 % y en la oscuridad. La humedad y la temperatura fueron controladas utilizando un termohigrómetro tomándose 3 medidas diarias: 8.a.m., 12 a.m. y 4 p.m. durante todo el experimento.

Las colonias aisladas que crecieron en el medio fueron codificadas según su origen con los códigos de PE (paja erguida); PD (paja en descomposición). Los números corresponden al número de repeticiones (3 repeticiones para PE y 6 repeticiones para PD) y las siglas de aislamiento corresponden a E (estriado) y P (puntura).

B. SEGUNDO AISLAMIENTO Y CEPARIO

Las colonias fúngicas que se observaron en el primer aislamiento se volvieron a sembrar en placas petri en un medio de agar Czapeck – Lignina al 0.2% para separar y purificar las cepas aisladas, en este caso si en una placa se encontraban más de una colonia se le añadió al código un número para su identificación.

Una vez aisladas las colonias se procedieron a sembrarlas en placas petri con un medio de Agar papa dextrosa (APD), se cultivó en condiciones ambientales, a temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 65 %, en oscuridad, observándose diariamente su crecimiento hasta los 20 días.

Los hongos cultivados en APD fueron resembrados repetidamente en APD hasta obtener un cepario sin bacterias y levaduras acompañantes.

3.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS AISLADOS DE LA PLANTA FORRAJERA

A. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

Las cepas fúngicas se sembraron en tubos con APD en plano inclinado, incubados a temperatura de laboratorio de 25 °C y con una humedad relativa de 65 % en oscuridad durante 20 días.

Luego se observaron las colonias fúngicas, anotándose y describiéndose detalles de textura, aspecto, superficie, color y tiempo de crecimiento.

B. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

Para la observación microscópica se utilizó la técnica de microcultivo en lámina, este método consistió:

En una placa petri estéril conteniendo una lámina portaobjeto y dos laminillas, se colocó un trozo de APD de 0.5 x 0.5 cm. y se depositó sobre la lámina portaobjeto, luego con el asa de siembra en ángulo recto se sembró en el centro de cada uno de los lados del agar. Posteriormente se cubrió con las laminillas y se colocó un trozo de algodón húmedo estéril. Los microcultivos se incubaron al medio ambiente por 7-14 días.

Una vez observado el crecimiento de los hongos en los microcultivos se realizó el montaje empleando el siguiente procedimiento:

Se levantó la laminilla con una pinza y se depositó sobre una lámina portaobjeto limpia donde se había colocado previamente una gota del colorante de azul de lactofenol, el exceso del colorante se quitó con papel toalla y se selló con esmalte de uñas. Las láminas fueron observadas al microscopio.

C. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS.

Para la descripción de la morfología macroscópica se observaron las características de las colonias (color, aspecto, superficie, textura y tamaño). En la descripción de las características microscópicas se observaron las estructuras vegetativas y reproductivas en el estereoscopio (BIOLOGICAL MICROSPORE, Labor-tech) y microscopio con ocular doble y ocular micrométrico de la marca Nikon. Para la identificación de género y especie se utilizaron manuales de identificación de hongos (Egorova, 1983)

3.3. PRUEBA DE LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA POR LOS HONGOS AISLADOS.

La prueba se realizó empleando el método espectrofotométrico (Spectronic 20 D, MILTON ROY COMPANY) a una longitud de onda de 560 nm para determinar como disminuía la concentración de la lignina conforme se degradaba dicho polímero (Olvera, 2003).

3.3.1. DISEÑO DE LA CURVA STANDARD DE LA CONCENTRACIÓN DE LA LIGNINA VS LA ABSORBANCIA.

Para la determinación de la curva standard se prepararon tres concentraciones de lignina (Lignin alcali low sulfonate content, ALDRICH) con los siguientes pesos: 0.1 g, 0.01 g y 0.001 g de lignina diluidos en 10 ml de caldo Czapeck (por triplicado). La muestra en blanco fue el caldo Czapeck sin lignina. Las concentraciones de lignina fueron: 0.01 g/mL; 0.001 g/mL; 0.0001 g/mL respectivamente, luego se procedió a esterilizar estos medios (esto se hizo porque al realizar las pruebas con los hongos, los medios deben estar necesariamente estériles), posteriormente se procedió a determinar la absorbancia mínima y máxima de la lignina a una longitud de onda de 560

nm, con la finalidad de determinar el rango de concentración de la lignina (g/ml) que no sature la lectura de la absorbancia.

Determinadas las concentraciones límites de absorbancia de lignina a 560 nm, se prepararon nuevamente 9 baterías con diferentes concentraciones. Las concentraciones fueron determinadas con los siguientes pesos 0.001g, 0.002 g, 0.006 g, 0.004 g, 0.008 g, 0.01 g, 0.012 g, 0.014 g, 0.02 g. de lignina diluidas en 10 ml de medio líquido Czapeck, obteniéndose las respectivas concentraciones de lignina: 0.0001 g/ml; 0.0002 g/ml; 0.0006 g/ml; 0.0004 g/ml; 0.0008 g/ml, 0.001g/ml, 0.0012 g/ml, 0.0014 g/ml, 0.002 g/ml. Estos medios fueron esterilizados. Luego se leyó en el espectrofotómetro a 560 nm. Con los valores obtenidos se diseñó la curva standard de la concentración de la lignina vs la absorbancia por el método estadístico de los mínimos cuadrados.

3.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE LA LIGNINA SOLUBLE.

Para la determinación del consumo de la lignina se utilizaron dos métodos: a) Método cualitativo y b) Método cuantitativo.

Las cepas aisladas se sembraron en el medio Czapeck con 0.002 g/mL de lignina y 3 blancos con medio Czapeck sin lignina ambos por triplicado. Las muestras fueron incubadas en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25 °C, humedad relativa de 65 % y con una agitación de 150 RPM en un agitador orbital (Model VRN-480, GEMMY ORBIL SHAKER) por 7 días.

A. MÉTODO CUALITATIVO DE LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA

Se procedió a evaluar diariamente el cambio de la coloración café de la lignina contenida en los matraces durante 30 días, porque cuando hay una degradación de la lignina, el color característico café cambia a color amarillo.

Al cabo de este tiempo se filtró en papel filtro de 4-7 micras (filtración lenta),

para retener las esporas, luego se hizo una centrifugación a 5300 por 30 minutos (CENTRIFUGE HERAUS SEPATECH, Labofuge 200) para separar el resto de micelio.

B. MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE LOS HONGOS.

De la muestra tratada con el método cualitativo, se tomó 10 mL del filtrado y se procede a medir la absorbancia de cada tubo, a 560 nm (Spectronic 20 D, MILTON ROY COMPANY). La concentración de la lignina se determinó mediante la gráfica de la curva de calibrado de la lignina. Con la absorbancia se puede determinar cuanto de peso soluble de lignina hay en el medio de cultivo y determinar la cantidad de lignina degradada por el hongo.

IV. RESULTADOS

4.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATERIAL BOTÁNICO

La clasificación taxonómica de la gramínea es la siguiente: (Sistema de clasificación de Cronquist. 1981)

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Sub familia: Pooideae

Genero: *Calamagrostis*

Especie: *C. nitidula* Pilger

4.1.1. CARACTERÍSTICAS DE *Calamagrostis nitidula* Pilger.

A. CARACTERÍSTICAS DE LAS HOJAS.

Los promedios de las hojas fueron de 28.5 cm. de alto x 3 mm a 1 mm de ancho, las hojas son erguidas, rígidas y ásperas al tacto; las vainas ásperas y la parte basal de la hoja es más corta que la parte superior; la lígula fue de 3 mm de largo de aspecto membranácea; las láminas son muy plegadas e involutas, éstas alcanzan la panícula o la sobrepasan en altura (Fig. 1 A).

B. CARACTERÍSTICAS DE LA INFLORESCENCIA.

La panícula o inflorescencia es muy densa y mide 11.5 cm. de largo. La espiguilla mide 7 mm. de largo y posee glumas ligeramente iguales, una de 6.6 mm. de largo x 1.5 mm. de ancho; algunas glumas presentan

pigmentación purpúrea; la lema mide 5.2 mm. de largo x 1.5 mm de ancho; la pálea mide 4.6 mm. de largo x 1 mm de ancho, la pálea es más pequeña que la lema. También presenta una raquilla muy pubescente y mide 5 mm de largo (Fig. 1 B y Fig. 2 A). Una característica importante es la presencia de una arista dorsal que nace aproximadamente de la mitad de la lema y mide 5.1 mm de largo, esta característica la diferencia del género *Stipa* que tienen una arista recta y nace del ápice de la lema. Finalmente se observan tres estambres de 2 mm de largo (Fig. 2 B).

4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS LIGNINOLÍTICOS.

4.2.1 AISLAMIENTO PRIMARIO.

En los cultivos líquidos: a) muestras con Paja erguida - PE y b) muestras con Paja descompuesta - PD; se observaron crecimiento superficial de color blanco, turbidez y producción de gas al cabo de una semana.

En las placas petri con medio Czapeck-lignina al 0.2% se observaron crecimiento excepto en las placas PD2P y PD4P esto es debido a que probablemente el método por puntura no era el adecuado. En el método de estriado se obtuvieron mejores aislamientos de las colonias. Se evaluó el crecimiento de colonias durante 30 días y en cada placa petri se observó más de una colonia levaduriformes de diferentes tamaños, coloración y algunas presentaban aspectos filamentosos. De este primer aislamiento se obtuvieron 27 colonias levaduriforme (algunas cepas presentaron muy ligeras vellosidades) las cuales se obtuvieron de la siguiente manera:

- De la placa PD1E, se obtuvieron dos tipos de colonias **PD1F** y **PD1C**, las siglas F y C significan filamentosos y cremosos respectivamente.

- De la placa PD1P, la colonia levaduriforme **PD1P**.
- De la placa PD2E, las colonias **PD2E1**, **PD2E2** y **PD2E3**, todas levaduriformes, los números corresponden a la secuencia de colonias.
- De la placa PD3E, las colonias levaduriformes **PD321** y **PD322**, en esta placa se hicieron reaislamientos porque inicialmente crecieron muy juntas, es por esto que tienen esta codificación para diferenciarlas.
- De la placa PD3P, las colonias levaduriformes **PD3** y **PD3S**, se le adicionó el código S para diferenciarla de las cepas de la placa PD3E.
- De la placa PD4E, las colonias levaduriformes **PD4E1** y **PD4E2**.
- De la placa PD5E, las colonias levaduriformes **PD5F** y **PD5C**. Las siglas F y C corresponden a filamentoso y cremoso respectivamente.
- De la placa PD5P, la colonia levaduriforme **PD5P**.
- De la placa PD6E, las colonias levaduriformes **PD6F** y **PD6C**. Las siglas F y C corresponden a filamentoso y cremoso respectivamente.
- De la placa PD6P, la colonia levaduriforme **PD6P**.
- De la placa P1E, la colonia levaduriforme **P1E**.
- De la placa P1P, la colonia levaduriforme **P1P**.
- De la placa P2E las colonias levaduriformes **P2F** y **P2C**. Las siglas F y C corresponden a filamentoso y cremoso respectivamente.
- De la placa P2P, la colonia levaduriforme **P2P**.
- De la placa P3E, las colonias levaduriformes **P3E**, **P3E1**, **P3C**
- De la placa P3P, la colonia levaduriforme **P3P**.

Hay que recalcar que el medio es limitante en nutrientes por eso no se observaron abundancia de colonias.

4.2.2. SEGUNDO AISLAMIENTO.

Las 27 colonias levaduriformes del primer aislamiento se sembraron nuevamente en Medio Czapeck-Lignina al 0.2% y se observó su morfología en medio APD.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) 15 colonias de las cuales 4 eran levaduras (P1E, P1P, P2P, P3E1) y 11 eran bacterias acompañantes (PD1C, PD1P, PD2E1, PD2E2, PD2E3, PD4E1, PD4E2, PD5C, PD5P, PD6P, y P3P).
- b) 12 cepas (PD1F, PD321, PD322, PD3, PD3S, PD5F, PD6F, PD6C, P2F, P2C, P3E1, P3C) que mostraron la morfología característica de hongos filamentosos.

4.2.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS OBTENIDAS

Se aislaron 12 cepas de hongos filamentosos tanto en hoja erguida como hoja descompuesta:

- a) En muestra de paja erguida se aislaron los siguientes géneros: *Alternaria* (cepas **P2C** y **P3C**); *Ulocladium* (cepa **P2F**); y *Trichoderma* (cepa **P3E**).
- b) En muestra de paja descompuesta se aislaron los siguientes géneros: *Aspergillus* (cepa **PD5F**); *Cephalosporium* (cepas **PD3**, **PD3S**, **PD6C** y **PD6F**); *Trichoderma* (cepas **PD322**); *Helicomyces* (cepas **PD321**); *Mucor* (cepa **PD1F**).

Para la prueba de degradación de Lignina sólo se trabajó con 12 cepas que fueron aisladas de diferentes fuentes de muestra

- PD1F *Mucor*
- PD321 *Helicomyces*
- PD322 *Trichoderma*
- PD3S *Cephalosporium* 1

- PD3 *Cephalosporium* 2
- PD5F *Aspergillus*
- PD6C *Cephalosporium* 3
- PD6F *Cephalosporium* 4
- P2C *Alternaria* 1
- P2F *Ulocladium*
- P3E *Trichoderma*
- P3C *Alternaria* 2

Todas estas 12 cepas filamentosas fueron colonias levaduriformes en el medio Czapeck – Lignina y al sembrarlas en APD tomaron las características propias filamentosas según el género de los hongos.

Las cepas filamentosas se encuentran entre las clases de los Deuteromycetes, Ascomycetes y Zigomycetes.

A. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS.

La morfología de las cepas obtenidas se describe según el siguiente orden:

La cepa **P2F** pertenece al género *Ulocladium*, presentó colonias de color negro petróleo, aspecto pulverulento, superficie plana, textura aterciopelada, vista al microscopio presenta micelio septado y demateáceos; conidias redondeadas, simpodiales, oscuras y dictiosporadas (Fig. 3 A-B).

Las cepas **P3C** y **P2C** pertenecen al género *Alternaria* y presentaron colonias de aspecto algodonoso, color plomizo a negro, superficie elevada, textura lanosa y con adherencia al vidrio de la placa petri. Vista al microscopio se observaron micelios septados demateáceos, conidias dictiosporadas, alargadas, de color marrón oscuras con el extremo final ancho a otro extremo aguzado (Fig. 3 C-D y Fig. 4).

Las cepas **P3E** y **PD322** pertenecen al género *Trichoderma* y presentaron colonias de aspecto pulverulento, forma anular, color verde y con adherencia al vidrio de la placa, superficie lisa. Vista al microscopio presentan conidias en racimos y hay presencia de clamidosporas, las fiálides son cortas y nacen en ángulos delgados de las hifas que llevan racimos dípticos a las conidias (Fig.5).

La cepa **PD1F** pertenece al género *Mucor* y presenta colonias de aspecto algodonoso, color amarillo, superficie elevada y textura vellosa. Vistas al microscopio presenta micelio cenocítico con esporangios y esporangiosporas (Fig. 6 A-B).

Las cepas **PD3** y **PD3S** pertenecen al género *Cephalosporium* y presentan colonias de aspecto algodonoso, color blanco, superficie elevada y textura vellosa. Vista al microscopio presentaron micelio septado hialino delgado con fiálides muy delicadas que sostienen una cabezuela o masa globular en apariencia conteniendo grupos de conidias alargadas y didimosporados (Fig. 6 C-D y Fig. 7 A-B).

La cepa **PD5F** pertenece al género *Aspergillus* presentó colonias blancas con centro amarillo de aspecto radiado, textura vellosa. Vista al microscopio presentó conidióforo no septado con vesícula aspergilar grande, métulas y fiálides (Fig. 7 C-D).

La cepa **PD321** pertenece al género *Helicomyces* y presenta colonias de aspecto algodonoso, superficie elevada, color anaranjado. La cepa PD321 presenta micelios con hifas septadas, espiraladas y conidias espiraladas muy apretados (Fig. 8).

Las cepas **PD6C** y **PD6F** también pertenecen al género *Cephalosporium* y presentaron colonias de aspecto plegado, color rosado a púrpura, superficie

plano, textura plumosa. Vista al microscopio presentan micelios septados, hialinos, con conidias didimosporados (Fig. 9 A-D).

4.3. PRUEBA DE LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA POR LOS HONGOS AISLADOS.

4.3.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA LIGNINA.

De acuerdo al método de los mínimos cuadrados, la curva de calibración de la lignina obtuvo un índice de correlación $R^2 = 0.9982$ (Fig. 10) y tiende a ser una línea perfecta cumpliéndose de esta manera la ley de Lambert-Beer (Tabla 1).

4.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE LA LIGNINA SOLUBLE.

La degradación de la lignina se determinó a partir de un inóculo de cada una de las 12 cepas de hongos en el medio mínimo Czapeck con glucosa al 1% y lignina al 0.2%. Después de los 7 días de crecimiento se evidenció de manera cualitativa que la cepa PD5F era la única que degradaba la lignina, debido a que el medio que inicialmente era de un color café pasó a un color amarillo, siendo la única cepa capaz de degradar la lignina (Fig. 11). También se realizó un cultivo estático con las mismas condiciones antes mencionadas, pero en este sistema, al cabo de 15 días se pudo observar un cambio de coloración en la cepa PD5F. De manera cuantitativa se determinó que la cepa PD5F degradaba lignina dando una absorbancia final de 0.118 con respecto al blanco 0.631, lo cual indica que de una concentración inicial de 0.002 g/ml al cabo de 15 días solo quedaba 0.0004 g/mL. El resto de las cepas no evidenció cambio en la coloración del caldo de cultivo, pero si se observó crecimiento, de todas maneras al realizar la determinación cuantitativa se observa un incremento de la absorbancia en relación al blanco 0.631, esto se

debe a que los hongos han producido pigmentaciones en el medio de cultivo, alterando la lectura del espectrofotómetro (Fig. 12 y Tabla 2).

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA PD5F CON ACTIVIDADES LIGNINOLITICAS.

La cepa PD5F fue identificada hasta especie como *Aspergillus melleus* Yukawa (Egorova, 1986). Este hongo presenta la siguiente clasificación taxonómica.

División: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Genero: *Aspergillus*

Especie: *A. melleus* Yukawa

4.4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE LA COLONIA *Aspergillus melleus* Yukawa.

La colonia PD5F identificada como *Aspergillus melleus* Yukawa tiene abundante micelio semejante a césped, numerosas vesículas conidiales dorada-amarillentas. El lado reverso es rojo - castaño. La vesícula aspergilar es esférica de 140.8 micras de diámetro y tiende a elongarse en forma de columnas. La vesícula tiene un promedio de 53.5 micras de diámetro. Las hifas vegetativas son hialinas y septadas. El conidióforo es amarillo y rugoso, lleva mótulas y fiálides con conidias de paredes lisas de 1.92 -2.4 micras (Fig. 13-17).

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aisló a *Aspergillus melleus* Yukawa de *Calamagrostis nitidula* Pilger. Inicialmente se aislaron 12 cepas identificándose los siguientes hongos: *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cephalosporium*, *Helicomyces*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mucor*, de los cuales solo el género *Aspergillus* fue capaz de degradar lignina y por lo tanto se determinó su nombre específico: *Aspergillus melleus* Yukawa. Es de aclarar que todos estos hongos son propios de forrajes.

Se aisló hongos de *Calamagrostis nitidula* Pilger, un forraje abundante y propio de los andes peruanos cuyo porcentaje de digestibilidad en las gramíneas es de 27.4% (Combellas et al, 1971), debido a que en el estudio del aislamiento de hongos que degradan lignina en otros países, se han realizado en paja de trigo, cascarilla de arroz, capa de paja del suelo circundante, (Zadrazil, 1982; Agosin y Odier, 1985; Jung, 1996).

Se realizó un primer estudio, utilizando medio mínimo Czapeck con lignina (0.2%) como única fuente de carbono y se observa que los hongos tienen un crecimiento mínimo, liberación de gas y no presenta ningún cambio evidencial del color en el caldo. En el primer aislamiento se obtuvieron 27 colonias, en el segundo aislamiento se seleccionaron 12 colonias filamentosas el resto de colonias fueron levaduras y bacterias acompañantes. Se observó que las colonias de todos los hongos filamentosos presentaron colonias levaduriformes en el medio Czapeck y en el medio Agar Papa Dextrosa (APD) recién aparecen las características filamentosas de los hongos debido a que estos hongos presentan dimorfismo.

Para realizar la prueba espectrofotométrica se realizó el mismo cultivo utilizado en el aislamiento, es decir, medio mínimo Czapeck y lignina al 0.2 %, pero no se obtuvo un adecuado crecimiento ni variación de coloración, por lo tanto al medio utilizado se le añadió glucosa al 1%, porque la degradación de la lignina se da con el consumo previo de la glucosa según los trabajos realizados por Lobarzewski y Paszczynski (1985) y Olvera (2003)

De todos los hongos filamentosos aislados únicamente *Aspergillus melleus* Yukawa cambió la coloración de la lignina en medio agitado a 150 RPM al cabo de 7 días, en condiciones estáticas también se evidencia la degradación de lignina de este hongo pero el cambio de coloración es 15 días. La diferencia en el tiempo del cambio de coloración se debe a que el proceso degradativo de la lignina es netamente oxidativo, porque para la degradación de la lignina es necesario la presencia de oxígeno (Olvera, 2003). La lignina tiene un color café debido a grupos cromóforos fuertemente unidos a la molécula de la lignina para que se reduzca este color es necesario la presencia de oxígeno y peróxido de hidrógeno, el proceso oxidativo causa ruptura en los enlaces insaturados carbono-carbono de las cadenas propanoides de la lignina destruyendo algunos grupos cromóforos (Lin, 1980). Se deduce que frente a una buena aireación, presencia de oxígeno y con las dosis adecuadas de glucosa se realiza una degradación de la lignina al cabo de 7 días previo consumo de la glucosa y según la bibliografía nos indica que las enzimas son expresadas durante la fase secundaria de crecimiento (idiofase) cuando la limitación de carbono, nitrógeno y sulfuro ocurre (Staszczak, 2002).

Estos hongos no pueden utilizar directamente lignina como su fuente de carbono y energía por ello dependen de azúcares más digeribles como los monómeros precursores de fenilpropano. La función primaria de la ligninólisis es exponer estos monómeros al ataque del hongo con ayuda de diferentes tipos de enzimas. En la mayoría de los hongos se ha visto que la lignólisis ocurre durante el metabolismo secundario, es decir bajo limitación de nutrientes, lo que permite que el hongo solo sintetice y secrete agente ligninolíticos que comiencen a fragmentar el polímero. (Lobarzewski y Paszczynski, 1985; Olvera, 2003).

La cepa *A. melleus* (PD5F) fue capaz de degradar la lignina debido a que fue la única cepa que cambió el color del medio Czapeck inicialmente café a amarillo, las demás cepas no demostraron este cambio, pese a esto se realizó la medición en el espectrofotómetro a todas las cepas aisladas en el cual se demostró cualitativamente que solo *Aspergillus melleus* Yukawa, degradó en un 80% la lignina del medio. Los demás hongos mostraron crecimiento muy notable en los medios Czapeck Lignina con glucosa al 1%, esto se debió al consumo preferencial de la glucosa y en consecuencia no tendría el potencial enzimático adecuada para transformar la lignina al cabo de un mes en condiciones estáticas y al cabo de 15 días en condiciones agitadas de 150 RPM. Al momento de leer al espectrofotómetro se presentó un aumento de la absorbancia inicial de algunas cepas, esto se explica debido a que los hongos aislados presentaron pigmentación en el medio debido al crecimiento variando la absorbancia.

Estudios anteriores en los hongos que tienen sistemas ligninolíticos pertenecen en su mayoría a la división de los basidiomicetos (Steffen et al,

2002), también se han reportado levaduras con la capacidad de degradar lignina (Olvera, 2003).

La especie aislada en nuestro trabajo, *Aspergillus melleus* Yukawa, es un hongo ligninolítico pertenece a la división de los Ascomycetes. Las investigaciones realizadas nos dicen que las especies del genero *Aspergillus* han sido estudiados como microorganismos vectores de genes recombinantes que codifican enzimas ligninolíticas como lacasa, así tenemos a *A. niger* (Marquez et al, 2007), sin embargo, hay estudios que muestran la amplia capacidad del género *Aspergillus* para degradar este polímero (Prado et al, 1993; Cardoso y Costa, 1994; Valenzuela et al, 2001; Ahammed y Prema, 2002) como por ejemplo *A. flavus* (Betts y Dart, 1989) *A. japonicus* (Milstein et al, 1983) *A. niger* (Conesa et al, 1999) y *A. fumigatus* (Kadam y Drew, 1985).

Aspergillus melleus Yukawa hongo ligninolítico aislado de *Calamagrostis nitidula* Pilger, según Semeniuk et al (1971); Palumbo et al (2007); Ondeyka et al (2003); Luisetti et al, (1991) y Miyazawa et al (2002) es un hongo productor de micotoxinas y de enzimas tales como proteasas, esterases, mas no hay registros de su actividad ligninolítica en la literatura, en este trabajo se ha demostrado su capacidad en la degradación de la lignina.

Por otro lado, nuestro medio empleado Czapeck-Lignina tenía elementos químicos como nitrógeno, sodio, potasio, cloro, fosfatos, sulfatos, magnesio y Hierro, pese a esto *Aspergillus melleus* fue capaz de degradar la lignina en el caldo de cultivo, aun no habiendo Mn, ni Cu que son los elementos necesarios. Estudios anteriores nos dice que para que se active las enzima MnP y la lacasa tienen que tener concentración de Mn(II) y Cu, en caso de

limitación de estos microelementos no se detectaría la actividad de estas isoenzimas (Polanco et al, 2002; Staszczak, 2002).

VI. CONCLUSIONES

- Se aisló a *Aspergillus melleus* Yukawa de *Calamagrostis nitidula* Pilger como un hongo que es capaz de degradar la lignina.
- Se evaluó cualitativamente la degradación de la lignina mediante el viraje color café propio de la lignina a un color amarillo en *Aspergillus melleus* Yukawa.
- Se observó que para el método cuantitativo *Aspergillus melleus* Yukawa a 560 nm consume 80% de la lignina del medio del cultivo, en ausencia de los microelementos Mn y Cu en el medio Czapeck, demostrándose que es un hongo con una capacidad óptima para la degradación de la lignina.
- Se demostró que *Aspergillus melleus* Yukawa requiere glucosa para la degradación de la lignina, sin este monómero no se evidencia el cambio de la coloración de la lignina (café-amarillo).

VII. RECOMENDACIONES

- El hongo ligninolítico aislado *Aspergillus melleus* Yukawa debe ser evaluado en medio Czapeck – lignina adicionándole celulosa, se recomienda dicha adición para conocer si es celulítico negativo y aplicar un método para cuantificar el consumo de la Celulosa.
- La presencia de glucosa es importante en la lignólisis, por lo tanto se recomienda adicionar un método espectrofotométrico para cuantificar el consumo de la glucosa frente al consumo de la lignina.
- Realizar una curva de crecimiento para evaluar en que fase de crecimiento ocurre la degradación de lignina sólo para *Aspergillus melleus* Yukawa.
- Optimizar el medio Czapeck-Lignina empleando microelementos como Mn y Cu.
- Se recomienda realizar el aislamiento y purificación de la lignina de *Calamagrostis nitidula* Pilger para evaluar la actividad de *Aspergillus melleus* Yukawa.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Agosin E. y E. Odier. 1985. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:397-403.
- Ahammed S. y P. Prema. 2002. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus sp.* *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103(1-6).
- Arce C., T. Arbaiza, F. Carcelén, O. Lucas. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev. Inv. Vet. (Perú)* 14(1):7–12.
- Betts W. y R. Dart. 1989. Initial reactions in degradation of tri- and tetrameric lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*. *Mycological Research* 92(2):177-181.
- Cardoso J. y M. Costa. 1994. Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications. *Microbiology Reviews* 13(2-3):377-386.
- Cerrate E. 1964. Manera de preparar plantas para un herbario. Museo de Historia Natural San Marcos. Lima. 10 pp.
- Combellas J., E. Gonzalez y R. Parra. 1971. Composición y valor nutritivo de forrajes producidos en el trópico. I. digestibilidad aparente y verdadera de las fracciones químicas. *Agronomía tropical* 21(6):483-494.

- Conesa A., C. Hondel y P. Punt. 2000. Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol* 66(7): 3016–3023.
- Choque L. y M. Sotomayor. 1989. Resúmenes de investigación en pastos y forrajes de la región sur peruana. Proyecto Alpacas. Universidad Nacional del Altiplano. 181 pp.
- Daina S., H. Orlandii, G. Bestetti, c. Wiik y G. Elegir. 2002. Degradation de β -5 lignin mo9del dimers by *Ceriporiosis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technology* 30:499-505.
- Didier G., Z. Villca y P. Abasto. 1994. Diet selection and utilization by llama and sheep in a high altitude-arid rangeland of Bolivia. *Journal of Range Management* 47:245-248.
- Egorova, L. 1986. Hongos del suelo. Instituto de biología del suelo de la Academia de Ciencias. URSS. Editorial “Ciencia”, División de Leningrado. 207pp. (En Ruso)
- Fondevila M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. *Rev. Fac. Agron. (Luz)* 15:87-106.
- Jung H. 1996. Identification of cell wall traits that can be manipulated to improve forage digestibility. US Dairy Forage Research Center, Informational Conference with Dairy Forage industries. Pag. 9-14. <http://www.dfrc.arf.usda.gov/research_summaries/ind_meeit/dfrc2.pdf>
- Kadam K. y S. Drew. 1985. Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white-rot fungi using ^{14}C -labeled and unlabeled kraft lignins. *Biotechnology and Bioengineering* 28(3): 394-404.

- Kawai S., M. Nakagawa, H. Ohashi. 2002. Degradation mechanisms of a nonphenolic β -O-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydrobenzotriazole. *Enzyme and Microbial Technology* 30:482-489.
- Koroleva O., V. Gavrilova, E. Stepanova, V. Lebedeva, N. Sverdlova, E. Landesman, I. Yarmetdinov y A. Yaropalov. 2002. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated white-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccasa from *Cerrena maxima*. *Enzyme and Microbial Technology* (30) 573 – 580.
- Lin, S. 1980. Process for reduction of lignin color. U. S. Patent 4184845.
<<http://www.freepatentsonline.com/4184845.html>>
- Lobarzewski J. y A. Paszczynski. 1985. Lignocellulose biotransformation with immobilized Cellulose D-glucose oxidase and fungal peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* (7) 564-566.
- Luisetti M., P. Piccioni, K. Dyne, M. Donnini , A. Bulgheroni , L. Pasturenzi , A. Donnetta , V. 1991. Some properties of the alkaline proteinase from *Aspergillus melleus*. *Int. J. Tissue React.* 13(4):187-192.
- Martínez A. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* 30:425-444.
- Mäkelä M., S. Galkin, A. Hatakka y T. Lundell. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 542-549.
- Marquez A., G. Mendoza, S. Gonzales, S. Buntix y O. Loera. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus*

- ostreatus* IE8 Y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. INCI 32(11).
- Milstein O., Y. Vered, L. Shragina, J. Gressel, H. Flowers y A. Hüttermann. 1983. Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. Archives of Microbiology 135(2).
- Miyazawa T., M. Hiramatsu, T. Murashima y T. Yamada. 2002. *Aspergillus melleus* protease-catalyzed peptide synthesis using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro- 2-propanol/*N,N*-dimethylformamide. Biotechnology Letters. 24(23): 1945-1949.
- Moore K. y H. Jung. 2001. Lignin and fiber digestion. Journal of range management 54:420-430.
- Ondeyka J., A. Dombrowski, J. Polishook, T. Felcetto, W. Shoop, Z. Guan, y S. Singh. 2003. Isolation and insecticidal activity of mellamide from *Aspergillus melleus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30(4):220-224.
- Olvera P. 2003. Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación. Tesis profesional presentada para obtener el título en maestría en biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.
- Palumbo J., T. O'Keeffe y N. Mahoney. 2007. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant. Mycopathologia 164(5):241-248.
- Pérez M., W. Doyle, F. Ruiz, M. Martinez, A. Martinez y A. Smith. 2002. Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli*

- and optimization of in vitro folding. *Enzyme and Microbial Technology* 30:518-524.
- Polanco R., S. Lobos y R. Vicuña. 2002. Binding of nuclear proteins to the promoter region of the laccase gene Cs-lcs1 from the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme and Microbial Technology* 30:525-528.
- Prado S., C. Garcia, L. Georges. 1993. Efeito de fungos termófilos sobre madeira de *Eucalyptus saligna* Sm. II. *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus* Spp., *Penicillium bacillisporum* Swift, *Rhizomucor* sp. E *Sporotrichum* sp. Parte do Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, 26-27: 29-34.
- Ramírez R., R. Ramirez y F. Gutierrez. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *CIENCIA UANL* 5 (2):180-189.
- Sabatier J. 1992. Estudio de la deslignificación a la soda del bagazo. Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. Ciudad de la habana-Cuba.
- Semeniuk G. G. S. Harshfield, C. W. Carlson, C. W. Hesseltine, y W. F. Kwolek. 1971. Mycotoxins in *Aspergillus*. *Mycopathologia*. 43(2):137-152.
- Staszczak M. 2002. Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 537-541.

- Steffen K., M. Hofrichter y A. Hatakka. 2002. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology* 30:550 – 555.
- Tovar O. 1960. Revisión de las especies peruanas del género *Calamagrostis*. En: memorias del museo de Historia Natural “Javier Prado” N° II, 1960.
- Tovar O. 1993. Las gramíneas (Poaceae) del Perú. Madrid, Real Jardín Botánico de Madrid.
- Valenzuela E., C. Santibañez, S. Leiva y H. García. 2001. Hongos aislados desde sedimentos del lago Riñihue y afluentes X región. *Bol. micol.* 16:79-80.
- Zadrazil F. y H. Brunnert. 1982. Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (karst.) Reid. *Applied Microbiology Biotechnology.* 16:45-51.

IX. ANEXO

CONCENTRACIÓN DE LA LIGNINA (g/ml)	ABSORBANCIA a 560 nm	PROMEDIO DE LA ABSORBANCIA
0.0001	0.025	0.025
	0.027	
	0.024	
0.0002	0.047	0.047
	0.046	
	0.048	
0.0004	0.114	0.108
	0.104	
	0.107	
0.0006	0.160	0.172
	0.162	
	0.193	
0.0008	0.215	0.212
	0.210	
	0.210	
0.0010	0.286	0.285
	0.288	
	0.283	
0.0012	0.332	0.329
	0.328	
	0.327	
0.0014	0.404	0.398
	0.392	
	0.400	
0.0020	0.662	0.631
	0.662	
	0.568	

CEPAS FUNGICAS	ABSORBANCIA a 560 nm	Concentración de lignina inicial (g/ml)	Concentración de lignina al final de 15 días (g/ml)	Concentración de lignina consumida (g/ml)
Blanco	0.631	0.0020	-	-
P2C	0.895	0.0020	-	-
P2F	0.915	0.0020	-	-
PD5F	0.118	0.0020	0.0004 (20%)	0.0016
P3C	1.180	0.020	-	(80%)

TABLA 2. Absorbancia de la concentración de la lignina del medio Czapeck después de 15 días. Obsérvese que la cepa PD5F consume la lignina en un 80%

-
-
-
-
-

(d) Excede la lectura máxima en el espectrofotómetro a 560 nm

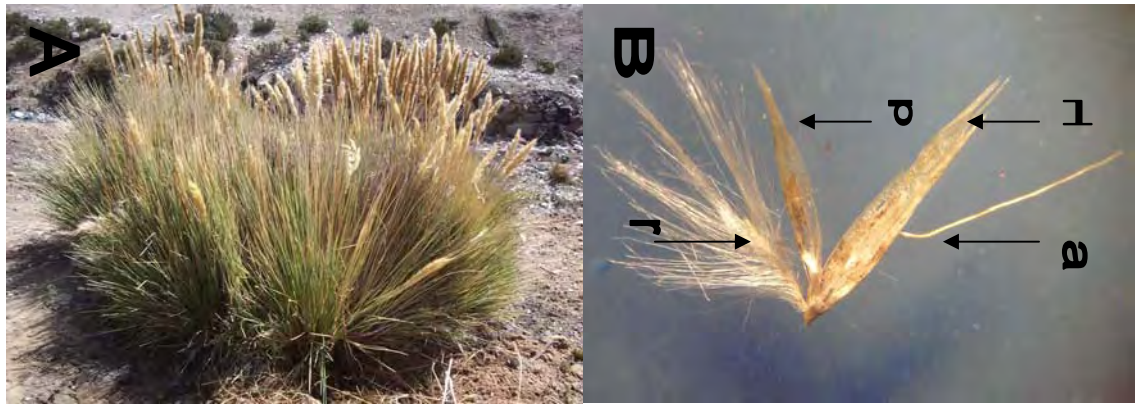


Figura 1. (A) Vista panorámica de *Calamagrostis nitidula* Pilger en la localidad de Ticlio 4800 msnm. (B) Característica de la inflorescencia (2X): p. Palea. l. Lema. a. Arista dorsal. r. Raquilla pubescente.

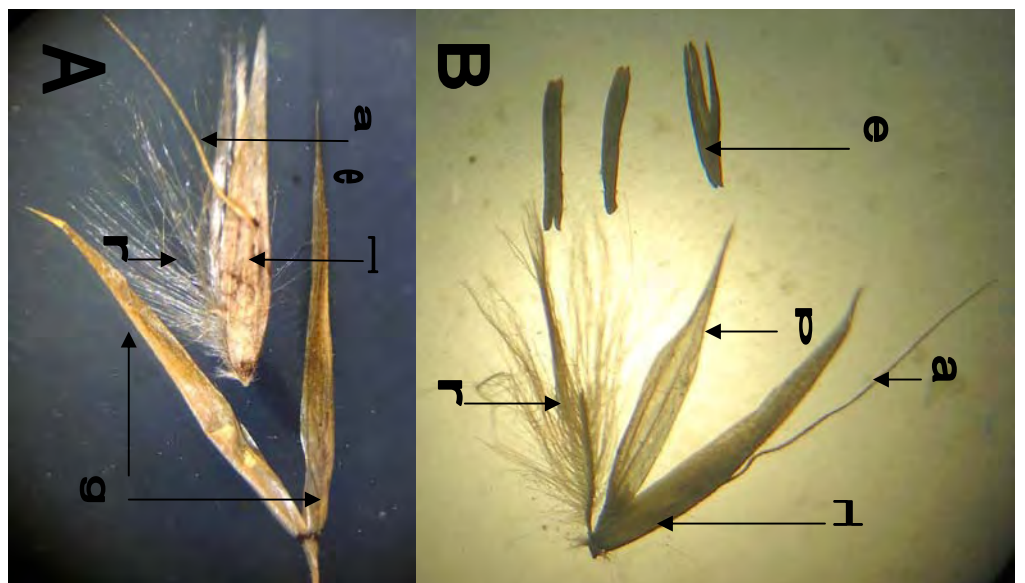


Figura 2. (A) Característica completa de una espiguilla de *Calamagrostis nitidula* Pilger vista a 2 X. a. Arista dorsal que nace en la mitad de la lema. g. Glumas. l. Lema. r. Raquilla muy pubescente. (B) a. Arista dorsal. e. Estambres. l. Lema. p. Palea. r. Raquilla pubescente

CEPAS DE HONGOS AISLADOS de *Calamagrostis nitidula* Pilger

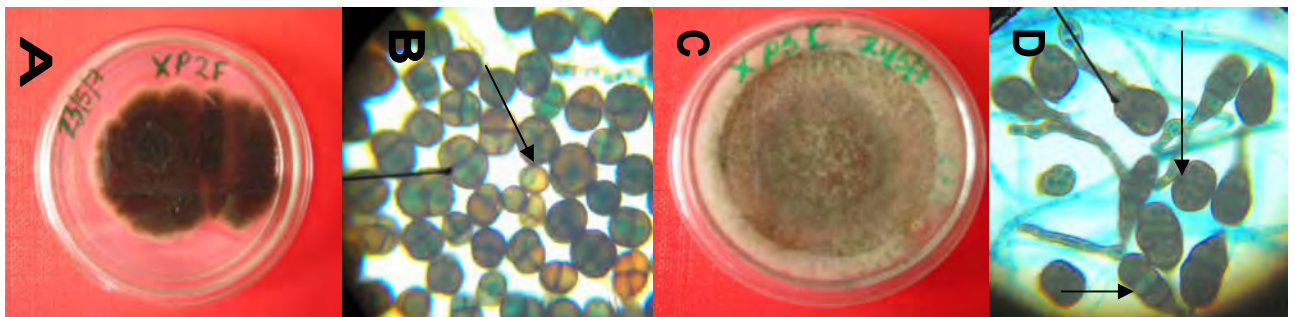


Figura 3. (A) Colonia de P2F. **(B)** Conidias dictiosporadas (100X) de P2F identificada como *Ulocladium*. **(C)** Colonia P3C **(D)** Conidias demateáceas dictiosporadas (100X) de P3C identificada como *Alternaria*.



Figura 4. (A) Colonia de P2C y **(B)** Conidias de *Alternaria* (100X).

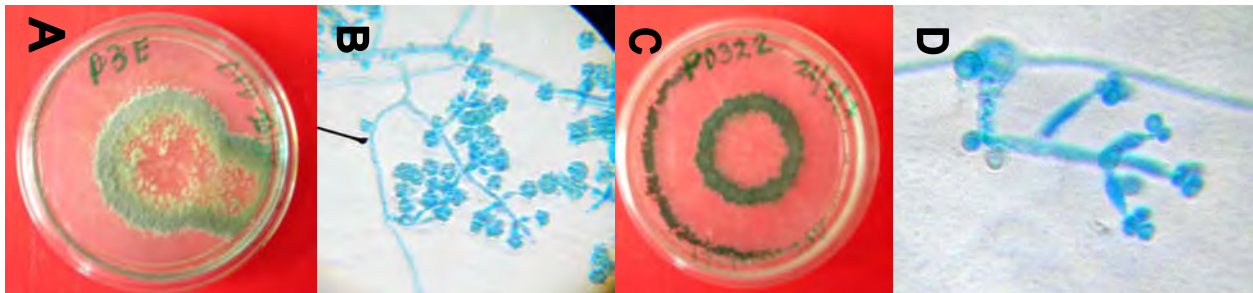


Figura 5. (A) Colonia de la cepa P3E (B) Conidias en racimo (100X) de P3E identificada como *Trichoderma* (C) Colonia PD322 (D) conidias en racimo (100X) de la Cepa PD322 identificada como *Trichoderma*

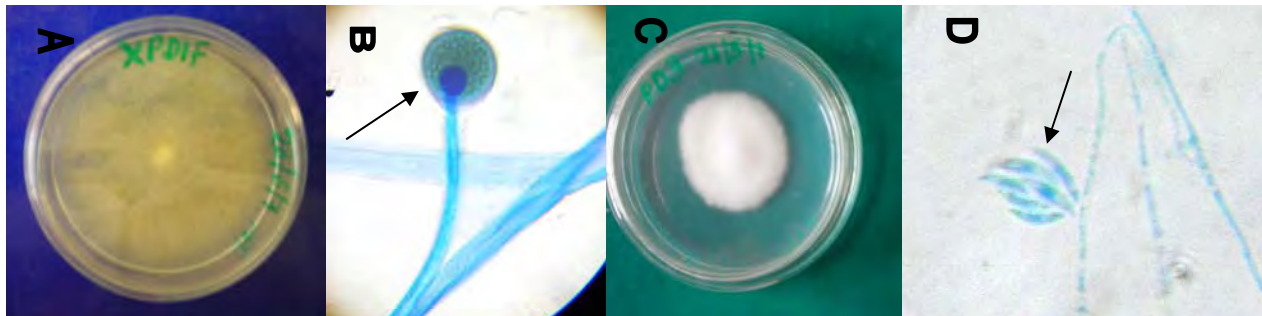


Figura 6. (A) Colonia de PD1F (B) Esporangio de PD1F identificada como *Mucor*. (C) Colonia de PD3 (D) Conidia didimosporadas de PD3 identificadas como *Cephalosporium*.

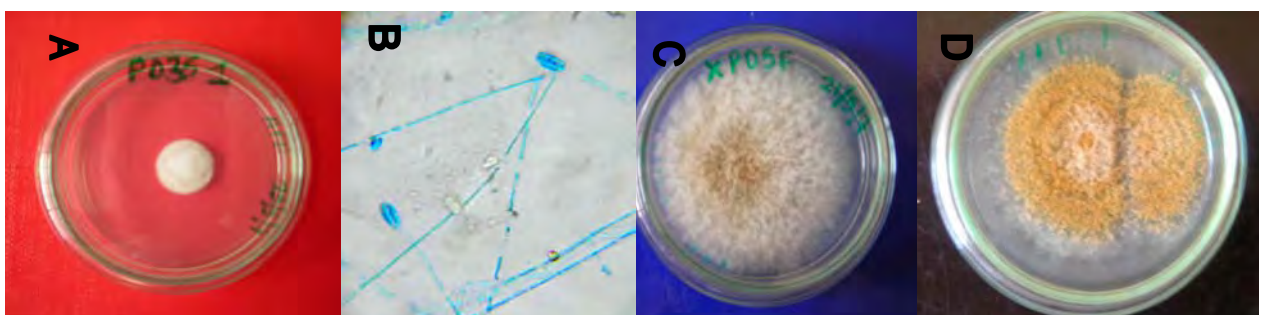


Figura 7. (A) Colonia (B) conidias didimosporadas reunidas en el ápice del conidióforo de PD3S identificada como *Cephalosporium*. (C) y (D) colonia de PD5F identificada como *Aspergillus melleus* Yukawa.



Figura 8. (A) Cepa PD321-*Helicomyces*. (B) y (C) Conidia en espiral.

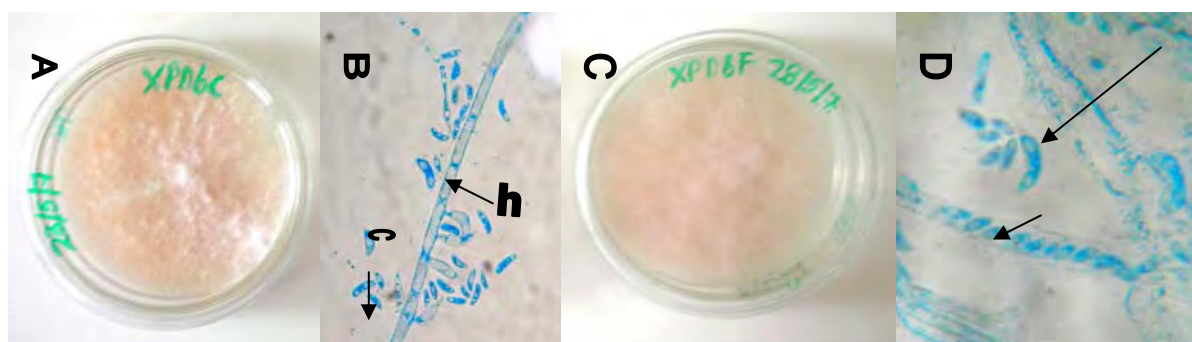


Figura 9. (A) Colonia de PD6C **(B)** (h) Hifas tabicadas y (c) conidias didimosporadas de PD6C identificada como *Cephalosporium* 100X **(C)** Colonia de Cepa PD6F **(D)** Conidias didimosporadas de PDF identificadas como *Cephalosporium* 100 X.

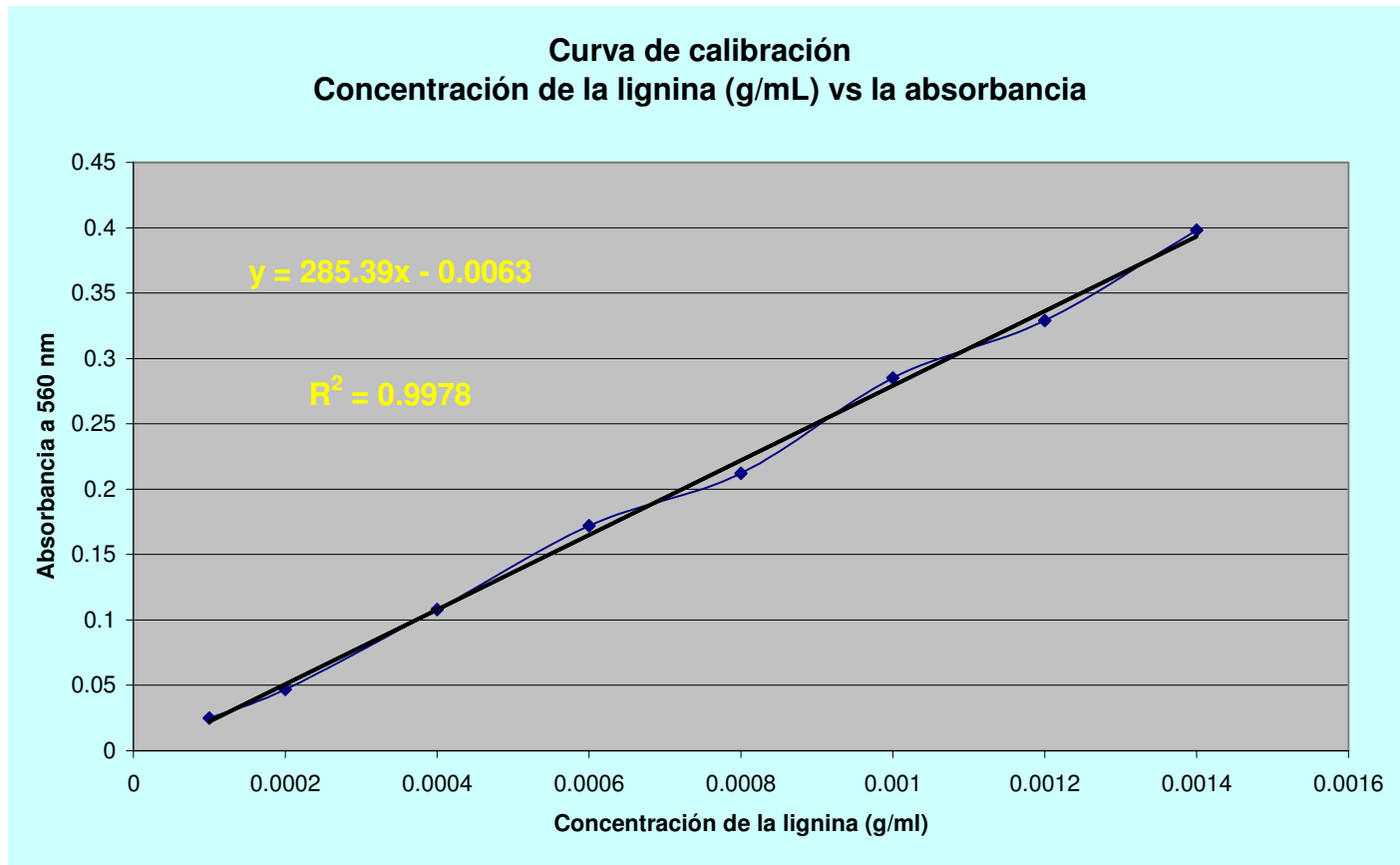


Figura 10. Curva de calibración para la concentración de lignina vs la absorbancia medida a 560 nm cumpliéndose la ley de Lambert beer



Figura 11. Prueba cualitativa de la degradación de lignina. Obsérvese que el segundo tubo (Cepa PD5F) ha sido el único que ha virado de color.

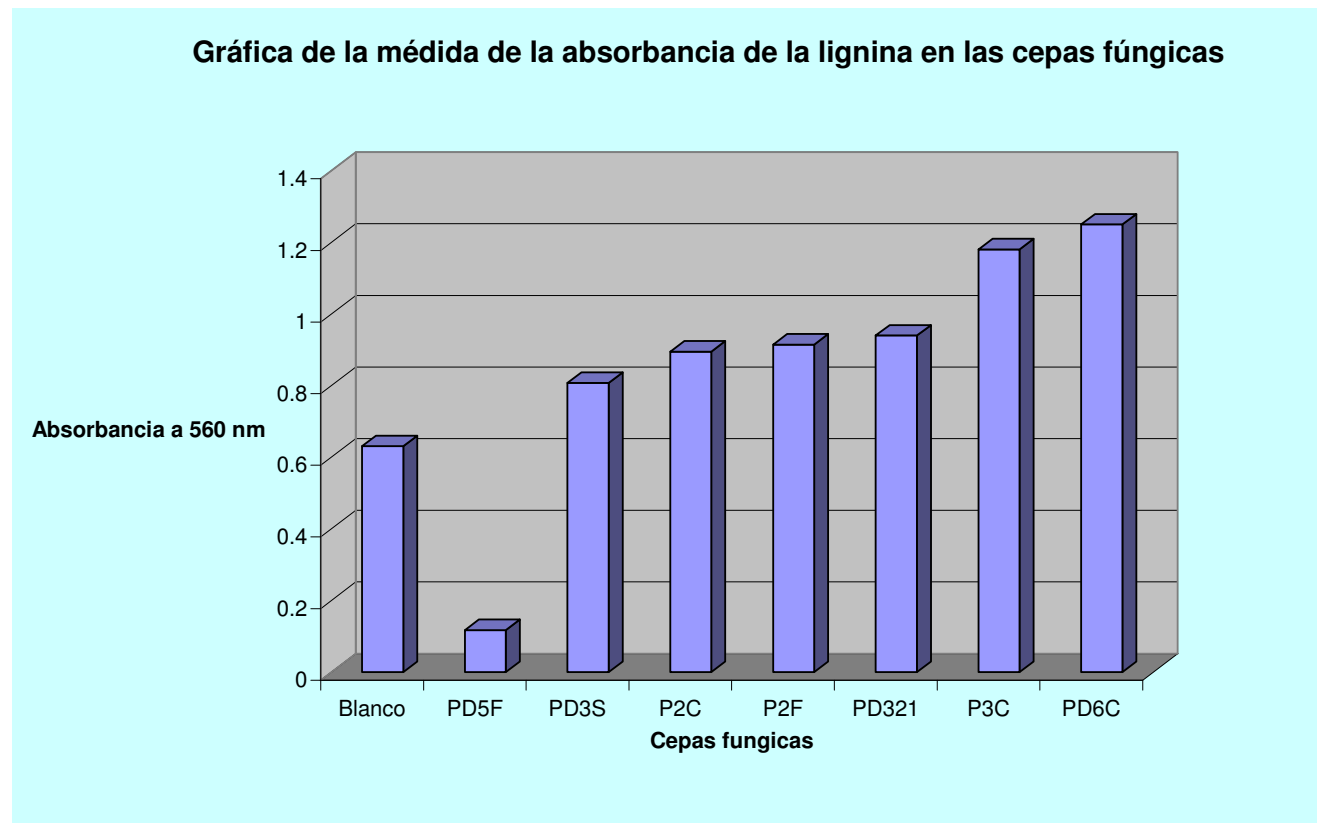


Figura 12. Cuadro comparativo de la absorbancia de la lignina después del periodo de cultivo de las cepas fúngicas aisladas de *Calamagrostis nitidula* Pilger.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE
Aspergillus melleus Yukawa

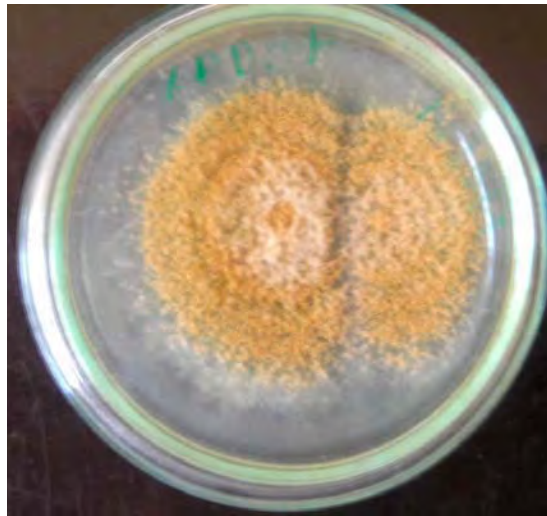


Figura 13. Colonia de la Cepa PD5F
identificada como *Aspergillus melleus*



Figura 14. Vesícula aspergilar de 140.8 μ vista al estereoscopio 4X

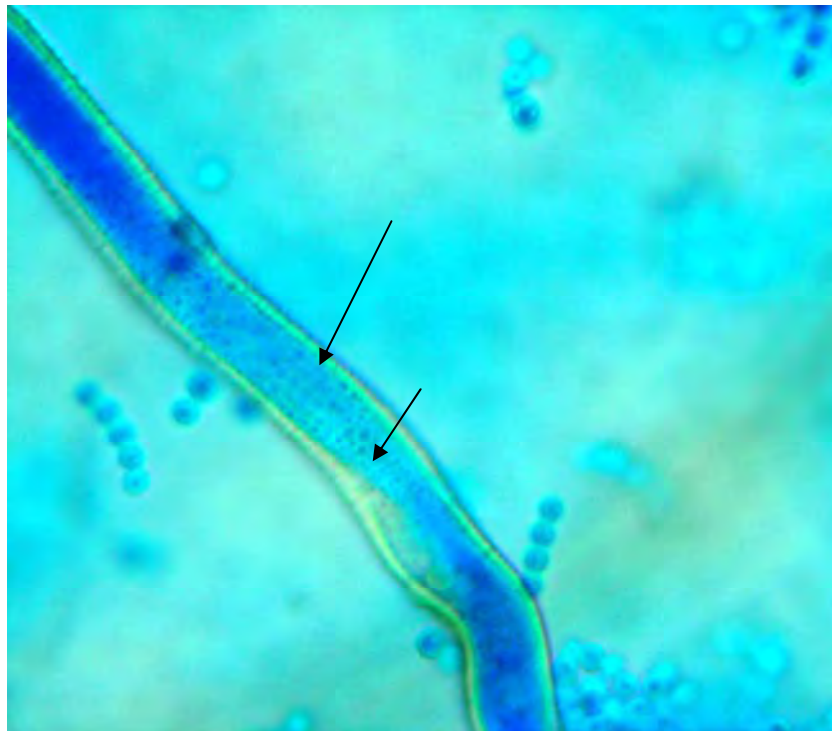


Figura 15. Conidióforo de *Aspergillus melleus* Yukawa vista al microscopio a 100X en aceite de inmersión, nótese que el conidióforo es rugoso y la pared presenta color amarillo.

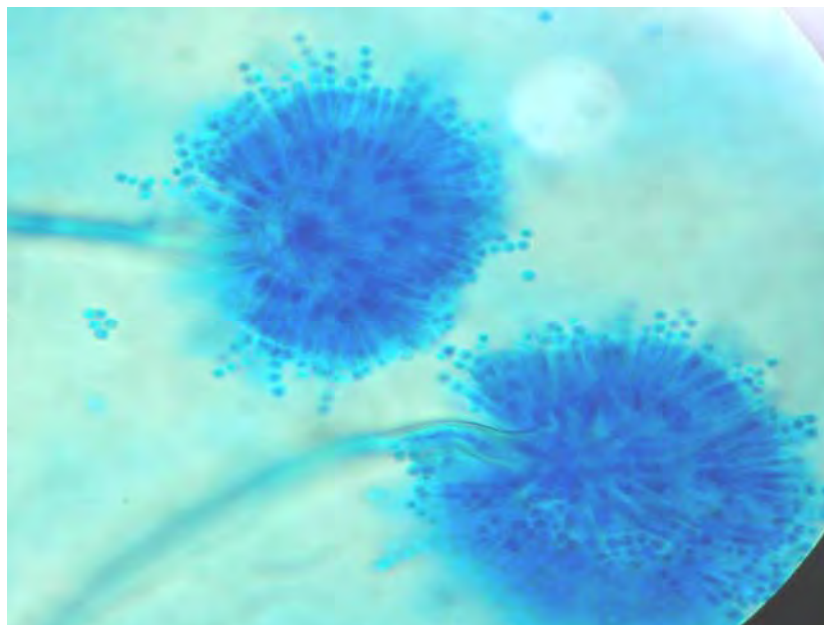


Figura 16. Vesícula aspergilar vista a 100 X, presenta conidias de pared lisa

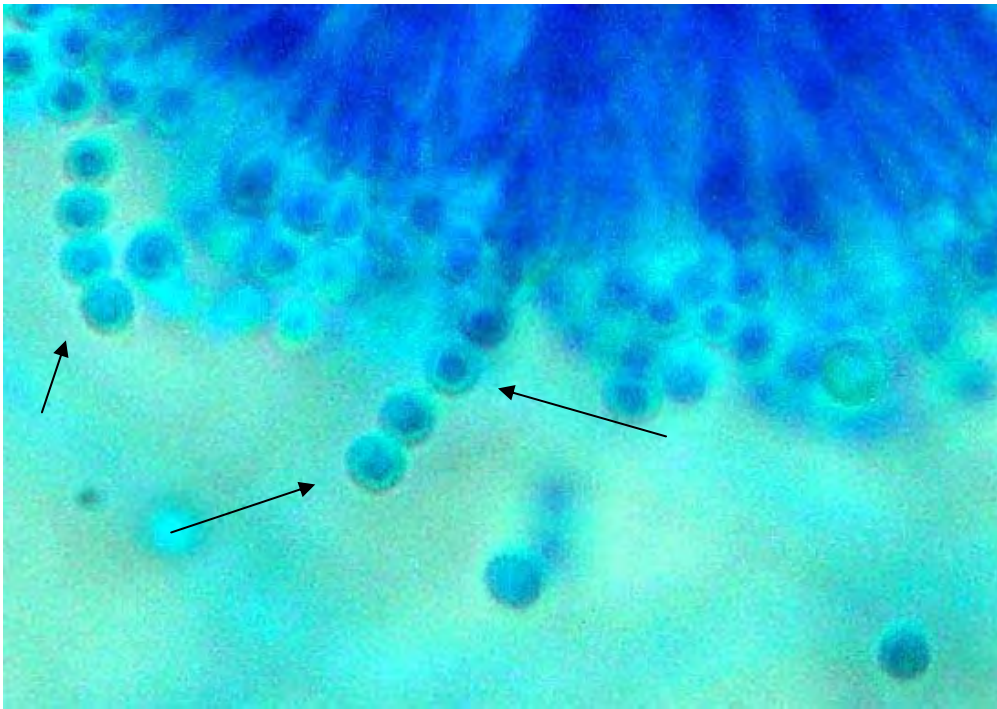


Figura 17. Conidia de pared lisa.

CLAVE PARA DETERMINAR ASPERGILLUS (Egorova, 1986)

1. En cultivo se observa Cleistotecio.....2
Carencia de Cleistotecio.....5
2. Ascosporas pálidas (estado perfecto del tipo *Eurotium*) Fiálide de una capa.....3
Ascosporas rojas (estado perfecto del tipo *Emericella*) Fiálide dispuesto en métulas.....*A. nidulans*
3. Ascosporas lisa.....4
Ascosporas rugosa, estriado con surco ecuatorial.....*A. amstelodami*
4. Cabeza conidial grande (125-175 μm), en conidióforos prolongados (500-1000 μm).....*A. repens*
Cabeza conidial pequeño (50-75 μm), en conidióforo mas cortos (150-300 μm).....*A. pseudoglaucus*
5. Cabeza conidial en forma de barrote o clavado.....*A. clavatus*
Cabeza conidia no clavado.....6
6. Colonia verde (varios matices).....7
Colonia no verde.....17
7. Conidióforo rugoso.....8

	Conidióforo liso.....	11
8.	Cabeza conidial castaño verdoso.....	<i>A. tamarii</i>
	Cabeza conidial verde amarillo.....	9
9.	Fiálide condicionado en una sola capa.....	<i>A. oryzae</i>
	Fiálides dispuestas en varias métulas.....	10
10.	Conidióforo de 1 mm, cabeza conidial radial.....	<i>A. flavus</i>
	Conidióforo corto, 50-100 μm , cabeza conidial.....	<i>A. effusus</i>
11.	Fiálide de una sola hilera.....	12
	Fiálide dispuesta en métulas.....	13
12.	Conidias piriforme, 4.5-6 X 3.5 μm	<i>A. restrictus</i>
	Conidia esférica, 2.5-3.5 μm	<i>A. fumigatus</i>
13.	Conidióforo castaño amarillo.....	14
	Conidióforo transparente.....	15
14.	Conidia 3-5 μm , acantocéfalo o verrugoso en general castaño Amarillo	<i>A. ustus</i>
	Conidia 2.5-3.5 μm , rugoso, en general verde oscuro,.....	<i>A. unguis</i>
15.	Colonia verde azulado o verde oscuro esporas.....	16

	Varias Colonias coloreados: naranja amarillo, amarillo rosado, verde Amarillento.....	<i>A. versicolor</i>
16.	Colonia verde azulado, cabeza conidial radial.....	<i>A. sydowii</i>
	Colonia verde oscuro, dos cabezas conidiales típicos: uno radial grande sobre extensos conidióforos u otro conidia pequeñas sobre cortos conidióforos.....	<i>A. janus</i>
17.	Conidióforo liso.....	18
	Conidióforo rugoso.....	27
18.	Conidióforo amarillento, cabeza conidial como la nuez pálida, amarillo oscuro, y sólido.....	<i>A. flavipes</i>
	Conidióforo no coloreado o parcialmente coloreado cerca cabeza.....	19
19.	Cabeza conidial elongado, castaño.....	<i>A. terreus</i>
	Cabeza conidial esférico.....	20
20.	Cabeza conidial blanco.....	<i>A. candidus</i>
	Cabeza conidial coloreado.....	21
21.	Cabeza conidial negro.....	22
	Cabeza conidial amarillo o castaño-oliva.....	26

22. Fiálide dispuesto en métulas.....23
 Fiálide en una hilera.....25
23. Métula menor de 15 μm24
 Métula mas de 20 μm*A. níger*
24. Conidióforo 1-2.5, conidia elipsoidal, micelio vegetativo no coloreado.....*A. awamori*
 Colonia cerca de 500 μm , conidia esférico, micelio vegetativo amarillo-brillante.....*A. foetidus*
25. Colonia negro-púrpura, conidióforo sobre corpúsculo amarillo, fiálide 6 X 3 μm *A. luchuensis*
 Colonia castaño-púrpura, conidióforo castaño, fiálide 7-9 X 5-6 μm*A. japonicus*
26. Cabeza conidial amarillo oscuro, conidial 150 μm , conidia 2.5-3 μm*A. alliaceus*
 Cabeza conidial castaño-verde oliva, conidióforo 1-3 μm , conidia 3.5-6 μm *A. wentii*
27. Cabeza conidial amarillo-miel, conidia de pared delgada liso.....*A. melleus*
 Cabeza conidial amarillo-ocre, conidia de pared delgada rugosa.....*A. ochraceus*

