

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS  
DESCOMPOVEDORES DE MADERA EN LA RESERVA NATURAL LA  
MONTAÑA DEL OCASO, QUIMBAYA - QUINDÍO**

**DEISY FERNANDA CHAPARRO SOSA  
DIANA CAROLINA ROSAS WANUMEN**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de**

**Microbióloga Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
SEPTIEMBRE DE 2006**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 13 de la Resolución N° 13 de  
Julio de 1946

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

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS  
DESCOMPOVEDORES DE MADERA EN LA RESERVA NATURAL LA  
MONTAÑA DEL OCASO, QUIMBAYA - QUINDÍO**

**DEISY FERNANDA CHAPARRO SOSA  
DIANA CAROLINA ROSAS WANUMEN**

**APROBADO**

---

**Amanda Varela, Ph.D.  
Directora**

---

**Hernando Valencia, Ph.D.**

---

**Aura Marina Pedroza, Ph.D.**

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS  
DESCOMPOREDORES DE MADERA EN LA RESERVA NATURAL LA  
MONTAÑA DEL OCASO, QUIMBAYA - QUINDÍO**

**DEISY FERNANDA CHAPARRO SOSA  
DIANA CAROLINA ROSAS WANUMEN**

**APROBADO**

---

**Angela Umaña Muñoz, M. Phil.**  
**Decana Académica**

---

**Luis David Gómez M. Sc.**  
**Director de Carrera**

A mis padres Gilberto Chaparro y María Paula Sosa, a mi hermano Felipe y a mi novio Luis por su apoyo incondicional, amor y paciencia.

Deisy Chaparro.

A mis padres Luis Miguel Rosas y Blanca Wanumen y a mi hermano Camilo, por su amor, paciencia y comprensión.

Carolina Rosas

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarnos la oportunidad de cumplir una de nuestras metas.

A la Doctora Amanda Varela por su apoyo y guía en la realización de nuestro trabajo de grado.

Al laboratorio de Ecología Funcional por su colaboración y apoyo logístico.

A la Doctora Flavia Forchiassin y compañeros del laboratorio de Micología experimental de la Universidad de Buenos Aires por su apoyo y capacitación sobre el tema.

Al CIBUQ por permitirnos la entrada a la Reserva Natural La Montaña del Ocaso.

A Germán Darío Gómez por su asesoría y colaboración en la fase de campo y a Daniel Rodríguez por su colaboración en la recolección de ejemplares para la realización de este estudio.

A Natalia Galiano, Mónica Aguilera, Sandra Avellaneda y demás compañeros de laboratorio, por su colaboración y compañía durante la realización de nuestro trabajo de grado.

A nuestros amigos por su paciencia y ayuda en los momentos oportunos durante el desarrollo de este proyecto.

A la Pontificia Universidad Javeriana por su formación integral y académica durante toda la carrera y su apoyo económico en la realización de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Hongos de la pudrición y efectos sobre la madera</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Madera y descomposición</b>	<b>6</b>
<b>2.3.</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1.</b>	<b>Mediadores en la degradación de la lignina</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1.2.</b>	<b>Celobiosa deshidrogenasa</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>3.1.</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>19</b>
<b>3.2.</b>	<b>Justificación</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1.</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>21</b>
<b>4.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>21</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>5.1.</b>	<b>Área de estudio</b>	<b>22</b>
<b>5.2.</b>	<b>Recolección de ejemplares</b>	<b>22</b>
<b>5.1.1.</b>	<b>Determinación de humedad de los troncos</b>	<b>23</b>
<b>5.2.2.</b>	<b>Determinación de estado de descomposición de los troncos</b>	<b>23</b>
<b>5.2.</b>	<b>Aislamiento y condiciones de cultivo</b>	<b>24</b>
<b>5.3.</b>	<b>Pruebas cualitativas de actividad enzimática</b>	<b>24</b>
<b>5.5.</b>	<b>Fermentación discontinua</b>	<b>25</b>
<b>5.5.1.</b>	<b>Determinación de biomasa</b>	<b>26</b>
<b>5.5.2.</b>	<b>Determinación de glucosa liberada en el medio</b>	<b>26</b>
<b>5.5.3.</b>	<b>Determinación de la actividad enzimática de la lacasa</b>	<b>27</b>

<b>5.5.4. Determinación de la actividad enzimática de la celobiosa deshidrogenasa</b>	<b>28</b>
<b>5.5.5. Determinación de proteínas extracelulares</b>	<b>29</b>
<b>5.6. Análisis estadístico</b>	<b>30</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>60</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1. Estructura de la celulosa</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2. Precursores directos de la degradación de la lignina</b>	<b>9</b>
	<b>10</b>
<b>Figura 3. Estructura de la lignina</b>	
<b>Figura 4. Degradación de la celulosa. Se muestran los sitios de actividad de las enzimas hidrolíticas de la celulosa</b>	<b>14</b>
<b>Figura 5. Mecanismo de reacción de la enzima celobiosa deshidrogenasa por la reducción de quinonas</b>	<b>17</b>
<b>Figura 6. A. Prueba de la enzima lacasa por la técnica de oxidación de ABTS. B. Prueba de la enzima celobiosa deshidrogenasa por la técnica de reducción del DCPIP.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7. Relación entre la actividad lacasa de los hongos pudrición blanca y los cinco estados de descomposición de los troncos de bosque subandino</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8. Relación entre la actividad CDH de los hongos de la pudrición blanca y los cinco estados de descomposición de los troncos de bosque subandino</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Relación entre la actividad lacasa y la actividad CDH de los hongos de la pudrición blanca de bosque subandino</b>	<b>40</b>

<b>Figura 10. Comparación entre las medias de las concentraciones de biomasa (g/l) de <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X polymorpha</i> y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 11. Determinación de biomasa en el medio extracto de salvado de trigo de <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X. polymorpha</i>, y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 12. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la glucosa liberada en el medio por hongos de la pudrición blanca en bosque subandino</b>	<b>44</b>
<b>Figura 13. Determinación de glucosa en el medio extracto de salvado de trigo de <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X. polymorpha</i>, y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 14. Comparación entre las medias de las concentraciones de actividad lacasa (U/L) de <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X polymorpha</i> y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 15. Determinación de actividad lacasa en el medio extracto de salvado de trigo por <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X. polymorpha</i> y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 16. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la actividad lacasa (U/L) de los hongos de la pudrición blanca de bosque subandino</b>	<b>49</b>
<b>Figura 17. Relación entre el consumo de glucosa (g/l) y la actividad lacasa (U/L) de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino</b>	<b>50</b>

<b>Figura 18. Relación entre la producción de proteínas (<math>\mu\text{g/l}</math>) y la actividad lacasa (U/L) de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino</b>	<b>51</b>
<b>Figura 19. Comparación entre las medias de las concentraciones de actividad celobiosa deshidrogenasa (U/L) de <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X polymorpha</i> y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 20. Determinación de actividad celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo por <i>C. sulcipes</i>, el hongo de la familia Corticiaceae, <i>X. polymorpha</i> y <i>Earliella</i> sp.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 21. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la actividad de la CDH (U/L) de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino</b>	<b>56</b>
<b>Figura 22. Relación entre la actividad enzimática de la lacasa (U/L) y la actividad enzimática de la CDH (U/L) de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino</b>	<b>58</b>

## **INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1. Lista de hongos recolectados, estado de descomposición y crecimiento 31**

**Tabla 2. Evaluación de la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo con ABTS y DCPIP 35**

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la búsqueda de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino, ubicado en la reserva natural la Montaña del Ocaso en el departamento del Quindío y se evaluó la actividad ligninolítica de algunos de ellos. Se recolectaron hongos de la pudrición blanca pertenecientes al Phylum Ascomycota y Basidiomycota encontrados con mayor frecuencia en troncos caídos con diferentes estados de descomposición, con el fin de conocer la capacidad enzimática de estos hongos y su relación con el estado de descomposición en los troncos colonizados. Los ejemplares fueron cultivados en medio agar extracto de malta a una temperatura de 25°C durante 8 días. En las pruebas cualitativas de actividad enzimática los hongos aislados se sembraron en medio agar extracto de salvado de trigo modificado utilizando como inductor enzimático ABTS para evaluar la actividad lacasa y DCPIP para evaluar la actividad celobiosa deshidrogenasa; la temperatura de incubación fue 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días, evaluándose la actividad enzimática por el diámetro de halo que presenta cambio de color en el medio. De acuerdo con los resultados obtenidos en estas pruebas se seleccionaron los hongos con mayor capacidad de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa para evaluar su actividad enzimática en medio líquido extracto de salvado de trigo modificado por cada estado de descomposición en los troncos. Se escogió a *Cookeina sulcipes* para estado de descomposición 1 en el tronco, un hongo de la familia Corticiaceae para estado 2 de descomposición en el tronco, *Xylaria polymorpha* perteneciente al estado con descomposición 3 y un hongo del género *Earliella* para el tronco con estado 4 de descomposición. No se evaluó ningún hongo del estado con descomposición 5 ya que no se evidenció actividad celobiosa deshidrogenasa. La fermentación de estos hongos se realizó a una temperatura de 28°C por 11 días, con una agitación de 150 rpm; se realizaron mediciones diarias para la determinación de biomasa, glucosa liberada en el medio, actividad lacasa, actividad celobiosa deshidrogenasa y proteínas extracelulares; se observó en las pruebas cualitativas que las tasas de actividad enzimática de los hongos pertenecientes a troncos con el mismo estado de descomposición no siguen un mismo patrón. Se evidenció que los hongos que se encontraban en los troncos con estados de descomposición 1 al 3, aumentaban su actividad lacasa a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos. En cuanto a la actividad celobiosa deshidrogenasa se encontró una correlación positiva entre esta y el estado de descomposición de los troncos ya que en los estados 3 y 4 de descomposición se encuentran los hongos con mayores diámetros de los halos. En los resultados obtenidos en la fermentación se observó que el consumo de glucosa fue mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa en los Basidiomycota estudiados (*Earliella* y Corticiaceae); por el contrario, los hongos Ascomycota (*Cookeina sulcipes* y *Xylaria polymorpha*) tienen una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento. *Earliella* fue el hongo que presentó la mayor producción de biomasa (1140,19 g/l), de actividad lacasa (157 UL<sup>-1</sup>) y celobiosa deshidrogenasa (43,50 UL<sup>-1</sup>). Se evidenció que a medida que se presentaba un incremento en la actividad enzimática de la lacasa y de la celobiosa deshidrogenasa, el grado de descomposición de los troncos colonizados aumentaba. Este trabajo es el primer reporte de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en *Cookeina sulcipes* y *Earliella* sp.

## ABSTRACT

In this work, was carried out the searching of autochthonous white rot fungi in a sub Andean forest, located in the natural reserve "La Montaña del Ocaso", Quindío, Colombia, and was evaluated their enzymatic activity. White rot fungi belonging to the Phylum Basidiomycota and Ascomycota with more frequency in fallen trunks with different stages of decay was recollected, with the purpose of knowing the enzymatic capacity of these fungi and their relation with the state of decay in the colonized trunks. The strains were cultivated in malt extract agar to a temperature of 25°C during 8 days. In the qualitative tests of enzymatic activity, the isolated fungi were cultivated in modified wheat bran agar at 25°C, using ABTS as enzymatic inducer to evaluate the activity laccase, and DCPIP to evaluate the activity cellobiose dehydrogenase; activity was measured daily, during 8 days in terms of the halo diameter that presents change of color in the medium. In accordance with the results obtained in these test, the strains with higher laccase and cellobiose dehydrogenase activity from each state of decomposition in the trunks were cultivated in modified wheat bran liquid medium. The strains cultivated were: *Cookeina sulcipes* from trunks with stage of decay 1, a strain from the family Corticiaceae from trunks with stage of decay 2, *Xylaria polymorpha* from trunks with stage of decay 3 and *Earliella* sp. from trunks with stage of decay 4. Any strain from stay of decay 5 was not cultivated in liquid medium because of activity cellobiose dehydrogenase was not evidenced. The fermentation was realized at 28°C during 11 days in a rotatory shaker at 150 rpm; Biomass, glucose, extracellular proteins and enzyme activities measurements were performed daily. The rates of enzyme activities of the strains belonging to trunks with the same state of decomposition don't follow oneself pattern. The strains that were in the trunks with states of decomposition 1 to 3, increased their activity laccase as the state of decomposition of the trunks increased. There were found a positive correlation between the celobiose dehydrogenase activity and the state of decay of the trunks, which is evidenced with the maximum diameter of the halos belonging to the trunks with states of decomposition 3 and 4. In the results obtained in the fermentation it was observed that the consumption of glucose went higher than cellulolytic activity when the biomass production increases in the fungi from the Phylum Basidiomycota studied (*Earliella* sp. and Corticiaceae); on the contrary, the Ascomycota (*Cookeina sulcipes* and *Xylaria polymorpha*) have a higher cellulolytic activity than the consumption of glucose in its stage of growth. The fungi which presented the highest biomass production (1140,19 g/l), laccase activity (157 U<sup>l</sup><sup>-1</sup>) and cellobiose dehydrogenase activity (43,50 UL<sup>-1</sup>) was *Earliella*. This study shows that the grade of decomposition of the trunks increases as the laccase activity and cellobiose dehydrogenase activity present an increment. This work is the first report of laccase and cellobiose dehydrogenase activity in *Cookeina sulcipes* and *Earliella* sp.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia, la superficie de los bosques se ha reducido considerablemente debido a la deforestación causada por las actividades agrícolas, ganaderas y de producción maderera. Los bosques subandinos han sido sobreexplotados debido a la fertilidad de sus suelos y al crecimiento de la población, reduciendo la cobertura de este tipo de bosque. Por tal razón se ha visto la necesidad de definir zonas de regeneración y mantener los remanentes de este ecosistema.

Es importante conocer la biodiversidad nativa de este ecosistema, estudiarla y conservarla *ex situ*. Los hongos de la pudrición, tanto Ascomycota como Basidiomycota, juegan un papel importante en los bosques por ser los únicos organismos capaces de descomponer la madera hasta su total mineralización, llegando finalmente a la formación de capas de humus en el suelo.

La actividad enzimática de los hongos descomponedores de madera es de gran importancia tanto a nivel ecológico como industrial ya que su complejo enzimático especializado de peroxidasa, lacasa y celulasas como la celobiosa deshidrogenasa, tienen gran importancia dentro del ciclo del carbono. Además de esto pueden causar grandes perjuicios a nivel económico en la industria maderera ya que al alterar los componentes celulares cambian las propiedades físicas y químicas de la madera. Por otro lado, su actividad enzimática presenta una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria del papel, de textiles y tintes, de alimentos y en procesos de detoxificación.

Las enzimas más estudiadas de los hongos de la pudrición hasta ahora han sido la manganosa peroxidasa, la lignina peroxidasa y la lacasa; la celobiosa deshidrogenasa se conoce hace poco tiempo en relación a las otras enzimas. A pesar de que no se conoce totalmente la función biológica de la celobiosa deshidrogenasa se sabe que cumple un papel clave en la degradación de la lignina facilitando la actividad de enzimas oxidativas como las lacasas.

Adicionalmente la diversidad nativa de estos hongos es de mucho interés debido a los tipos de enzimas que se pueden encontrar llegando a tener un gran potencial de

uso por sus diferentes aplicaciones. Su complejo enzimático especializado les ha permitido ser esenciales dentro del ciclo de carbono de cualquier ecosistema terrestre. En Colombia, se han realizado muy pocos estudios de los hongos nativos de la pudrición tanto en su hábitat natural como *ex situ*, así como, sobre las posibilidades de utilizarlos biotecnológicamente. Por tal razón, este estudio se enfocará en conocer la relación de las especies de este tipo de hongos nativos y su actividad enzimática, con el grado de descomposición de los troncos que colonizan, así como, con algunos factores climáticos, en un fragmento de bosque subandino o Húmedo Montano Bajo, ubicado en la reserva natural “La Montaña del Ocaso”, en el Municipio de Quimbaya, Departamento del Quindío.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Hongos de la pudrición y efectos sobre la madera

Los troncos recién caídos contienen azúcares en las columnas de las brácteas del parénquima que se encuentran longitudinalmente en el tronco. Estas columnas son colonizadas rápidamente por hongos que pueden cambiar el color de la madera y reducir su valor comercial (Ej. *Trichoderma* spp.). Estas columnas son colonizadas rápidamente por hongos que pueden manchar la madera y reducir su valor comercial. Una vez esta fase sucede, la madera se vuelve accesible sólo para los hongos de la pudrición (Ascomycota y en especial Basidiomycota) (Deacon 2002). El conocimiento acerca del papel de los hongos en la pudrición de la madera se hizo efectivo al final del siglo XIX. Sin embargo, la asociación entre los hongos y la pudrición de la madera siempre ha sido notable, encontrando que la descomposición de esta involucra el crecimiento espontáneo de los hongos (Rayner & Boddy 1988). Las principales categorías en la descomposición de la madera de acuerdo al modo de ataque y de las condiciones en que ellos crecen son la pudrición blanda, pudrición café y la pudrición blanca (Deacon 2001). Por definición los descomponedores de la madera son aquellos que hacen que ocurra esta pérdida de peso y cambios estructurales (Saldarriaga 2001).

**Pudrición blanda:** Ocurre cuando el daño causado por el microorganismo es muy superficial. La madera pierde fuerza mecánica y se torna húmeda y esponjosa. Es causada por Ascomycetes y Deuteromycetes, e inicialmente puede caracterizarse por cadenas de cavidades longitudinales con puntos cónicos en la capa de la pared (Saldarriaga 2001). Alrededor de las hifas se genera una destrucción localizada de la celulosa alrededor de la hifa, formando una cavidad en la pared secundaria. Algunos de los hongos causantes de este tipo de pudrición son *Chaetomium globosum* y *Daldinia concentrica* (Moore-Landecker 1996).

**Pudrición café:** Es causada principalmente por basidiomycetes, los cuales degradan las hemicelulosas y la celulosa despolimerizada (Deacon 2002). Los carbohidratos son removidos, pero la lignina es modificada solamente hasta cierto límite (Rayner & Boddy 1988). 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. La descomposición de la celulosa ocurre a cierta distancia de la hifa, mediante un sistema celulolítico difusible y un proceso no enzimático mediado por peróxido de hidrógeno e iones manganeso. Este grupo de hongos representa sólo el 7% de los basidiomycetes causantes de pudrición en la madera (Martínez *et al.* 2005). Entre los hongos que causan la pudrición café está *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustres* y *Gloeophyllum trabeum* (Markham and Bazin 1991).

**Pudrición blanca:** Ocurre cuando los microorganismos que atacan la madera degradan profunda y completamente los componentes lignocelulósicos. Gracias a los estudios realizados por Falk y Haag (1927) y Wehmer (1927), actualmente se conoce que los hongos de la pudrición 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 (Rayner & Boddy 1988). Por tal razón la madera toma una apariencia blanquecina, húmeda, blanda, esponjosa y en las etapas avanzadas la madera se debilita notablemente (Martínez *et al.* 2005). La apariencia de la madera con pudrición blanca es fibrosa, debido a que parte de la celulosa permanece intacta hasta etapas tardías del proceso. Generalmente es menos fibrosa en maderas duras que en maderas blandas (árboles de coníferas), debido a las fibras cortas que poseen las maderas duras. Usualmente la madera se vuelve blanquecina debido al blanqueamiento producido por la oxidación y a la pérdida de lignina, la cual es ligeramente café. El color y la textura dependen del hongo causante de la pudrición (Worrall 2005). Como ejemplos de los hongos que causan la pudrición blanca están *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Saldarriaga 2001).

Se conocen dos formas de pudrición blanca: la deslignificación selectiva ocurre en angiospermas y coníferas. En este proceso las poliosas (hemicelulosas) y la lignina son atacadas generalmente en estados tempranos, y posteriormente es atacada la celulosa (Zabel & Morrel 1992). El daño anatómico más visible es la desfibración, causada por la degradación de la lignina en la lámina media y pared secundaria, mediante el mecanismo de difusión. Algunos de los basidiomycetes que causan la

deslignificación selectiva son *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus* spp. y *Phellinus pini*. (Martínez *et al.* 2005; Saldarriaga 2001).

En la pudrición simultánea, la lignina y los carbohidratos son atacados más o menos uniformemente, generando un aspecto quebradizo en el tronco. Este tipo de pudrición ocurre en angiospermas y, ocasionalmente en coníferas (Zabel & Morrel 1992). En este caso la característica anatómica es una erosión en la pared celular de la superficie del lumen alrededor de las hifas (Moore-Landecker 1996). Algunos hongos causantes de la pudrición simultánea son Basidiomycetes como *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanaerochaete chrysosporium* y *Heterobasidion annosum* y algunos Ascomycetos como *Xylaria hypoxylon* (Martínez *et al.* 2005; Saldarriaga 2001).

Cuando los hongos atacan la madera e invaden sus células para obtener alimento metabolizando los constituyentes de estas, la madera sufre una serie de cambios en sus propiedades que afectan su uso posterior. Estos cambios varían según la clase de hongo y el tiempo en que ocurre la pudrición (Rayner & Boddy 1988). Por ejemplo con los hongos que causan la pudrición café se observa primero una pérdida grande de la fuerza de la madera y un cambio en los componentes de la pared celular, antes de notarse cambios en el peso. En el caso de la pudrición blanca, la pérdida de fuerza es proporcional a la pérdida de peso y no ocurren cambios apreciables en los componentes de la pared (Saldarriaga 2001). Se ha demostrado que la madera que ha perdido sólo el 1% de su peso a causa de su descomposición generalmente pierde un 50% de su fuerza (Richards 1954).

Los hongos de la pudrición blanca son extremadamente eficientes en su uso del nitrógeno. Por ejemplo, se ha encontrado que las hifas de *Trametes versicolor* tienen un contenido de nitrógeno de 4% cuando crecen en cultivo con una relación C:N 2:1; pero tienen solamente 0,2% de contenido de nitrógeno cuando crecen en un medio con C:N de 1600:1. En condiciones deficientes de nitrógeno este hongo puede utilizar el nitrógeno, especialmente para la producción de enzimas extracelulares y componentes esenciales de la célula, y del mismo modo, recicla eficientemente el nitrógeno en su micelio (Deacon 2002).

Una característica morfológica común de los hongos de la pudrición de la madera es la presencia de capas extracelulares (envolturas hifales), que están compuestas de extensas estructuras de membrana y  $\beta$ -1,6-1,3 glucanos. Esta matriz probablemente juega un papel importante en la degradación, pero su función específica aún no se conoce. Un aislamiento de hongos de la pudrición diferentes a los de la madera producen envolturas hifales anormales y son incapaces de formar los glucanos mencionados anteriormente (Rayner & Boddy 1988). Se han identificado tres enzimas que degradan la celulosa en los hongos de la pudrición blanca: 1. Enzimas hidrolíticas, que incluyen glucanasas, que actúan sinérgicamente, y una glucosidasa; 2. Una enzima oxidativa, y 3. Una enzima oxidoreductasa (celobiosa deshidrogenasa) (Alexopoulos *et al* 1996).

Los hongos de la pudrición café no poseen el complejo sinérgico endo-/exo-glucanasas que sí poseen los de la pudrición blanca; poseen enzimas hidrolíticas, endoglucanasas y complejos polipéptido que actúan sobre celulosas y hemicelulosas. Las enzimas degradadoras de carbohidratos de los hongos de la pudrición café difieren de los hongos de la pudrición blanca en que son multifuncionales y no poseen especificidad (Alexopoulos *et al.* 1996). De otro lado, los hongos de la pudrición café reducen rápida y drásticamente la fuerza en fases tempranas del proceso, mientras los hongos de la pudrición blanca causan un decrecimiento más lento y progresivo (Jasalavich *et al.* 2000).

## **2.2. Madera y descomposición**

Los bosques representan aproximadamente el 27% del área terrestre en el mundo, y en estos, la madera es el producto comercial predominante (Martínez *et al.* 2005), siendo un material valioso de gran valor e importancia en la economía mundial. Este es usado extensivamente como material estructural, combustible o materia prima de la industria en muchos países. Como fuente de material renovable está disponible en grandes cantidades a precios relativamente bajos (Zabel & Morrell 1992). En Colombia el promedio anual de consumo de madera en bruto es de 11.554.028 m<sup>3</sup>

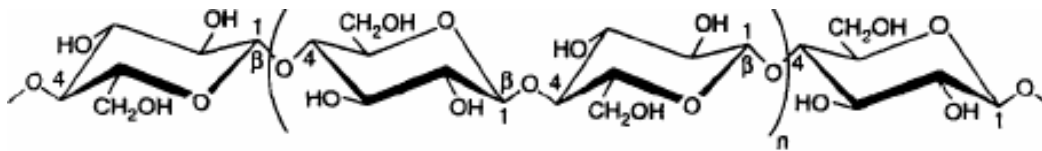
(Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas Colombia 2005).

Como material estructural la madera tiene una gran fuerza por unidad de peso. Es una fuente de energía conveniente y una de las más baratas fuentes de celulosa y sus derivados para la industria química. Los patrones de color y textura de las maderas son muy usadas para la decoración (Zabel & Morrell 1992).

La madera es uno de los materiales más resistentes a la degradación biológica y, su resistencia se debe a su arreglo anatómico y a su composición química. Esta se compone principalmente de celulosa (40-50% peso seco), hemicelulosas (25-40%) y lignina (20-35%), con muy bajos niveles de azúcares disponibles que pueden ser atacados por protozoos, bacterias y hongos de diferentes grupos taxonómicos. Tiene un muy bajo contenido de nitrógeno (en general, una relación C:N de 500:1) y un bajo contenido de fósforo. También contiene componentes potencialmente tóxicos para los hongos. En árboles latifoliados generalmente se encuentran taninos, mientras que en coníferas se encuentran compuestos fenólicos como terpenos, estilbenos, flavonoides y tropolones (Deacon 2002).

Los componentes estructurales de la pared celular forman las fuentes de carbono disponible para el crecimiento de los hongos en la madera. Los principales tipos son celulosa, hemicelulosa y lignina, cada una de las cuales pueden ser utilizadas por diferentes tipos de hongos (Rayner & Boddy 1988).

La celulosa (Figura 1) es el polímero individual más importante de las plantas, constituyendo entre el 40% y 50% de la pared celular de la planta madura. Consiste en un único monómero, la glucosa, unida por enlace  $\beta(1-4)$ . Una molécula de celulosa consiste en cadenas lineales de alrededor de 3.000 unidades de glucosa, que pueden encontrarse al azar (celulosa amorfa) o en apretadas microfibrillas (celulosa cristalina) (Wainwright 1995).

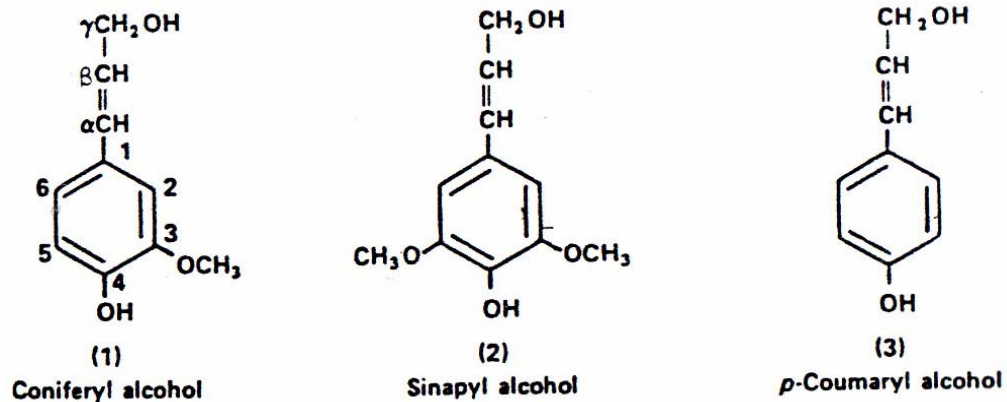


**Figura 1. Estructura de la celulosa (Tomado de Kirk and Cullen 1998)**

Otro de los componentes estructurales de la pared celular de la madera son las hemicelulosas un grupo de heteropolisacáridos altamente ramificados unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Constituyen el 25-30% de la composición total de la madera (Alexander 1980). La hemicelulosa es parte estructural del material de las paredes de las plantas terrestres y de agua dulce y, de la cascarilla externa (salvado) de las semillas, cereales íntegros y frutas. Está compuesta por diversos azúcares como: pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa), ácidos urónicos (ácido glucurónico y galacturónico) y galactanos en madera elástica de las ramas de ciertos árboles. Está constituida por unidades de galactosa. Pueden tener enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4. Se ha sugerido que las hemicelulosas, en asociación con la celulosa, determina la organización de la lignina (Kirk & Cullen 1998).

La lignina es el segundo polímero natural más abundante en el planeta después de la celulosa (Figura 3). Sin embargo, es más resistente a la descomposición que la celulosa. La molécula de la lignina es un polímero complejo tridimensional formado por tres bloques principales (Figura2): los cinnamil alcoholes, que tienen una estructura fenil-propano (C6-C3): coniferil alcohol, sinapil alcohol y cumaril alcohol. Estos están unidos bien por uniones  $-C-C-$  o por uniones  $-C-O-C$  entre dos anillos, dos cadenas laterales de propano o un anillo y una cadena lateral, y a veces existe más de una unión entre cualquiera de los dos bloques (Wainwright 1995). Es resistente a la degradación por muchos microorganismos, y de hecho, su papel primario en la pared celular de la madera es proteger los carbohidratos del ataque microbiano. La lignina es eficientemente degradada en la naturaleza principalmente por los hongos de la pudrición blanca. La lignina en gimnospermas está compuesta principalmente por coniferil alcohol, una menor cantidad de cumaril alcohol y no contiene sinapil alcohol. En angiospermas la lignina está constituida por cantidades

iguales de coniferil y sinapil alcohol (46% cada uno) y un 8% de cumaril alcohol (Glazer & Nikaido 1998).

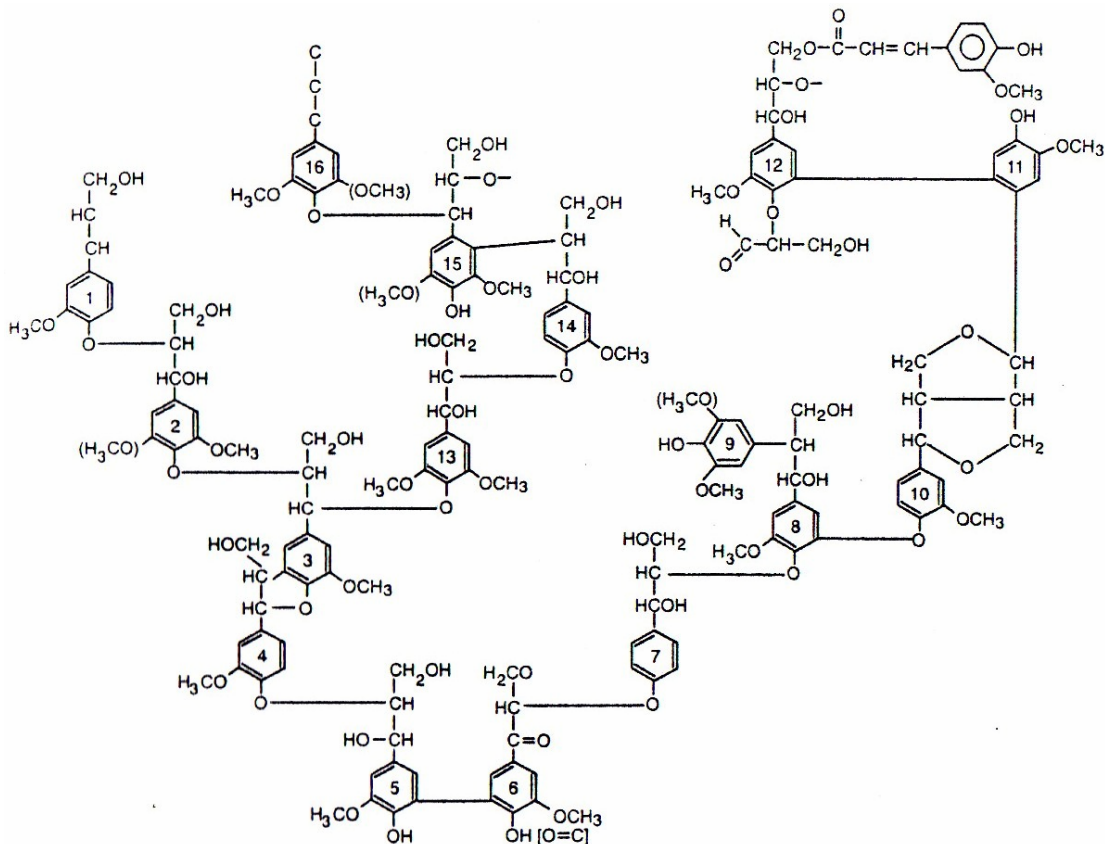


**Figura 2. Precursores directos de la degradación de la lignina (Markham & Bazin 1991)**

El proceso de descomposición de la madera desarrollado por los hongos es complejo y responde a interpretaciones físicoquímicas y bioquímicas. El hongo al establecerse en la madera, sea en el estado de rollizo o astilla, desarrolla hifas de 1 a 2  $\mu$  de diámetro colonizando rápidamente las paredes y lúmenes celulares, produciendo una transformación bioquímica con proyección física (Kirk & Cullen 1998). Esto causa un menor porcentaje de lignina en el tronco, una lignina que es modificada cualitativamente y una madera más porosa (Wainwright 1995).

La pudrición empieza cuando la hifa o el hongo de la pudrición penetra la madera, inicia la colonización, y libera las enzimas. En esta fase de colonización, el daño es limitado y aún no hay evidencias visibles. Esta etapa es llamada incipiente. A medida que se desarrolla el proceso de pudrición aparecen pequeños cambios en el color, en la textura de la madera, y pueden aparecer fibras quebradizas; estos cambios constituyen la fase temprana, cuando la pudrición es detectable, pero no obvia. A medida que el proceso de pudrición continúa a la fase intermedia, hay

evidentes cambios de color y textura en la madera, pero el grosor de la estructura permanece aún intacto. La fase tardía es cuando hay un rompimiento total de la estructura de la madera y la madera residual se vuelve blancuzca y de mala calidad (Zabel & Morrell 1992).



**Figura 3. Estructura de la lignina (Penttila & Saloheimo 1999)**

Los hongos de la pudrición blanca atacan y metabolizan la mayor parte de los constituyentes de la madera. De acuerdo a esto, los hongos de la pudrición blanca son los únicos microorganismos capaces de despolimerizar y metabolizar la lignina (Bushwell 1991). Una característica general de la utilización de los constituyentes de la madera por los hongos de la pudrición blanca es que todos los componentes de la pared celular son totalmente consumidos, con excepción de los minerales. En

muchos casos, las hemicelulosas son utilizadas preferiblemente en las primeras fases de pudrición. Las pérdidas de peso son de aproximadamente del 95-97% cuando se exponen prolongadamente bajo condiciones óptimas para que se lleven a cabo las reacciones de pudrición.

A medida que los microorganismos habitantes de la madera la invaden y la colonizan, ocurren muchos cambios en un amplio rango de propiedades mecánicas y físicas. Estos cambios incluyen fuerza reducida, pérdida de peso, higroscopicidad e incremento en la permeabilidad (González 1996).

### **2.3. Actividad enzimática**

La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y la hemicelulosa contra el ataque enzimático. Existe una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de la lignina el número de organismos se limita únicamente a los hongos de la pudrición blanca (Saparrat *et al.* 2002).

Aunque la lignina tiene un contenido de energía más alto que los carbohidratos, estos microorganismos no pueden utilizar la lignina como fuente de carbono y energía (Henriksson *et al.* 2000). La degradación de la lignina es prerrequisito para poder acceder a los carbohidratos presentes en la pared celular y utilizarlas como principal fuente de carbono y energía (Aro *et al.* 2005) mediante un complejo de enzimas oxidasas y peroxidasas que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas (Cullen & Kersten 2004); luego hay una incorporación de estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo que dan como producto final CO<sub>2</sub> (Papinutti 2003).

La producción de enzimas ligninolíticas en los hongos de la pudrición blanca como principales degradadores de la madera depende de factores controladores como: humedad, temperatura y calidad del sustrato. La interdependencia de estos factores

es compleja y los estudios que se han realizado se han enfocado en evaluar un sólo factor mediante pruebas de laboratorio. Aún no se conoce cuál factor de los nombrados anteriormente tiene más influencia en el proceso de descomposición (Mackensen *et al.* 2003); sin embargo, la actividad enzimática la determina la composición química del tronco (Fernandes *et al.* 2005).

Dentro de las características de los troncos se encuentra la temperatura de éstos, la cual está muy influenciada por factores como la temperatura del ambiente, contenido de humedad y diámetro del tronco. Generalmente los hongos de la pudrición son mesófilos, crecen en un rango de 0-45°C y su temperatura óptima es entre 20 y 30°C (Rayner & Boddy 1988).

El contenido de humedad de la madera está negativamente relacionado con la densidad. Así, a mayor estado de descomposición disminuye la densidad del tronco y el contenido de humedad se incrementa. Aunque los procesos de descomposición generalmente son proporcionales al contenido de humedad del sustrato, la descomposición se retarda en troncos con una humedad alta, donde la disponibilidad de oxígeno es limitada y se obstruye el crecimiento de los hongos (Rayner & Boddy 1988). Las maderas con menos del 20% de contenido de humedad son inmunes al ataque por los hongos. Sin embargo, con contenidos de humedad por encima de este valor, el riesgo de descomposición por hongos aumenta dramáticamente y el contenido de humedad se hace óptimo hacia aproximadamente el 30-50% (Wainwright 1995).

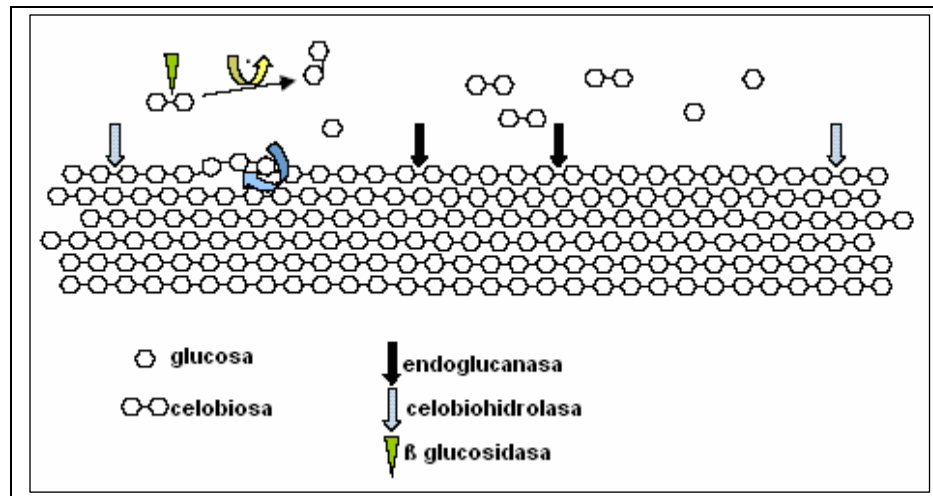
La tasa de descomposición también depende del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa del tronco. Las enzimas ligninolíticas actúan efectivamente cuando el sustrato tiene una alta relación carbono-nitrógeno (Rayner & Boddy 1988). La expresión de estas enzimas también se encuentra condicionada por nutrientes como el nitrógeno, el manganeso y el cobre (Godio *et al.* 2000).

La habilidad de degradar la lignina depende de varias enzimas. Las más importantes son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, dependiendo de la especie y del sustrato (Fernandes *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de los hongos de la pudrición blanca poseen la enzima lacasa (Saparrat *et*

*al.* 2002). La vía metabólica realizada por varios de los hongos de la podredumbre blanca, inicia por la mediación de la enzima lignina peroxidasa (LiP), la cual rompe enlaces C-C o enlaces éter (C-O-C) de las cadenas arilpropano formando en algunos casos monolignoles como el ácido ferúlico, que luego por la acción de enzimas peroxidadas (LiP y MnP) pasa a vainillina. Además de monolignoles, pueden generarse dilignoles u oligolignoles sobre los que actúa de nuevo la enzima LiP rompiendo los enlaces éter para dar origen a nuevos monolignoles, entre los cuales se encuentra el alcohol coniferílico, que al oxidarse forma coniferil aldehído. También se encuentra el guaiacil glicerol, que al oxidarse forma ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil pirúvico. Cada una de estas dos moléculas al sufrir una descarboxilación oxidativa, da origen a una molécula de vainillina, la cual sufre una nueva descarboxilación oxidativa, convirtiéndose en ácido vainillínico. Sobre esta molécula actúa la enzima lacasa realizando un proceso de demetilación para dar origen al ácido protocatéquico. Este, al sufrir una oxidación mediada por LiP y oxigenasas, pasa a ácido  $\beta$ -carboxi-cis,cis-mucónico, que al oxidarse, forma el ácido  $\beta$ -oxiadípico. El ácido  $\beta$ -oxiadípico a su vez sufre una hidrólisis que rompe los enlaces C-C para formar ácido acético, el cuál entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) convirtiéndose en acetil-CoA. Como producto final de este ciclo generan CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Glazer & Nikaido 1998, Wagner & Wolf 1998).

La degradación de la celulosa en los hongos de la pudrición blanca se lleva a cabo por la acción sinérgica de tres tipos de enzimas (figura 2): las exoglucanasas (celobiohidrolasas), endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Wood & Campayo 1990). Las endoglucanasas hidrolizan las cadenas de celulosa a unidades más pequeñas, como el dímero celobiosa y el trímero celotriosa. La celobiosa es luego cortada por la  $\beta$ -glucosidasa y la glucosa libre puede ser tomada por la célula como fuente de carbono. La degradación de la celulosa cristalina que existe naturalmente supone la acción de la exo- $\beta$ -glucanasa, que escinde dos unidades sucesivas de azúcares (celobiosa de los extremos de las cadenas de celulosa) (Wainwright 1995). Además de estas enzimas de tipo hidrolasa la mayoría de los hongos de la pudrición poseen una enzima tipo deshidrogenasa (Wood & Campayo 1990), que lleva a cabo reacciones de oxido-reducción, llamada celobiosa deshidrogenasa (CDH), de la cual se ha reportado que también juega un papel importante en la degradación de la lignina (Henriksson *et al* 2000). Debido a la estrecha relación que tiene la CDH con

las enzimas que actúan en la degradación de la lignina, no se hablará de las celulasas tipo hidrolasa.



**Figura 4. Degradación de la celulosa. Se muestran los sitios de actividad de las enzimas hidrolíticas de la celulosa (Tomado de Aro *et al.* 2004).**

El rompimiento de la celulosa raramente ocurre como un proceso aislado; hace parte de un ataque complejo compuesto de celulosa con lignina y hemicelulosa. Es esencial la acción combinada de enzimas extracelulares con especificidades complementarias (Beguin & Aubert 1994).

### **2.3.1. Mediadores en la degradación de la lignina**

El tamaño molecular de las enzimas degradadoras de madera no permite la completa penetración del hongo (Cullen & Kersten 2004). Existen mediadores de bajo peso molecular de origen intracelular o extracelular que migran hacia las enzimas y oxidan la lignina o la madera. Los precursores de mediadores internos son producidos como resultado del metabolismo de maduración del hongo con la participación de enzimas de degradación de lignina (Zabel & Morrell 1992).

Los mediadores de las enzimas degradadoras de lignina pueden actuar como oxidantes-donadores de un electrón, capaces de penetrar y reaccionar dentro de las regiones internas del polímero de la lignina (Glazer & Nikaido 1998). El veratrol, oxalato, malato y fumarato son producidos como resultado del metabolismo de hongos y su producción causa una colonización y degradación más efectiva en la madera que de otros microorganismos, al ser inductores de enzimas ligninolíticas (Alexander 1980).

Según Zabel *et al.* (1992) se ha encontrado que el crecimiento del micelio sobre troncos y degradación de lignina está relacionada con la cooperación de varias enzimas, como por ejemplo, la celobiosa deshidrogenasa, que coopera con la lacasa y celulasas en la despolimerización de componentes del complejo ligninocelulósico. El metabolismo de estos componentes por combinación de reacciones de óxido reducción dirige la completa degradación de la lignina a dióxido de carbono y agua (Glazer & Nikaido 1998).

Ácidos aromáticos (tales como el ácido vainillínico) derivados del rompimiento de la lignina son tomados por el micelio y degradados además por dioxigenasas que funcionan en el metabolismo de ácidos aromáticos simples. Las dioxigenasas catalizadas por reacciones de rompimiento de anillos aromáticos forman cetoácidos que rápidamente entran en el ciclo de Krebs (Zabel *et al.* 1992).

Una de las enzimas ligninolíticas más frecuentes en los hongos descomponedores de madera es la lacasa (Baldrian 2006). Las lacasas fúngicas han sido ampliamente estudiadas por Thurston (1994), así como su papel en la deslignificación (Youn *et al.* 1995). Las lacasas han sido de gran interés al ser capaces de degradar la lignina aún en ausencia de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (Mayer & Staples 2002). Por ello, un gran número de estudios ha venido demostrando la participación de la lacasa en muchos eventos de degradación de lignina que antes se atribuían a otras enzimas ligninolíticas (Saparrat *et al.* 2002).

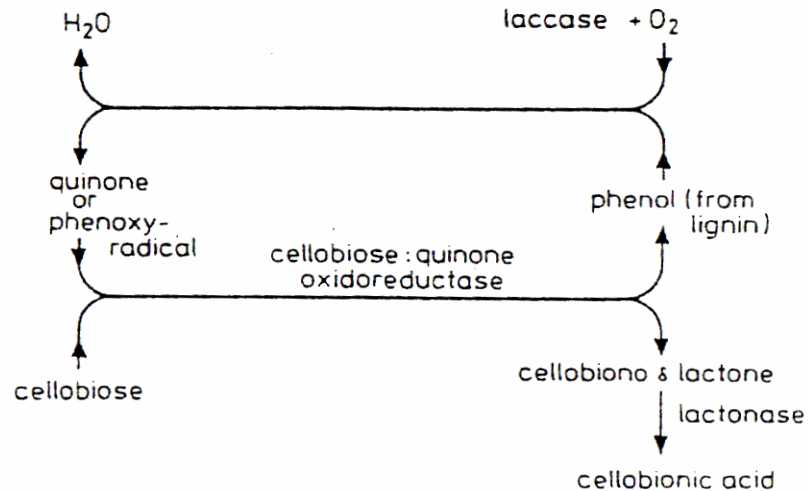
La lacasa puede funcionar como unión de una cadena de transporte de electrones extracelular (Zabel *et al.* 1992). Esta es una enzima extracelular, que contiene cobre y es capaz de oxidar polifenoles; además es capaz de oxidar compuestos no

fenólicos en la presencia de un mediador redox como el 1-hidroxibenzo-triazol (1-HBT) o 2,2-azino bis [ácido 3-etilbenzothiazolil-ne-6-sulfónico] o ácido violúrico (Bourbonnais *et al.* 1997). También cataliza la remoción de un átomo de hidrógeno de grupo hidroxilo que se puede encontrar en posición orto- o para- de sustratos monofenólicos o polifenólicos y de las aminas aromáticas por la remoción de un electrón, dejando un radical libre por donde se inicia la futura despolimerización, formación de quinonas, metilación o demetilación de oligómeros que son producidos por las peroxidasas y degradando fragmentos de bajo peso molecular. Está involucrada en la producción del ión superóxido y cataliza la reducción de oxígeno a agua. Se ha encontrado que el aumento de la actividad de la lacasa sobre diferentes sustratos se ve inducida por pequeñas concentraciones de compuestos hidrosolubles (fenoles, compuestos de bajo peso molecular y macromoléculas que contengan grupos fenólicos) provenientes de la lignina o fracciones de lignocelulosa (Saparrat *et al.* 2002). Hongos como *Pycnoporus cinnabarinus* no producen LiP ni MnP, sólo lacasa, que es esencial para la degradación de la lignina. Sin embargo, sólo la lacasa no puede degradar la lignina. Se han realizado estudios que demuestran que la celobiosa deshidrogenasa (CDH) forma un complejo con la lacasa para la degradación de la lignina (Sigoillot *et al.* 2002).

### **2.3.1.2. Celobiosa deshidrogenasa**

La celobiosa deshidrogenasa (CDH) fue aislada por primera vez del hongo *Sporotrichum pulverulentum*, forma imperfecta de *Phanaerochaete chrysosporium*, por Westermarck y Eriksson en 1974. Ellos encontraron que los halos que se encontraban en cajas de agar que contenían lignina como producto de la acción de la lacasa y de peroxidasas, disminuía cuando la fuente de carbono era celulosa o celobiosa. Esto sucedía debido a una reducción de las quinonas. La enzima responsable de esta reducción era una flavoproteína que se llamó inicialmente celobiosa: quinona oxidorreductasa (CBQR); posteriormente se hallaron seis hongos de la pudrición blanca que tenían actividad similar (Cameron & Aust 2001). A comienzo de los noventa se propuso el nombre celobiosa deshidrogenasa, ya que el grupo alcohol de la celobiosa se oxida a aldehído, y el oxígeno es un sustrato muy pobre para esta enzima. Aunque ya se conocen muchas características de ella

y se sabe que cumple un papel importante al participar en la degradación de la lignocelulosa, aún no se ha determinado con claridad su función (Henriksson *et al.* 2000, Cameron & Aust 2001).



**Figura 5. Mecanismo de reacción de la enzima celobiosa deshidrogenasa por la reducción de quinonas. Tomado de: Westermark & Eriksson 1988.**

La celobiosa deshidrogenasa (CDH) es una enzima de 90 kDa que contiene dos dominios distintos: un dominio flavina, que contiene FAD, y un dominio hemo que contiene un citocromo b tipo hemo. La CDH es una enzima muy estable con respecto a pH y temperatura ya que tiene buena actividad en un rango de 3 a 10; sin embargo el pH ideal es de 3 a 5 (Cameron & Aust 2001).

La celobiosa deshidrogenasa reduce un amplio rango de aceptores de electrones, los cuales se dividen en dos categorías: aceptores de uno y de dos electrones. Los aceptores de un electrón para la CDH los hay de dos clases, radicales oxidativos y metales de transición. Los aceptores de dos electrones son principalmente quinonas a excepción del oxígeno y la triidona (Cameron & Aust 2001).

La CDH incrementa la acción de las celulasas aumentando la degradación de la celulosa, los radicales hidroxilo producidos por la CDH rompen la celulosa, permitiendo a las exoglucosidasas degradar la celulosa no sólo por los extremos terminales sino también internamente (Cameron & Aust 2001). Esta enzima oxida principalmente la celobiosa a celobiono-1,5-lactona (Henriksson *et al.* 2000, Temp & Eggert 1999). La producción de la CDH se estimula por la presencia de celulosa como principal fuente de carbono (Vallim *et al.* 1998)

Se ha demostrado que la CDH degrada celulosa y lignina en presencia de iones de hierro quelado y peróxido de hidrógeno. Por medio de la oxidación de la celobiosa reduce Fe(III) a Fe(II), o Cu(II) a Cu(I) y la reacción entre los elementos reducidos genera radicales hidroxilo. Estos radicales altamente reactivos pueden modificar y despolimerizar la celulosa, hemicelulosa y lignina (Henriksson *et al.* 2000). Además, estos radicales están involucrados en la demetilación de la lignina transformando unidades no fenólicas en fenólicas, facilitando así la degradación por enzimas oxidativas como la lacasa. Se ha demostrado que la CDH es una enzima clave para la lacasa en hongos como *Pycnoporus* (Figura 5) (Sigoillot *et al.* 2002).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1. Planteamiento del problema**

La madera es un importante recurso natural renovable y biodegradable que tiene gran cantidad de usos. Los únicos descomponedores bióticos primarios de la madera son los hongos, que pueden atacar y degradar este recurso. En los bosques los hongos juegan un papel primordial en el ciclo del carbono y del nitrógeno y ayudan a convertir los detritos orgánicos en capas de humus en el suelo que liberan nutrientes, los cuales pueden ser absorbidos por las plantas. Los hongos de la pudrición son esenciales en cualquier ecosistema, al ser los únicos descomponedores de madera por poseer un especializado complejo enzimático que degrada lignina y celulosa hasta su total mineralización, dentro de las que se encuentran enzimas tipo peroxidasa y tipo oxidasa principalmente.

El grado de descomposición de la lignina y la celulosa depende en gran parte de las condiciones ambientales y de las especies presentes de hongos. A pesar de su gran importancia, no se conoce con claridad si las especies de macromicetos cambian como respuesta al grado de descomposición de la madera, y de las condiciones climáticas del ambiente. Por ello, es esencial aislar y estudiar los hongos nativos de la pudrición y establecer una relación entre estos, su actividad enzimática y los factores climáticos del ambiente y el estado de descomposición de la madera que colonizan.

En Colombia, el bosque subandino ha sido transformado fuertemente por el hombre al sobreexplotar sus suelos, desconociendo la funcionalidad de los hongos presentes en este tipo de bosque. La pérdida de este recurso por falta de estudios genera retraso científico y económico por cuanto es parte de los organismos nativos de nuestro país, que pueden ser aprovechados en la industria, debido a su capacidad enzimática.

### 3.2. Justificación

Los hongos descomponedores de madera son capaces de degradar los tres componentes de la lignocelulosa: lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa, contra el ataque enzimático (Papinutti *et al* 2003). Debido a la hidrofobicidad y a su compleja estructura carente de uniones hidrolizables, la lignina no es un sustrato disponible para la mayoría de microorganismos degradadores de celulosa. Los hongos de la pudrición blanca son capaces de realizar una eficiente despolimerización y mineralización de la lignina (Aro *et al.* 2004); de hecho, estos hongos son los únicos organismos reportados hasta el momento capaces de degradar totalmente la lignina (Shin & Lee 2000).

Es difícil cuantificar las pérdidas causadas por la pudrición debido a los múltiples usos de la madera bajo un amplio rango de condiciones ambientales. Por otro lado, los hongos de la pudrición blanca han sido motivo de investigación en todo el mundo debido al uso potencial de sus enzimas en procesos de biopulpeo, bioblanqueamiento del papel, decoloración de tintes y textiles y detoxificación de compuestos recalcitrantes.

En la actualidad en Colombia el bosque subandino original está casi ausente. En la zona del Quindío, las actividades agropecuarias han tenido una amplia cobertura y profunda consolidación, convirtiéndose a su vez en el mayor eje de presión y exterminio de la riqueza natural de la zona, por lo que hoy sólo queda de un 20-30% del área con cobertura vegetal natural (Universidad del Quindío, 1997), lo que lleva a un exterminio de biodiversidad presente dentro de este ecosistema. Hay poco conocimiento de los hongos nativos presentes y, no se conoce la relación de estos con procesos como la descomposición de la madera, la cual es muy importante dentro del ciclo del carbono.

Es necesario establecer qué hongos nativos se encuentran en el bosque subandino y poderlos conservar *ex situ*, ya que son parte esencial del funcionamiento del ecosistema, como base para, evaluar posteriormente sus posibles aplicaciones a nivel industrial y biotecnológico.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general:**

- Evaluar la actividad enzimática de la lacasa y celobiosa deshidrogenasa de hongos en bosque subandino causantes de la pudrición blanca, que colonizan troncos caídos en La Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya (Quindío) y establecer su relación con el estado de descomposición de los troncos.

### **4.2. Objetivos específicos:**

- Cultivar hongos de bosque de la pudrición blanca con potencial enzimático para la degradación de celulosa y lignina.
- Cuantificar mediante la técnica de ABTS la actividad de la lacasa de hongos de la pudrición blanca que colonizan los troncos de madera.
- Cuantificar mediante la técnica de diclorofenol indofenol (DCPIP) la actividad de la celobiosa deshidrogenasa de hongos de la pudrición blanca que colonizan los troncos de madera en bosque.
- Comparar la actividad de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa de los hongos evaluados provenientes de troncos con diferente estado de descomposición.
- Establecer la relación existente entre la actividad enzimática y el estado de descomposición de los troncos colonizados por los hongos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.4. Área de estudio**

El estudio se realizó en dos fragmentos de bosque subandino (Ocaso y Veraguas) ubicados en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, en el municipio de Quimbaya (Quindío, Colombia) a una altitud que oscila entre 975 y 1100 m. Los fragmentos tienen un área de 106 y 40 fanegadas, respectivamente y se encuentran localizadas en la vereda El Laurel al sur del Municipio, en un área que yace en la confluencia del río Roble con el río La Vieja. Sus límites son: al norte: Haciendas La Cascada, El Dobaide y La Floresta, al sur: Río Roble, al este: Hacienda La Española, y al oeste: el río de La Vieja. Esta Reserva hace parte del valle interandino del río Cauca, ubicado entre las cordilleras Central y Occidental de la región Andina colombiana. Su precipitación media es de 1691 mm/año y una temperatura media de 24°C (Universidad del Quindío, 1997).

### **5.5. Recolección de ejemplares**

Se tomaron muestras de hongos presentes en troncos caídos trazando transectos en cada fragmento de bosque de la Reserva La Montaña del Ocaso. Los transectos trazados fueron de 100 m<sup>2</sup> y dentro de estos se encontraban seis parcelas de (20 x 5 m) paralelas entre sí desde el borde del bosque hasta aproximadamente los 100 m hacia el interior.

En cada tronco se colectaron los hongos presentes (carpóforos visibles) con una navaja, conservando fragmentos del tronco como sustrato. Los hongos se envolvieron en papel parafinado para conservar los carpóforos frágiles y en bolsas plásticas con sello hermético para carpóforos voluminosos, resistentes y de consistencia leñosa (British Mycological Society 2004). Se seleccionaron los hongos que se encontraron con mayor frecuencia y en diferentes estados de descomposición dentro de los transectos estudiados para evaluar la actividad enzimática de cada uno de ellos de acuerdo a su estado de descomposición.

En el momento de la colecta de los hongos se determinaron las condiciones de humedad y estado de descomposición de los troncos colonizados por los hongos de la pudrición.

La información necesaria sobre el área de estudio, así como el apoyo logístico para las visitas al área de estudio fueron suministradas por el CIBUQ (Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad) de la Universidad del Quindío.

### **5.5.1. Determinación de humedad de los troncos**

La humedad interna de los troncos se estimó con un medidor de humedad, el cual registra los datos en una escala de 1 a 10. De acuerdo a esto se establecieron los siguientes rangos (Ramírez 2002).

- De 1 a 2,9: baja humedad
- De 3 a 4,9: humedad media
- De 5 a 10: humedad alta

### **5.2.2. Determinación de estado de descomposición de los troncos**

Después de haber realizado el muestreo de los hongos se introdujo una varilla de 25 cm de largo en los troncos colonizados para determinar el estado de descomposición (Kruys 1999). Se definieron cinco estados de descomposición de acuerdo a la penetración de la varilla y estado del tronco (Siitonen *et al.* 2005):

Estado 1: el cuchillo penetra unos pocos milímetros del tronco y la madera permanece intacta.

Estado 2: el cuchillo penetra unos pocos milímetros del tronco y la madera empieza a romperse.

Estado 3: el cuchillo penetra de 1 a 2 cm el tronco, la madera se rompe más.

Estado 4: el cuchillo penetra de 2 a 5 cm fácilmente. Algunas partes del tronco se quiebran con facilidad.

Estado 5: el cuchillo penetra todo el tronco. La madera esta totalmente descompuesta.

## **5.6. Aislamiento y condiciones de cultivo**

Para el aislamiento se seleccionaron los hongos más frecuentes en cada estado de descomposición. Se realizó una desinfección de los carpóforos con hipoclorito de sodio al 5% (v/v), alcohol etílico al 70% (v/v) y agua destilada estéril y posteriormente se sembró una porción de cada uno, cortada con una cuchilla, en agar extracto de malta al 2% (p/v) suplementado con extracto de levadura al 0,4% (p/v) (Nazareno *et al.* 2002). Las cajas se llevaron a incubar a 25°C por 8 días. Una vez aislados se mantuvieron a 4°C, en tubo inclinado con este mismo medio.

## **5.7. Pruebas cualitativas de actividad enzimática**

Se realizaron pruebas cualitativas para seleccionar los hongos que tenían actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa (CDH) tomando un disco de agar de los hongos aislados en el medio extracto de malta con un diámetro de 0,5 cm, que se colocó en forma de sandwich sobre el medio agarizado. Para la selección de los hongos con actividad lacasa estos se sembraron en un medio reportado por Ha *et al.* (2001) modificado cuya composición (p/v) es: 1% de celulosa, 0,5% de peptona, 0,2% de extracto de levadura, 0,0075% de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,01% de  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g de ABTS [2,2' azino-bis-(3 ethyl benzthiazoline sulphato acid)] y 2% de agar-agar, disuelto en una solución de extracto de salvado de trigo, previamente preparado por extracción inmediata de 175 g de salvado de trigo con 1000 ml de agua destilada. El pH se ajustó a 5,8-6,0 con la adición de las sales  $KH_2PO_4$  al 0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al 0,05%. El ABTS se utilizó como inductor enzimático. La actividad lacasa se calculó por el diámetro de los halos de oxidación de ABTS en el medio (Herrera & Rosas

2003). Como control negativo se utilizó una placa de agar con la misma composición del medio sin inocular.

Para identificar los hongos con actividad celobiosa deshidrogenasa se sembraron en este mismo medio pero se utilizó como inductor enzimático 1mM de diclorofenolindofenol (DCPIP). La actividad CDH se evidenció por la presencia de halos incoloros en el agar alrededor de las colonias, como consecuencia de la reducción del DCPIP durante la oxidación de la celobiosa por esta enzima. La actividad enzimática se cuantificó de acuerdo al diámetro del halo, con la cual está directamente relacionado: a mayor diámetro mayor actividad enzimática (Ghahfarokhi *et al.* 2004). Como control negativo se utilizó una placa de agar con la misma composición del medio sin inocular.

La temperatura de incubación fue de 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días, evaluándose el cambio de color en los medios de cultivo, indicativo de actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa para cada caso.

## **5.5. Fermentación discontinua**

A partir de los cultivos sembrados previamente en agar extracto de salvado de trigo durante 8 días a 25°C, se seleccionaron los hongos que presentaron mayor actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa (uno por cada estado de descomposición). Así como lo han reportado varios autores, se tomaron tres discos de agar con los respectivos hongos crecidos de 10 mm de diámetro (D'Souza *et al.* 1996), los cuales fueron inoculados en erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio extracto de salvado de trigo. El pH se ajustó a  $6.0 \pm 0.2$  (D'Souza *et al.* 1996). Se realizaron fermentaciones para cada hongo por triplicado, durante 10 días en agitación continua a 150 rpm y a una temperatura de  $29 \pm 1$  °C (Guillén-Navarro *et al.* 1998). Se tomaron muestras cada 24 horas verificando la pureza mediante coloración de Gram y azul de lactofenol. Se realizaron mediciones de pH y se tomaron muestras a las cuales se les realizó una centrifugación a 10000 rpm durante 25 minutos y a partir del sobrenadante se determinó el consumo de sustrato, la cantidad de proteínas extracelulares y se cuantificó la actividad

enzimática de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa. El pellet se utilizó para la determinación de biomasa. Las anteriores mediciones se realizaron por triplicado.

### **5.5.3. Determinación de biomasa**

A partir de 50 mg de micelio seco homogenizado se realizó una hidrólisis alcalina con 1 ml de NaOH 1N. Esto se llevó a un baño termostatado a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante recuperado se utilizó para cuantificar las proteínas del micelio mediante la técnica de Bradford (1976).

Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de proteínas de micelio por ml de medio (Forchiassin 2005).

### **5.5.2. Determinación de glucosa liberada en el medio**

La determinación de glucosa liberada en el medio se realizó mediante la técnica de DNS, ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller 1959) a partir de las muestras tomadas diariamente. El reactivo DNS se preparó depositando en un vaso de precipitado 50 ml de agua destilada para disolver el hidróxido de sodio en agitación continua mediante plancha magnética. Luego se adicionó lentamente el tartrato de sodio y de potasio hasta que se disolvió por completo. El vaso de precipitado se cubrió con papel aluminio y se agregó lentamente el DNS, completando con agua destilada hasta 100 ml en un balón aforado. Se dejó en agitación toda la noche en un frasco ámbar (Pedroza *et al.* 2003).

Después de centrifugar en cada período de la fermentación se tomaron 0,25 ml del sobrenadante y se agregaron a tubos que contenían 0,25 ml del reactivo de DNS; el blanco contenía 0,25 ml del reactivo. Los tubos se mantuvieron protegidos de la luz con papel aluminio. Se llevaron a ebullición quitándoles el papel durante 5 minutos y la reacción se frenó con hielo por 5 minutos. Luego se le adicionaron 2,5 ml de agua destilada a las diferentes muestras y al blanco 2,75 ml. Las mediciones se realizaron

determinando la absorbancia a 540 nm, ajustando el cero de la absorbancia con el blanco de la prueba (Pedroza *et al.* 2003).

Para la realización de la curva patrón se midieron diferentes concentraciones a partir de una solución de glucosa de 2 g l<sup>-1</sup>. A partir de esta se prepararon las concentraciones con un volumen final de 2 ml. Las concentraciones preparadas fueron 0,5 g l<sup>-1</sup>, 0,7 g l<sup>-1</sup>, 1 g l<sup>-1</sup>, 1,5 g l<sup>-1</sup>, 1,7 g l<sup>-1</sup> y 2 g l<sup>-1</sup>.

### 5.5.3. Determinación de la actividad enzimática de la lacasa

La actividad lacasa se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación de ABTS {2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)} usando como sustrato el catión radical ABTS<sup>+</sup>. Se tomaron 100 µl del sobrenadante (se ajustó a pH 4,5) y 2,5 de buffer acetato de sodio (pH 4,5), que contiene 0,5 mM de ABTS. La concentración de reacción fue 0,5 mM ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) en 100 mM buffer acetato de sodio pH 5. La actividad enzimática se halló calculando la absorbancia a 420 nm por 5 minutos a 30°C (Forchiassin 2005, Papinutti & Forchiassin 2000). El coeficiente de extinción del ABTS a una absorbancia de 420 nm sensibilidad alta es de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Para la determinación de las unidades enzimáticas de lacasa se utilizó la siguiente ecuación:

$$UL^{-1} = \frac{A \times V_t \times F_d}{t \times \epsilon \times V_m}$$

Fd = factor de dilución

ε = coeficiente de extinción molar de ABTS oxidado a 420 nm: 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

Vm = volumen de la muestra (ml)

Vt = Volumen total de la reacción

t= tiempo de reacción (min)

A = ΔAbs 420 nm= Abs final – Abs inicial

Una unidad de actividad lacasa se define como moles de producto  $\text{min}^{-1} \text{ l}^{-1}$  (Forchiassin 2005).

#### 8.5.4. Determinación de la actividad enzimática de la celobiosa deshidrogenasa

La determinación de la actividad celobiosa deshidrogenasa (CDH) se realizó espectrofotométricamente mediante de la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). La técnica se llevó a cabo tomando 150  $\mu\text{l}$  de DCPIP 2 mM en 50 mM de buffer acetato de sodio a pH 4,5, que contiene 1700  $\mu\text{l}$  de celobiosa 2,5 mM. Como inhibidor de la actividad lacasa se utilizó 100  $\mu\text{l}$  de fluoruro de sodio 4 mM y se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra. La lectura se realizó a 600 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El blanco contenía los reactivos anteriormente descritos pero a cambio de la muestra se completó el volumen total de reacción con 100  $\mu\text{l}$  de buffer acetato de sodio. La reacción se inició adicionando 100  $\mu\text{l}$  de la muestra y se monitoreó el descenso en la absorbancia durante 5 minutos a 37°C (Ghahfarokhi *et al.* 2004, Temp & Eggert 1999). Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$UCDH^{-1} = \frac{A \times Vt \times Fd}{t \times \epsilon \times Vm}$$

Vt = volumen total de la muestra (m)

Fd = factor de dilución

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de DCPIP reducido a 600 nm

Vm = volumen de la muestra (ml)

t = tiempo de reacción (min)

A =  $\Delta\text{Abs } 600 \text{ nm} = \text{Abs final} - \text{Abs inicial}$ .

Una unidad de actividad celobiosa deshidrogenasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 mmol de DCPIP/ min.l, bajo las condiciones de ensayo (Forchiassin 2005).

#### **8.5.5. Determinación de proteínas extracelulares**

La determinación de proteínas extracelulares se realizó mediante la técnica de Bradford. Las muestras tomadas diariamente se centrifugaron a 10000 rpm y a partir del sobrenadante obtenido se tomó 0,1 ml de este y se transfirió a tubos que contenían 5 ml del reactivo de Bradford. El blanco contenía el reactivo y 0,1 ml de NaCl 0,15 M. Los tubos se protegieron de la luz con papel aluminio y las mediciones se realizaron determinando la absorbancia a 595 nm y a una sensibilidad alta, ajustando el cero de absorbancia con el blanco (Bradford 1976). El reactivo de Bradford contenía 100 mg de azul de coomassie G-250, 50ml etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se completó a un volumen de un litro con agua destilada. Posteriormente el reactivo se dejó en agitación durante una noche (Pedroza *et al.* 2003)

La curva patrón se construyó con la preparación de una solución concentrada de albúmina de suero bovino (BSA)  $1000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , en NaCl 0,15M. Las concentraciones se prepararon a partir de la solución de BSA y NaCl 0,15M, con un volumen final de 1000  $\mu\text{l}$ ; se prepararon diferentes concentraciones de  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ,  $400 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ,  $600 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ,  $800 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  y  $900 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

## 8.6. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se llevó a cabo con un nivel de significancia de 0,05, utilizando el programa Statistica 6.0. Se realizaron regresiones lineales entre las variables obtenidas en las pruebas cualitativas de actividad enzimática y en la fermentación realizada de cada hongo de troncos con diferente estado de descomposición para conocer si existían diferencias entre las variables medidas, y se utilizaron pruebas *a posteriori* para conocer que variable de los hongos medidos tenía diferencias significativas respecto a las otras.

Para el análisis de las pruebas cualitativas se realizó un análisis de covarianza (Zar 1999) en donde se compararon las pendientes dadas a partir de los halos de actividad enzimática producidos por los hongos evaluados.

También se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (Siegel & Castellan 2001) para encontrar si existía relación entre la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos evaluados con el estado de descomposición de los troncos y, para evaluar la relación existente entre todas variables de la fermentación (biomasa, glucosa, proteínas extracelulares, actividad lacasa y actividad CDH).

Se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Friedman (Siegel & Castellan 2001) con el fin de conocer las diferencias existentes entre los hongos evaluados durante la fermentación para cada variable (biomasa, proteínas extracelulares, actividad lacasa y actividad CDH).

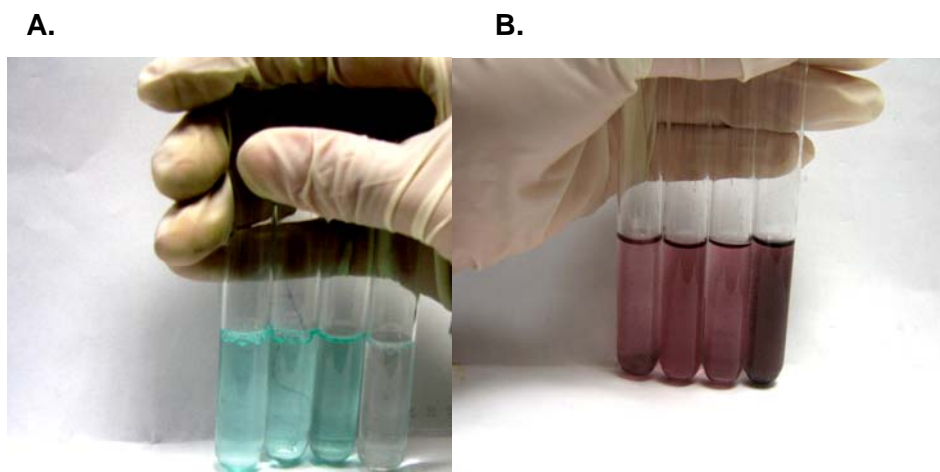
## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos recolectados se determinaron mediante claves taxonómicas, realizando cortes y observándolos al microscopio. Se tomaron carpóforos de 37 hongos, que correspondían a los más frecuentes en cada estado de descomposición dentro de los transectos trazados. De los hongos sembrados en agar extracto de malta, cuatro de estos no crecieron (Tabla 1).

**Tabla 1. Lista de hongos recolectados, estado de descomposición y crecimiento abundante (++) , crecimiento limitado (+) y ausencia de crecimiento (-).**

<b>Especie/Gènero/ Familia</b>	<b>Estado de descomposición</b>	<b>Crecimiento</b>
Corticiaceae	1	-
Corticiaceae	1	-
<i>Cookeina sulcipes</i>	1	++
<i>Cookeina tricholoma</i>	1	++
<i>Hypoxylon</i> sp.	1	++
Polyporaceae	1	-
<i>Phellinus</i> sp.	1	++
Corticiaceae	1	++
<i>Trametes</i> sp.	1	++
<i>Xylaria hypoxylon</i>	1	+
<i>Hypoxylon</i> sp.	2	+
<i>Phylacia poculiformis</i>	2	++
Corticiaceae	2	++
<i>Earliella</i> sp.	2	++
Polyporaceae	2	++
<i>Polyborus</i> sp.	2	++
<i>Xylaria polymorpha</i>	2	++
<i>Phellinus</i> sp.	3	++
Corticiaceae	3	+
<i>Trametes</i> sp.	3	+
<i>Earliella scabrosa</i>	3	++
<i>Earliella</i> sp.	3	++
Corticiaceae	3	++
<i>Trametes</i> sp.	3	++
<i>Xylaria polymorpha</i>	3	++

Especie/Gènero/ Familia	Estado de descomposición	Crecimiento
Corticiaceae	3	+
<i>Xylaria</i> sp.	3	+
Corticiaceae	4	+
<i>Ramaria</i> sp.	4	++
Corticiaceae	4	++
<i>Cookeina tricholoma</i>	5	+
<i>Ramaria</i> sp.	5	++
<i>Hypoxylon</i> sp.	5	+
<i>Mycobonia flava</i>	5	++
Corticiaceae	5	++
Agarical	3	++



**Figura 6. A. Prueba de la enzima lacasa por la técnica de oxidación de ABTS. B. Prueba de la enzima celobiosa deshidrogenasa por la técnica de reducción del DCPIP.**

Se seleccionaron los hongos aislados que tuvieron mayor crecimiento en el medio extracto de malta para evaluar la producción cualitativa de la actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa en medio extracto de salvado de trigo suplementado con los inductores ABTS y DCPIP respectivamente, midiendo

diariamente su diámetro de halo (mm). El ABTS evidenció la actividad lacasa por la formación de halos de color verdoso alrededor del micelio debido a la oxidación del ABTS al catión ABTS<sup>+</sup>. La actividad de la celobiosa deshidrogenasa se observó por la formación de halos de color amarillo claro como producto de la reacción de reducción del DCPIP. Los hongos que tuvieron mayor actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa fueron *Trametes* sp. y *Xylaria polymorpha* los cuales se encontraron en troncos con estado 3 de descomposición, y *Earliella* sp. que se encontraba en troncos con estado 4 de descomposición (Tabla 2).

En algunas placas de agar, se observaron secreciones de material mucilaginoso oleoso sobre el micelio. Esta secreción se conoce como envoltura hifal, la cual se encuentra extracelularmente en las hifas y se ha reportado la presencia de esta en muchos hongos de la pudrición blanca como lo son *Phanaerochaete cryosporium*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus lignosus* y *Phellinus noxius*. Esta matriz extracelular probablemente contribuye a la inmovilización de metales pesados (Fernandes *et al.* 2005)

A partir del día 5 se encontró en algunas placas de agar la presencia de un micelio aéreo blanco y algodonoso en todo el medio. En el día 6, este micelio empezó a presentar pigmentación amarilla-verdosa en algunas zonas (Figura 6). Se comprobó que estas placas de agar presentaban contaminación, al realizar una tinción de azul de lactofenol, en donde se identificaron principalmente estructuras típicas de *Trichoderma* sp. como conidióforos e hifas septadas, hialinas y filídes verticiladas. La tinción de Gram demostró ausencia de otros microorganismos.

Los hongos evaluados en las pruebas cualitativas que presentaron contaminación por *Trichoderma* fueron: *Hypoxylon* sp. en troncos con estado 1 de descomposición, un Polyporaceae en troncos con estado 2 de descomposición, *Phellinus* sp. y Agarical en troncos con estado 3 de descomposición, *Ramaria* sp. en troncos con estado 4 de descomposición y *Mycobonia flava* en troncos con estado 5 de descomposición. Los datos de estos hongos no se tomaron en cuenta para el análisis de resultados.

Algunos hongos como *Trichoderma* sp. están ecológicamente relacionados con hongos degradadores de madera, los cuales se ven afectados al interactuar con *Trichoderma*, incrementando la producción de lacasa (por ejemplo en algunos agaricales como *Lentinula edodes*) (Savoie *et al.* 1998), o inhibiendo su crecimiento y actividad enzimática en géneros como *Trametes versicolor*. Aunque la lacasa no tiene un efecto directo sobre los hongos del suelo (Baldrian 2004) probablemente actúa como método de defensa participando en la formación de melaninas y compuestos similares. Probablemente también puede contribuir en la degradación de antibióticos fenólicos que inhiben el crecimiento fúngico como el 2,4-diacetilflorogucinol (Baldrian 2006).

Sólo en algunas especies de *Trichoderma* se ha encontrado un bajo nivel de producción de una enzima oxidadora de syringaldazina, que tiene una función similar a la lacasa, principalmente asociada con los conidios y actúa en la morfogénesis de este hongo. Esta enzima no es capaz de oxidar el ABTS (Baldrian 2006), lo cual indica que la actividad enzimática de *Trichoderma* no afectaría directamente el desarrollo de los halos indicadores de actividad lacasa. Sin embargo se presentó una competencia por espacio que redujo el crecimiento de los hongos evaluados y también pudo afectar su actividad lacasa.

Aunque *Trichoderma* sp. presenta una actividad celulolítica significativa (Atlas & Bartha 2002), no hay reportes que indiquen que *Trichoderma* sp. posea actividad CDH, ya que sólo se conoce actividad celobiosa deshidrogenasa en los hongos de la pudrición blanca y algunos de la pudrición café. Sin embargo, *Trichoderma* sp. afectó el crecimiento y actividad celobiosa deshidrogenasa al competir con los hongos evaluados por espacio y sustrato y al tener una mayor tasa de crecimiento.

Probablemente los hongos recolectados se encontraban parasitados por *Trichoderma* sp. en el tronco. En condiciones naturales, los hongos de la pudrición blanca interactúan y compiten con otros microorganismos presentes en los troncos y en el suelo (Baldrian 2004). Algunas poblaciones de hongos degradadores de madera son parasitadas por micoparásitos como *Trichoderma* (Atlas & Bartha 2002). Esto indicaría que la desinfección realizada a los carpóforos de los hongos recolectados para su aislamiento no fue efectiva para todos. La contaminación se

evidenció sólo en las pruebas cualitativas y no durante el aislamiento; probablemente debido a la composición del medio extracto de salvado de trigo, ya que este contenía un alto porcentaje de celulosa y mayor contenido de nutrientes que el medio extracto de malta, lo cual favoreció el crecimiento de *Trichoderma* sp.

**Tabla 2. Evaluación de la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo con ABTS y DCPIP como inductores, a una temperatura de 28°C, durante 8 días.**

<b>Especie/Género/ Familia</b>	<b>Estado de descomposición</b>	<b>Tamaño de halo final de actividad lacasa (mm)</b>	<b>Tamaño de halo final de actividad CDH (mm)</b>
<i>Cookeina sulcipes</i>	1	16	17
<i>Cookeina tricholoma</i>	1	37	39
<i>Phellinus</i> sp.	1	14	13
Corticaceae	1	17	16
<i>Trametes</i> sp.	1	8	16
<i>Hypoxylon</i> sp.	2	15	12
Corticaceae	2	13	10
<i>Earliella</i> sp.	2	18	13
Corticaceae	2	16	12
<i>Xylaria polymorpha</i>	2	35	51
<i>Earliella scabrosa</i>	3	6	15
<i>Earliella</i> sp.	3	13	12
<i>Trametes</i> sp.	3	71	78
<i>Xylaria polymorpha</i>	3	84	82
<i>Earliella</i> sp.	4	20	90
<i>Ramaria</i> sp.	5	60	0
<i>Earliella</i> sp.	5	30	0

Al realizar el análisis estadístico de covarianza para comparar las tasas de actividad enzimática obtenidas con los resultados de la medición de los halos de actividad enzimática de las pruebas cualitativas de cada hongo en función del tiempo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los hongos evaluados para la tasa de producción de actividad lacasa ( $F= 102$ ,  $P < 0,05$ ,  $n= 290$ ). Del mismo modo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los

hongos para la tasa de actividad celobiosa ( $F= 207$ ,  $P < 0,05$ ,  $n= 280$ ). Se encontró que las tasas de actividad enzimática de los hongos pertenecientes a troncos con el mismo estado de descomposición no siguen un mismo patrón, es decir, pueden presentar igualdad en la tasa de actividad enzimática así como también presentar diferencias. Lo mismo sucede al evaluar la tasa de actividad enzimática entre los hongos encontrados en troncos con diferentes estados de descomposición. Igualmente, no se puede establecer el comportamiento de la tasa de actividad enzimática de acuerdo al Phylum en que se encuentren los hongos, ya sea Basidiomycota y Ascomycota. Estos resultados indican que el comportamiento en la tasa de actividad enzimática depende solamente de la fisiología de cada hongo.

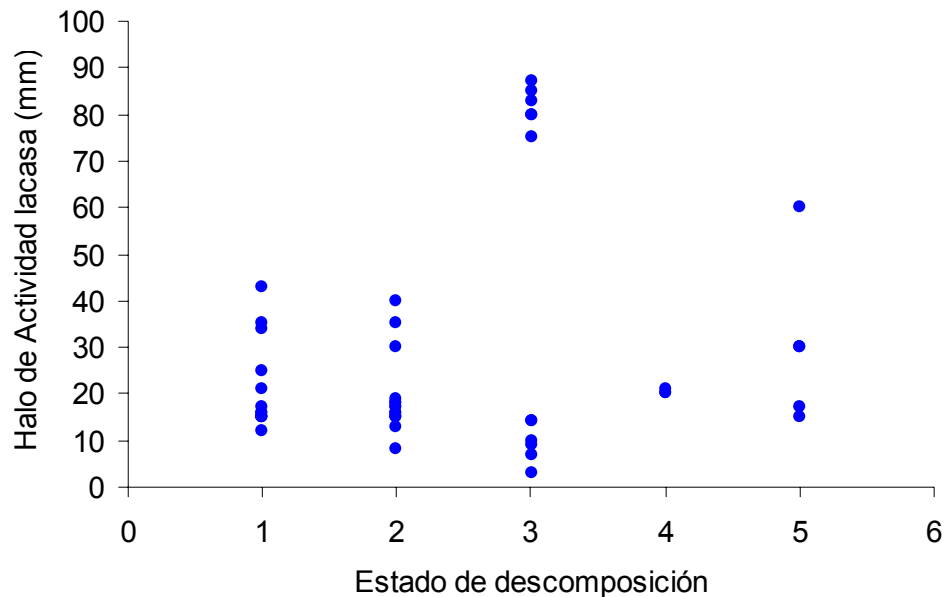
No hay estudios reportados acerca de la tasa de actividad lacasa y CDH de los hongos de la pudrición blanca respecto al estado de descomposición de los troncos. Es bastante probable que la tasa de actividad enzimática de un hongo de determinada especie, ya sea del phylum Ascomycota o Basidiomycota, pueda influenciar en el estado de descomposición del tronco en el que se encuentre; esto se puede observar en el caso del Ascomycota *Xylaria polymorpha* que se encontraba en troncos con estado de descomposición 2, presentando una tasa de actividad lacasa de 4,50 mm de ABTS oxidado/día, mientras que en troncos con estado 3 de descomposición la tasa de actividad lacasa fue de 11,42 mm de ABTS oxidado/día, mostrando una actividad lacasa casi del doble a la de *X. polymorpha* que se encontraba en troncos con estado 2 de descomposición ( $q= 10,23$ ,  $P < 0,05$ ). Con respecto a la tasa de actividad celobiosa deshidrogenasa, *X. polymorpha* también tuvo un comportamiento diferente en cada estado de descomposición en el tronco. En troncos con estado 2 de descomposición, la tasa de actividad CDH fue de 3,35 mm de DCPIP reducido/día; *Xylaria polymorpha* en troncos con estado 3 de descomposición, aumentó a un poco más del triple su tasa de actividad celobiosa deshidrogenasa a 10,94 mm de DCPIP reducido/día ( $q= 22,05$ ,  $P < 0,05$ ). El Basidiomycota *Trametes* sp. que se encontraba en troncos con estado 1 de descomposición presentó un comportamiento parecido, mostrando una tasa de actividad lacasa de 1,60 mm de ABTS oxidado/día; en el tronco con estado 3 de descomposición la tasa de actividad lacasa de *Trametes* sp. aumentó notablemente a 10,38 mm de ABTS oxidado/día ( $q= 21.42$ ,  $P < 0,05$ ). En cuanto a la actividad celobiosa deshidrogenasa de *Trametes* sp. en troncos con estado 1 de

descomposición, la tasa de actividad fue de 1,33 mm de DCPIP reducido/día, mientras que en troncos con estado 3 de descomposición presentó una tasa de 10,17 mm de DCPIP reducido/día, observando un gran aumento en esta producción ( $q= 38,13$ ,  $P < 0,05$ ).

Sin embargo no se encontró una correlación significativa entre la cantidad de lacasa producida y el estado de descomposición de los troncos durante los días evaluados ( $r^2= 0,15$ ,  $P > 0,05$ ,  $n=48$ ) (Figura 7), pero se observó que en los hongos que se encontraban en los troncos con estado de descomposición 1 al 3, aumentaba la actividad lacasa a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos. En troncos con estado 4 de descomposición se encontró un menor diámetro de halo de actividad lacasa (20 mm); esto pudo deberse a que el hongo del género *Earliella* sp. tiene una tasa menor de actividad lacasa en función al tiempo, ya que a diferencia de los hongos que se encuentran en troncos con estados de descomposición menores, la actividad lacasa se evidencio a partir del día 5. Es probable que a un tiempo de evaluación superior a 8 días, el género *Earliella* sp. presente una actividad lacasa en las placas de agar aún mayor que la actividad encontrada en los hongos pertenecientes a troncos con estado 3 de descomposición, que es el fenómeno encontrado en los resultados obtenidos en la etapa de fermentación.

En cuanto a los halos de actividad celobiosa deshidrogenasa se encontró una correlación positiva entre esta y el estado de descomposición de los troncos ( $r^2$  0,34,  $P < 0,05$ ,  $n= 43$ ) (Figura 8), ya que en los estados 3 y 4 de descomposición se encuentran los hongos con mayores diámetros de los halos de la actividad CDH. No se detectó actividad celobiosa deshidrogenasa en los hongos que se encontraban en troncos de estado 5 de descomposición; esto pudo suceder porque en este estado de descomposición se presentan muy bajos porcentajes de celulosa y lignina debido a que la mayor parte del tronco se ha degradado totalmente, dando como producto otras fuentes de carbono como la glucosa, dextrinas y dímeros de celobiosa. La celobiosa deshidrogenasa se produce generalmente bajo condiciones celulolíticas, es decir cuando la celulosa es la principal fuente de carbono y sufre una represión catabólica cuando la celobiosa o la glucosa se encuentran en altas concentraciones (Henriksson *et al.* 2000), razón por la cual, pudo no haberse

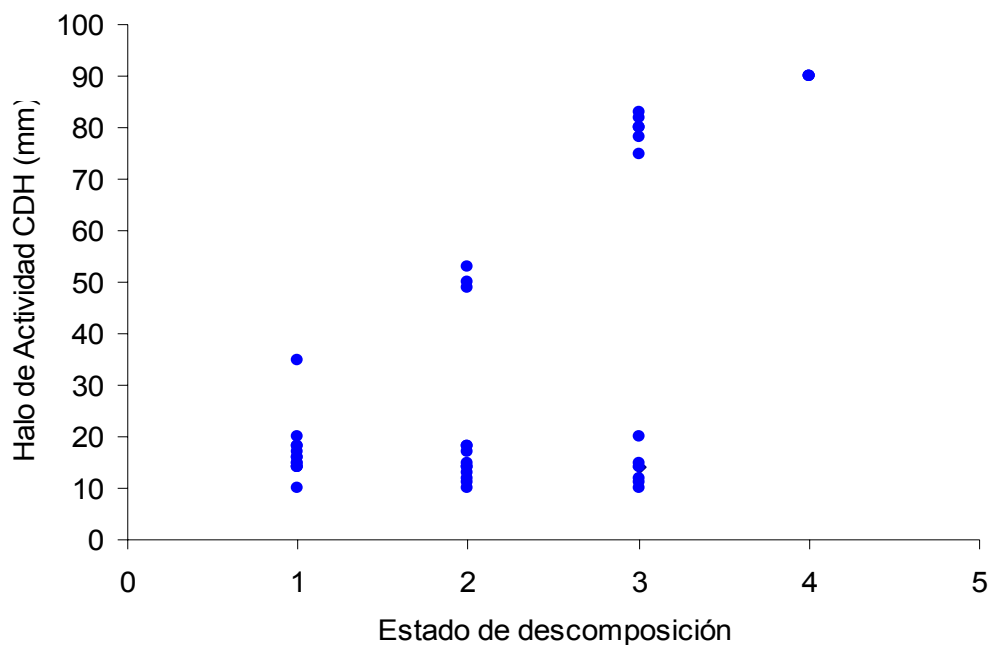
evidenciado actividad celobiosa deshidrogenasa en los hongos de troncos de estado de descomposición 5 (Tabla 2).



**Figura 7. Relación entre la actividad lacasa de los hongos de la pudrición blanca y los cinco estados de descomposición de los troncos de fragmentos de bosque subandino estudiados .**

En las pruebas cualitativas, se encontró una fuerte correlación positiva entre la actividad lacasa y la actividad celobiosa deshidrogenasa ( $r^2=0,70$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=41$ ) (Figura 9). En general, se evidenció que la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos evaluados aumentan proporcionalmente; esto sucedió de la misma manera en los resultados obtenidos durante la fermentación, lo cual puede indicar que la CDH actúa de manera sinérgica con la enzima lacasa, facilitando así el proceso de descomposición de la lignina. Aunque no se conoce claramente la función biológica de la celobiosa deshidrogenasa, esta enzima es esencial para la invasión y degradación de la madera en los ecosistemas forestales (Dumonceaux *et al.* 2001).

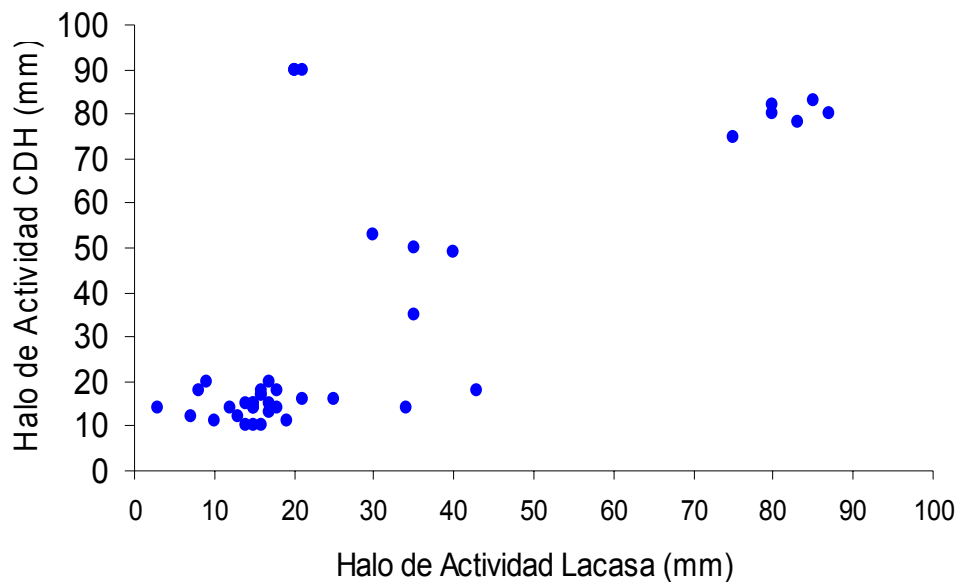
Los hongos encontrados en los troncos con estado 5 de descomposición presentaron actividad lacasa mas no evidenciaron actividad celobiosa deshidrogenasa. Esto pudo suceder porque la enzima lacasa reoxida todos los aceptores de electrones conocidos de la celobiosa deshidrogenasa incluyendo el DCPIP (Henriksson *et al.* 2000), por lo tanto la lacasa pudo enmascarar la actividad de la celobiosa deshidrogenasa.



**Figura 8. Relación entre la actividad CDH de los hongos de la pudrición blanca y los cinco estados de descomposición de los troncos de bosque subandino.**

Pueden encontrarse grandes variaciones en la actividad enzimática entre diferentes cepas de una misma especie, de acuerdo al estado de descomposición en que se encuentra el tronco (Rayner & Boddy 1988). Este es el caso de *Trametes* sp. que se encontraba colonizando troncos en estado 1 de descomposición presentó halos de

actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de 8 y 16 mm, mientras que en el tronco de estado 3 de descomposición esta misma especie presentó halos de 71 y 78 mm respectivamente. Asimismo *X. polymorpha* en estado 2 de descomposición del tronco evidenció halos de actividad lacasa de 35 mm y halos de actividad celobiosa deshidrogenasa de 51 mm y en el tronco de estado 3 de descomposición, *X. polymorpha* presentó una mayor actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa con halos de 84 y 82 mm, respectivamente.



**Figura 9. Relación entre la actividad lacasa y la actividad CDH de los hongos de la pudrición blanca de fragmentos de bosque subandino estudiados.**

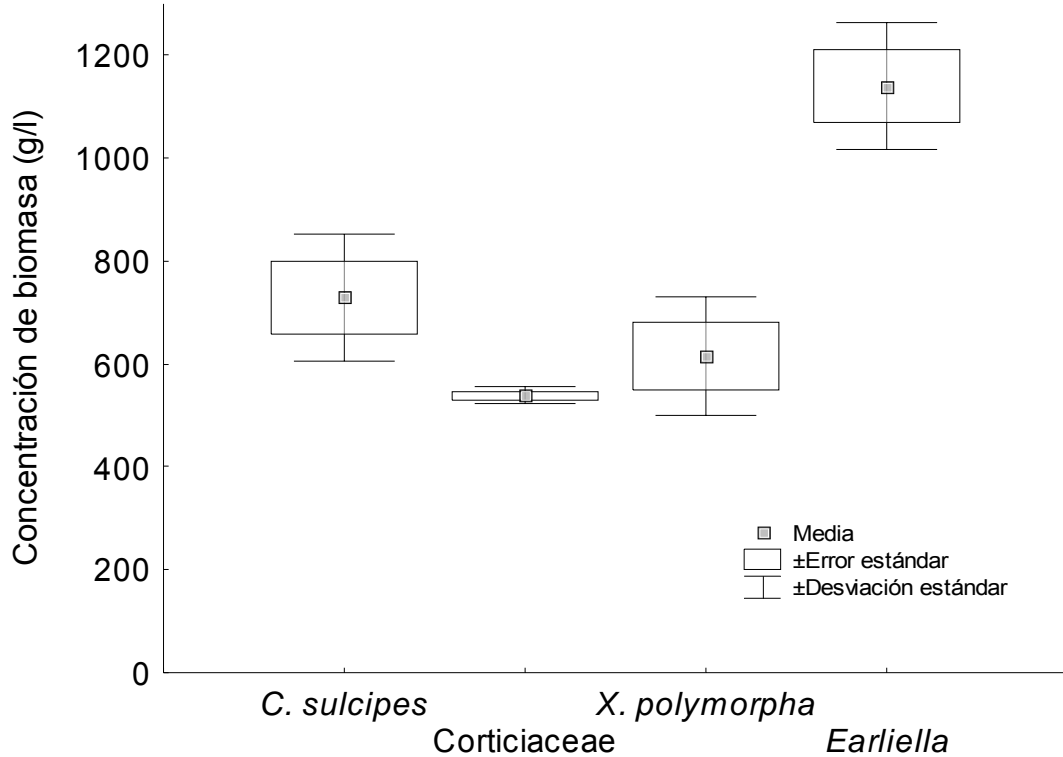
Es difícil afirmar una relación clara entre los factores bióticos y abióticos implicados en la degradación de la madera, debido a la falta de estudios acerca del tema (Fernandes *et al.* 2005).

De los hongos evaluados en las pruebas cualitativas se seleccionaron los hongos con mayor diámetro de halo de actividad lacasa y actividad celobiosa

deshidrogenasa y se evaluaron en medio líquido. Se seleccionó un hongo de troncos con diferente estado de descomposición: *Cookeina sulcipes* en tronco con estado de descomposición 1, un hongo de la familia Corticiaceae en tronco con estado de descomposición 2, *Xylaria polymorpha* en tronco con estado de descomposición 3 y el género *Earliella* sp. en tronco con estado de descomposición 4. No se evaluó ningún hongo perteneciente a los troncos con estado 5 de descomposición ya que presentaron muy poca actividad lacasa y ausencia de actividad celobiosa deshidrogenasa en placa.

Estos hongos evaluados son representativos de su respectivo estado de descomposición del tronco, es decir, *Cookeina sulcipes* se encuentra principalmente en troncos caídos con un estado de descomposición 1, el hongo de la familia Corticiaceae es representativa de troncos en estado 2, *Xylaria polymorpha* de troncos con estados de descomposición 3 y por último, el hongo del género *Earliella* sp. de troncos con estados de descomposición 4.

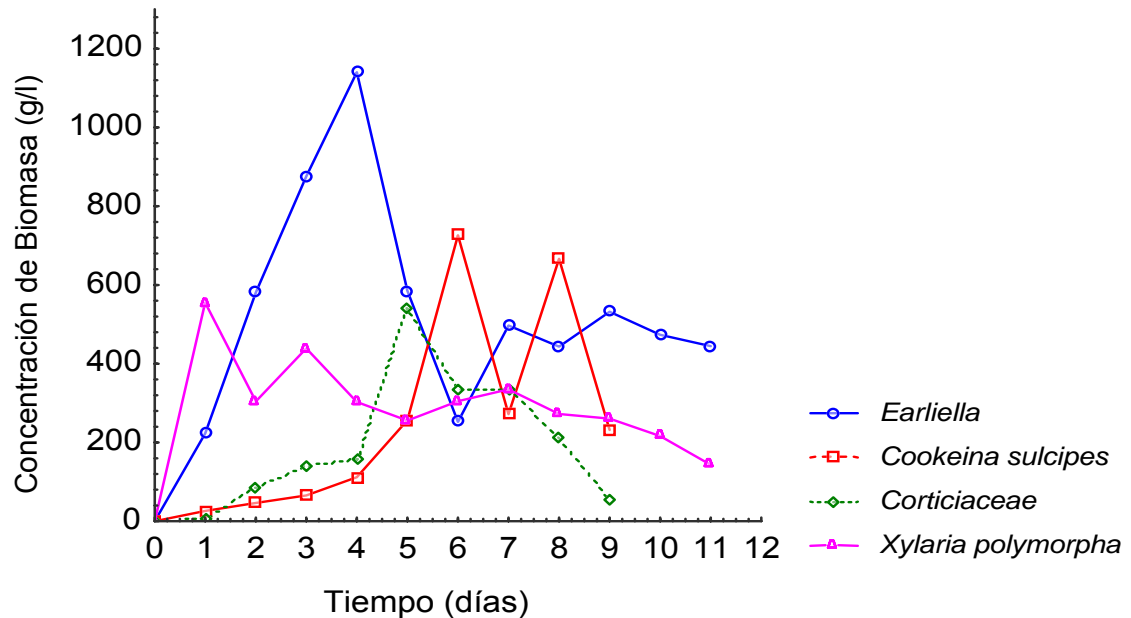
Con respecto al comportamiento del pH en el medio extracto de salvado de trigo, el pH inicial fue de 5.85, el cual fue disminuyendo durante los cuatro primeros días hasta llegar a un pH aproximado de 4.5, manteniéndose hasta el final de la fermentación. Esta acidificación es causada por la producción de ácidos como el ácido oxálico, el cual se acumula en el medio y genera este cambio en el pH (Dutton *et al.* 1993). La producción de ácido oxálico por los hongos de la pudrición blanca inicia la degradación de la pared celular vegetal, causando la formación de cristales de oxalato de calcio que se sitúan en las hifas (Fernandes *et al.* 2005). En general el pH de los troncos varía entre 4 y 6, que corresponde al pH óptimo para el crecimiento de los hongos de la pudrición (Rayner & Boddy 1988). El pH también influye en el comportamiento de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa que generalmente muestran una actividad óptima a pH ácidos entre 3 y 5 (Baldrian 2006; Cameron & Aust 2001)



**Figura 10. Comparación entre las medias de las concentraciones de biomasa (g/l) de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X polymorpha* y *Earliella* sp.**

Con el fin de evitar que algunos componentes del medio tales como la celulosa o restos de salvado de trigo adherido a las hifas pudieran interferir en los resultados, se determinó la biomasa cuantificando las proteínas presentes en el micelio. A partir del análisis de varianza de Friedman se determinó que hay diferencia entre las medianas de las concentraciones de biomasa de los hongos de diferentes estados de descomposición de los troncos ( $F_r=0,87$  y  $P<0,05$ ) (Figura 10). Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de biomasa producida por el hongo de la Familia Corticiaceae encontrado en el tronco con estado 2 con descomposición y *Earliella* sp. en el tronco con estado 4 de descomposición; sin embargo se observó que la biomasa producida por *Earliella* sp. fue por lo menos del doble en comparación con los demás hongos evaluados (Figura 11). Probablemente esto puede ser debido a que este hongo se encontraba

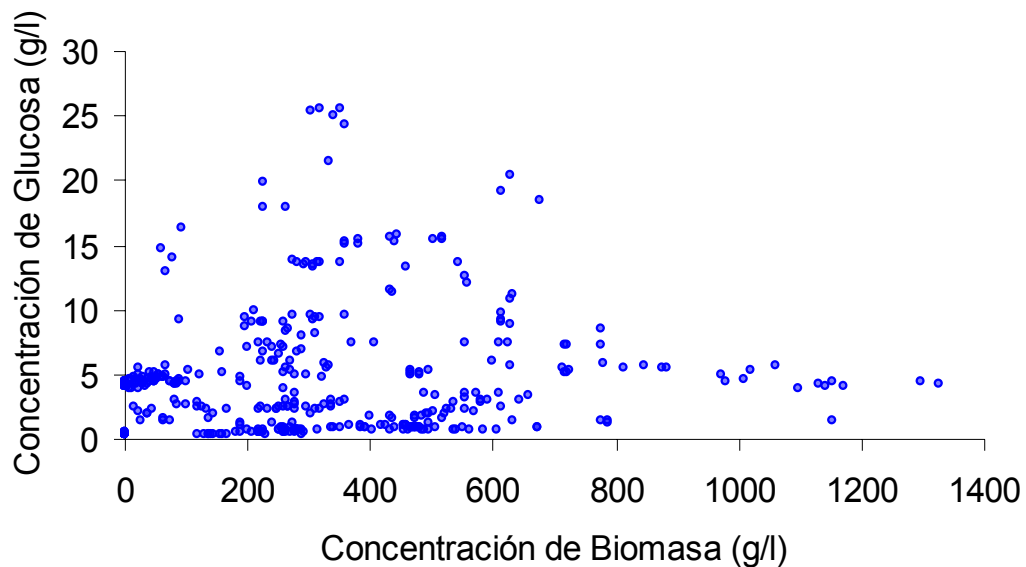
en un tronco con estado 4 de descomposición. Se ha reportado que la relación entre la producción de biomasa y el estado de descomposición del tronco puede ser positiva, negativa o puede no haber relación, ya que esto depende de la fisiología de cada hongo (Rayner & Boddy 1988).



**Figura 11. Determinación de biomasa en el medio extracto de salvado de trigo de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha*, y *Earliella* sp. durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**

El día 4 de fermentación, *Earliella* sp. presentó una concentración de biomasa de 1140,19 mg de proteínas del micelio/l de medio; *Cookeina sulcipes* obtuvo el pico más alto de producción de biomasa el día 6 con una concentración de 726,08 mg de proteínas del micelio/l. *Xylaria polymorpha* presentó su mayor pico de producción de biomasa el día 1. El hongo de la familia Corticiaceae presentó un solo pico de producción el día 5 con una biomasa con una concentración de 539,25 mg de proteínas del micelio/l (Figura 11). En los días siguientes al pico de biomasa más alto, se presentaron algunos picos de menores en los resultados obtenidos de los

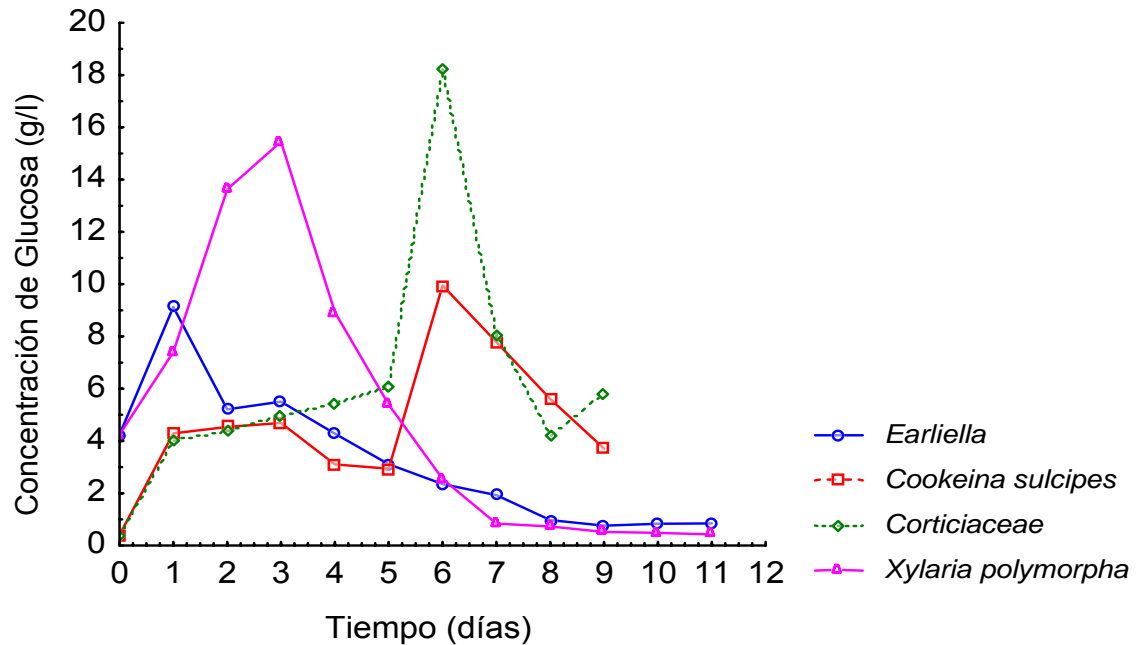
hongos. Estos picos menores observados luego de presentarse la concentración de biomasa mas alta, pueden deberse a fenómenos de autoparasitismo del micelio, los cuales se han reportado en hongos de la pudrición; este es un mecanismo por el cual los hongos, ya sea de diferente o de la misma especie, realizan un reciclaje de nutrientes de nutrientes como el carbono y el nitrógeno que están contenido en el micelio (Rayner & Boddy 1988).



**Figura 12. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la glucosa liberada en el medio por hongos de la pudrición blanca en fragmentos de bosque subandino estudiados**

Con el análisis estadístico se determinó una relación entre la concentración de biomasa y glucosa liberada por los hongos estudiados; sin embargo es una relación débil ( $r^2=0,14$ ,  $P < 0,05$ ,  $n= 396$ ) (Figura 12), ya que aunque el comportamiento de la glucosa es uno de los factores más relacionados con el crecimiento fúngico, no sólo está involucrado el proceso de degradación de glucosa sino también el proceso enzimático de degradación de celulosa y celobiosa, siendo la celulosa la principal

fuente de carbono disponible en el medio utilizado y en el hábitat natural de los hongos de la pudrición blanca (Dumonceaux *et al.* 2001).

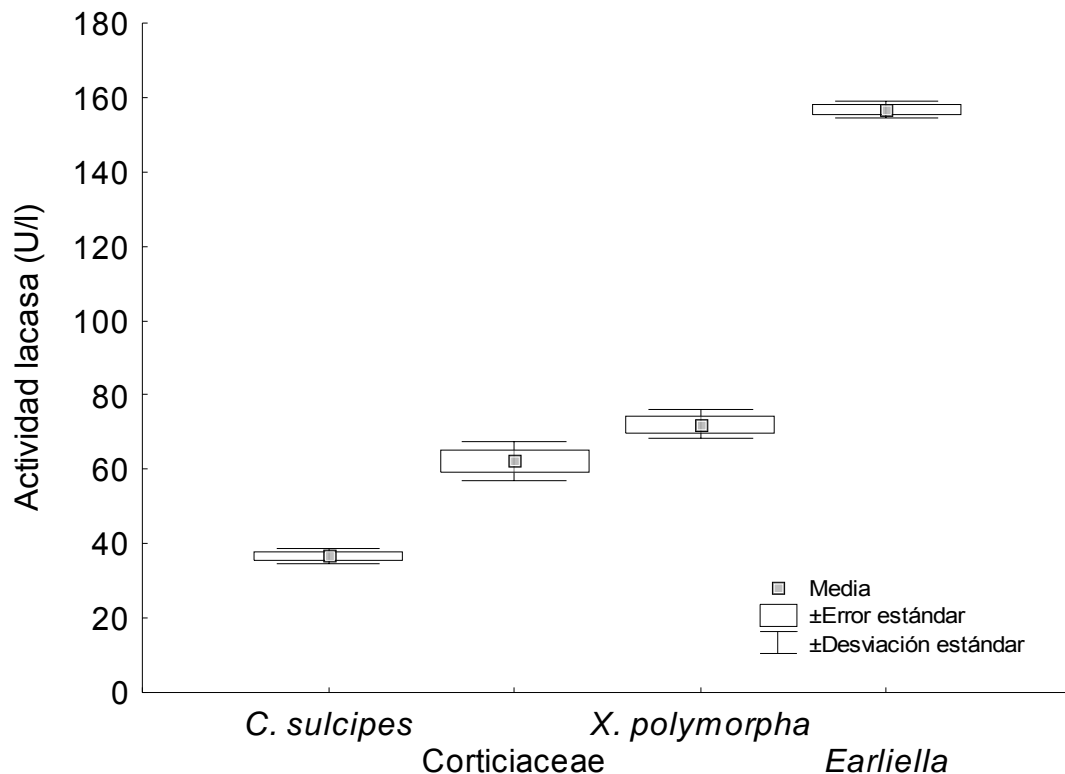


**Figura 13. Determinación de glucosa en el medio extracto de salvado de trigo de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha*, y *Earliella* sp. durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**

La concentración más alta de glucosa liberada en el medio que presentó *Earliella* sp. fue el día 1 y los siguientes días fue descendiendo progresivamente hasta el último día de fermentación; en contraste se observó que a partir del día 1 aumentó la tasa de producción de biomasa hasta el día 4, momento en el que se presentó el pico más alto de biomasa y una baja concentración de glucosa en el medio. El hongo de la familia Corticiaceae se comportó de manera similar a *Earliella* sp. ya que fue aumentando la concentración de glucosa liberada en el medio, presentando su máxima producción el día 6; luego descendió hasta el día 8 y el día 9 presentó nuevamente un ligero aumento en la concentración. La biomasa del hongo de la familia Corticiaceae tuvo su mayor pico el día 5 descendiendo hasta el día 9. Por el

contrario en *Cookeina sulcipes* el pico más alto de glucosa liberada se presentó el mismo día que hubo mayor producción de biomasa; *Xylaria polymorpha* se comportó de manera similar; la producción más alta de biomasa se presentó el día 1 y el día 3 se observó una concentración de biomasa un poco menor; en estos días la concentración de glucosa liberada en el medio se encontraba en aumento llegando a su mayor concentración el día 3 (Figura 13). Esto indica que probablemente los hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota (*Cookeina sulcipes* y *Xylaria polymorpha*) se comportan de manera distinta a los hongos del Phylum Basidiomycota (*Earliella* y el hongo de la familia Corticiaceae) en cuanto a la relación de biomasa y glucosa. Lo anterior muestra que en este estudio, el consumo de glucosa es mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa en los Basidiomycota estudiados; por el contrario, los hongos del Phylum Ascomycota tienen una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento.

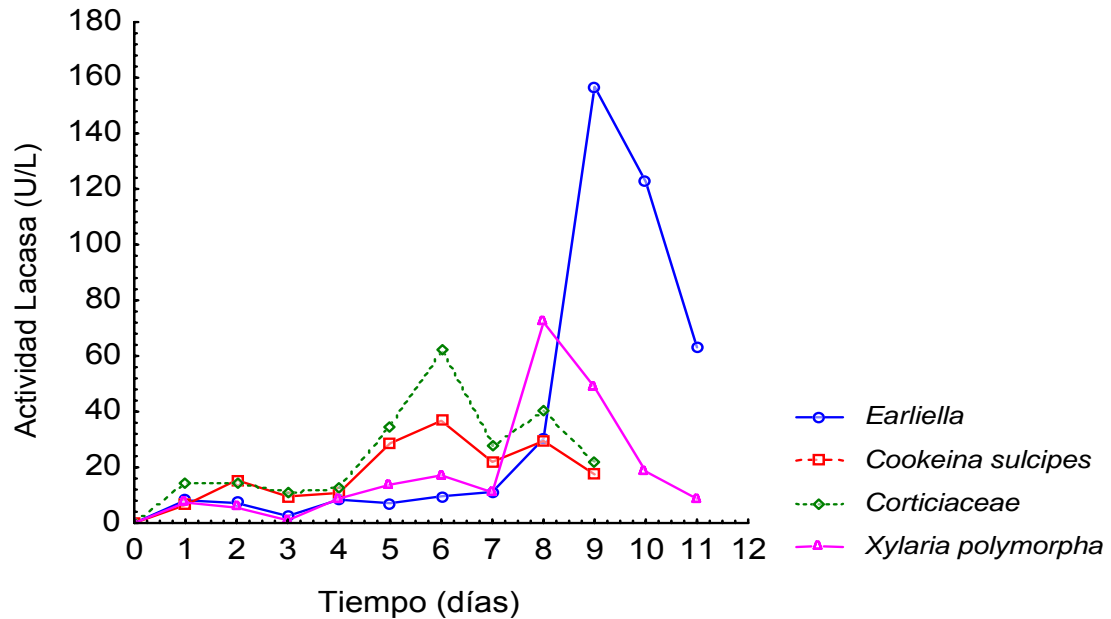
Mediante el análisis de varianza de Friedman se determinaron diferencias significativas entre los hongos encontrados en troncos de diferentes estados de descomposición para la actividad lacasa ( $F_r = 1, P < 0,05$ ) (Figura 14), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre *Cookeina sulcipes* que se encontraba en troncos con estado 1 de descomposición y *Earliella* sp. que se encontraba en troncos con estado de descomposición 4, la cual tuvo la mayor producción de lacasa con una actividad de  $157 \text{ UL}^{-1}$ , en comparación con los hongos pertenecientes a los estados de descomposición de los troncos 1, 2 y 3 que tuvieron una actividad de  $37 \text{ UL}^{-1}$ ,  $62 \text{ UL}^{-1}$  y  $72 \text{ UL}^{-1}$  respectivamente, lo cual indica que a mayor estado de descomposición mayor actividad lacasa. También se observó que la actividad lacasa de los hongos de estados de descomposición de troncos 1 y 2 expresaron la enzima con mayor rapidez que en los hongos de estados de descomposición de troncos 3 y 4; *C. sulcipes* y el hongo de la familia Corticiaceae presentaron su mayor actividad el día 6, *X. polymorpha* el día 8 y *Earliella* sp. el día 9 (Figura 15).



**Figura 14. Comparación entre las medias de las concentraciones de actividad lacasa (U/L) de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* sp.**

La lacasa es una enzima tipo oxidasa producida por la mayoría de hongos de la pudrición blanca (Fernandes *et al.* 2005; Herrera & Rosas 2003; Ha *et al.* 2001; Zabel & Morrell 1992). Además de participar en el procesos de degradación de la lignina, esta enzima también participa en otros proceso fisiológicos como la pigmentación de conidios, morfogénesis, patogénesis y detoxificación de compuestos fenólicos (Saparrat *et al.* 2002). La actividad de esta enzima se ha reportado en *Xylaria* sp., *Xylaria hypoxylon* y *Xylaria polymorpha*. Mediante la técnica de ABTS *X. hypoxylon* y *X. polymorpha* han mostrado una alta actividad lacasa (Liers *et al.* 2005). Por otro lado, no se han publicado estudios de actividad lacasa en hongos del género *Cookeina* ni *Earliella* sp. Este es el primer reporte de actividad enzimática lacasa para estos hongos nativos los cuales fueron recolectados en fragmentos de bosque subandino, lo cual es de gran importancia

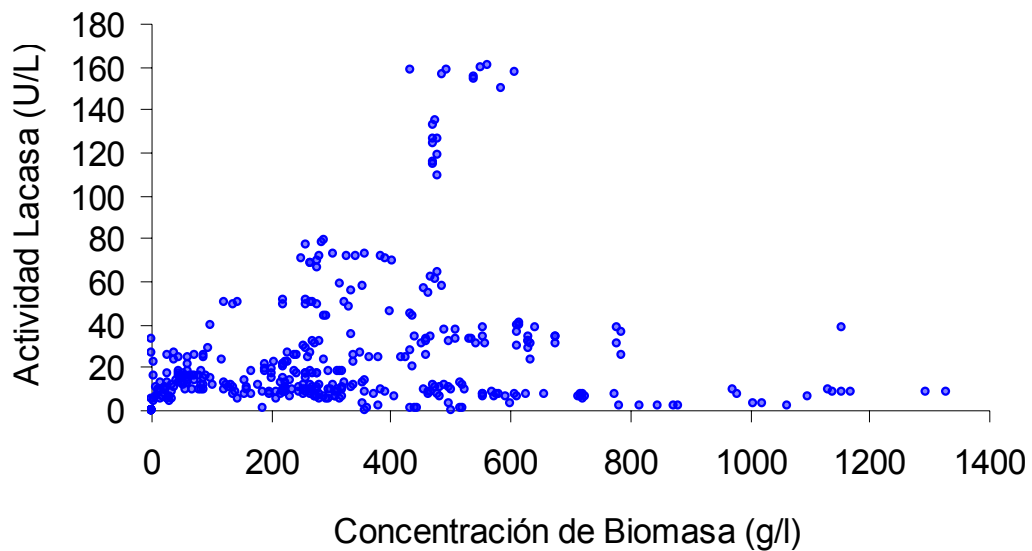
debido a la posible utilización de su actividad enzimática en la industria biotecnológica; además puede contribuir al entendimiento del comportamiento de hongos de la pudrición blanca en el proceso de descomposición de la madera y dentro del ciclo del carbono.



**Figura 15. Determinación de actividad lacasa en el medio extracto de salvado de trigo por *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* sp. durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**

Se encontró una correlación débil entre la actividad lacasa y la concentración de biomasa ( $r^2 = 0,29$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 396$ ) (Figura 16). Mansur *et al.* (2003) al igual que otros autores han reportado que la síntesis de la actividad lacasa es constitutiva, ya que la actividad incrementa proporcionalmente con la producción de biomasa; sin embargo, otros autores como Penttila & Saloheimo (1999) y Ha *et al.* (2001) afirman que las enzimas ligninolíticas de los hongos de la pudrición blanca son producidas en el metabolismo secundario, es decir en la idiofase, ya que la producción de la enzima lacasa se encuentra como un evento desencadenado por el consumo de nutrientes y depende de las condiciones de pH, aireación, humedad y composición y

calidad del sustrato, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se observaron los dos fenómenos de acuerdo al estado de descomposición de los troncos, ya que a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos, hubo una menor relación de la actividad lacasa con la producción de biomasa por los hongos evaluados, encontrándose el tronco con estado de descomposición 1 colonizado por *C. sulcipes* presentó la mayor producción de la enzima y la mayor concentración de biomasa y *Earliella* sp. que se encontraba en troncos con estado con descomposición 4 presentó la máxima producción de actividad lacasa el día 9, es decir, cinco días después del punto máximo de producción de biomasa. De acuerdo a esto se podría afirmar que en los troncos de estados iniciales de descomposición la actividad enzimática lacasa producida por los hongos se comporta de manera constitutiva, y en los troncos con estados avanzados de descomposición la actividad lacasa hace parte del metabolismo secundario.



**Figura 16. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la actividad lacasa (U/L) de los hongos de la pudrición blanca de fragmentos de bosque subandino estudiados.**

Se determinó una relación positiva entre la concentración de glucosa y la actividad lacasa ( $r^2 = -0,22$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 396$ ) (Figura 17). La máxima producción de la enzima en *Cookeina sulcipes* y el hongo de la familia Corticiaceae se presentó el día 6, momento en que también se observó la mayor concentración de glucosa liberada en el medio. Por el contrario, *Xylaria polymorpha* y *Earliella* sp. mostraron la mayor actividad enzimática los días 8 y 9 respectivamente y, la glucosa liberada en el medio durante estos días descendió hasta valores cercanos a cero (Figura 15). Aunque todos los hongos de la pudrición blanca pueden asimilar los monómeros de glucosa y la celobiosa, algunos hongos pueden utilizar también los oligómeros de celulosa como fuente de carbono (Penttilä & Saloheimo 1999). Este podría ser el caso de *Xylaria polymorpha* y *Earliella* sp. explicando así la mayor actividad enzimática en presencia de bajas concentraciones de glucosa. Esta relación se comporta de manera similar a la encontrada entre la biomasa y la glucosa.

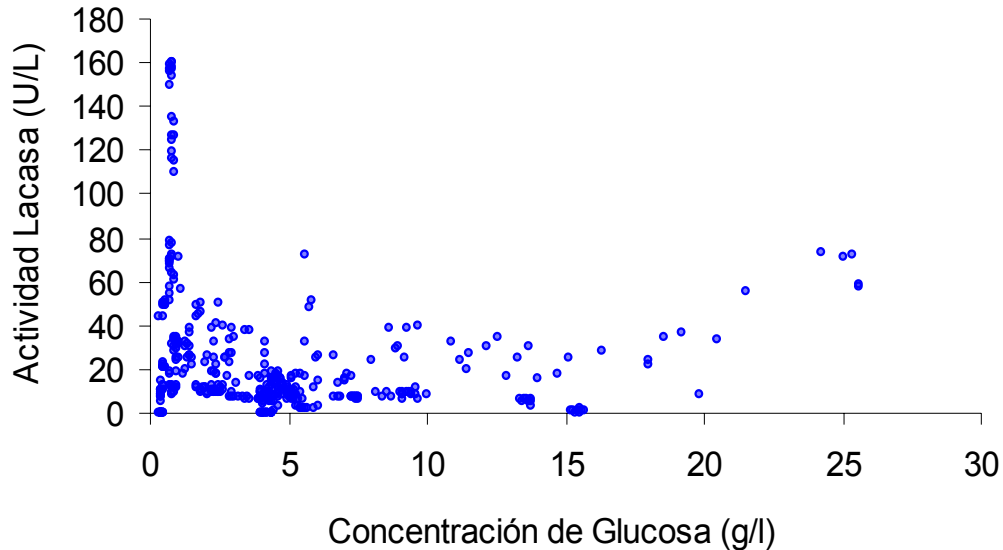
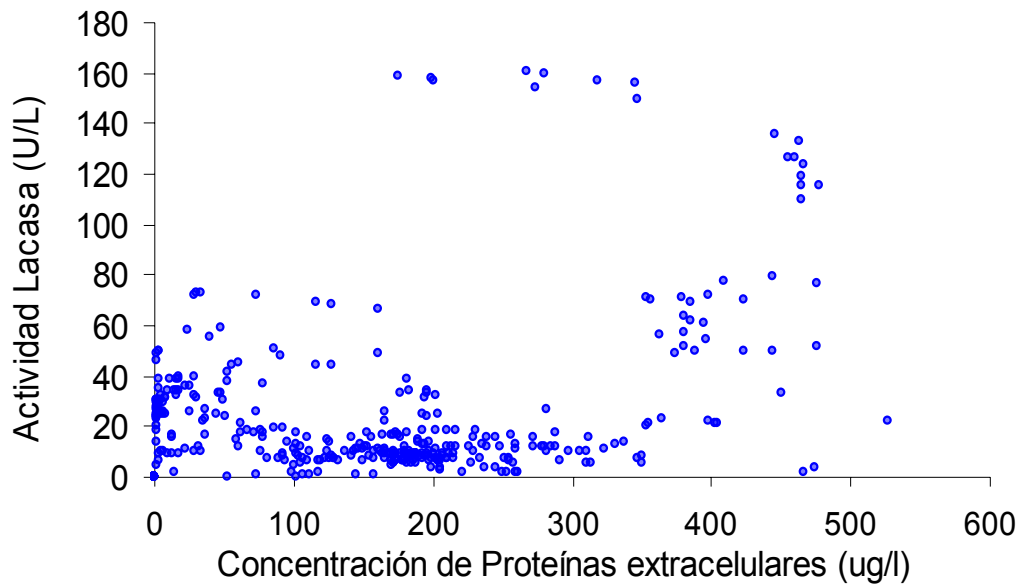


Figura 17. Relación entre el consumo de glucosa (g/l) y la actividad lacasa (U/L) de hongos de la pudrición blanca en fragmentos de bosque subandino estudiados.

Es importante mencionar que al menos en condiciones de laboratorio estos hongos no pueden degradar el polímero de lignina cuando esta es la única fuente de carbono. En su hábitat natural los hongos de la pudrición blanca degradan la lignina sólo cuando necesitan tener acceso a los carbohidratos presentes en la madera (Penttila & Saloheimo 1999).

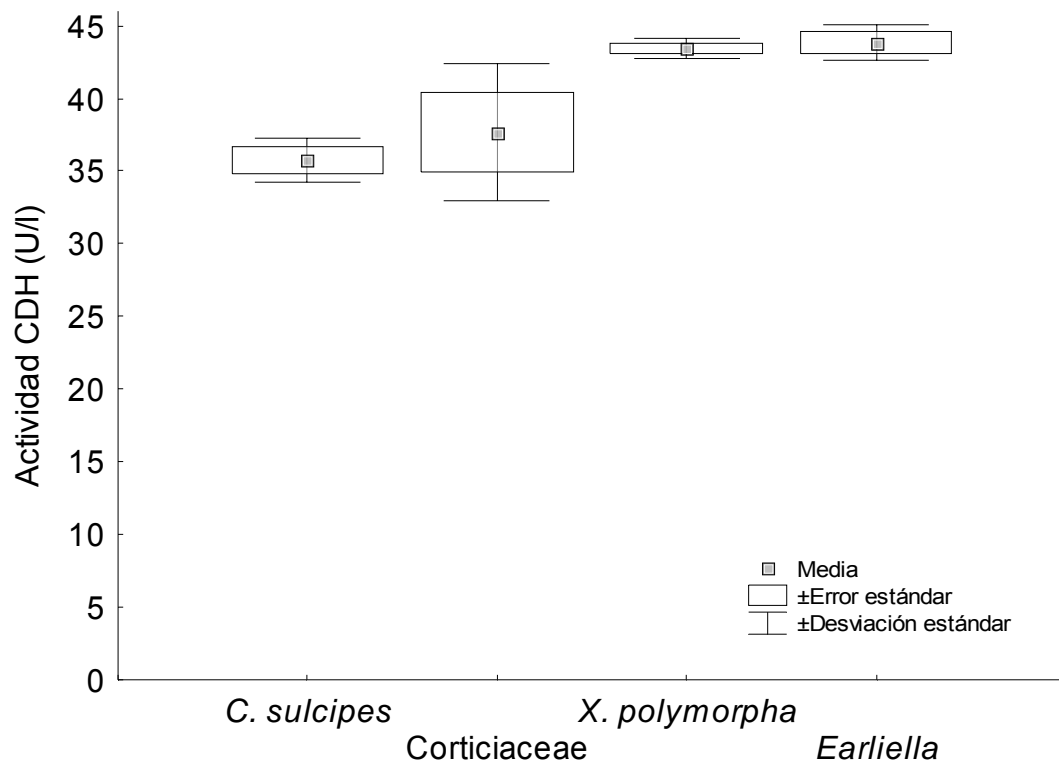
Autores como Mansur *et al.* 2003, han indicado que la concentración de proteínas extracelulares incrementa a medida que aumenta la actividad lacasa durante el crecimiento del hongo. Al evaluar la actividad específica de la actividad lacasa en el extracto crudo de los hongos evaluados, se obtuvieron valores de 229 U/g de proteína para *Cookeina sulcipes*, 123 U/g para el hongo de la familia Corticiaceae, 59 U/g para *Earliella* sp. y 22 U/g para *Xylaria polymorpha*. Se encontró una correlación entre la actividad lacasa y la concentración de las proteínas extracelulares ( $r^2= 0,21$ ,  $P<0,05$ ,  $n=396$ ) (Figura 18) y se pudo observar que los hongos que se encontraban colonizando troncos en estados de descomposición iniciales tienen una actividad específica más baja que los hongos que se encuentran colonizando troncos en estado de descomposición avanzados. Es importante mencionar que la técnica llevada a cabo en este estudio cuantifica únicamente la actividad enzimática lacasa extracelular que es en donde se ha reportado en la mayoría de especies de hongos de la pudrición blanca. Sin embargo, además de la enzima lacasa extracelular, se ha reportado la existencia de actividad lacasa producida a nivel intracelular en hongos de la pudrición blanca como lo es el hongo de la familia Corticiaceae, *Phanaerochaete chrysosporium* (Dittmer *et al.* 1997); en *Trametes versicolor* se ha reportado altos valores de actividad lacasa intracelular en cultivos con glucosa como fuente de carbono (Schlosser *et al.* 1997). La ubicación de esta enzima depende de la función fisiológica (Baldrian 2006), por lo que sería necesario realizar investigaciones que evalúen la actividad intracelular de la lacasa en los hongos evaluados en este estudio, ya que puede ser probable que presenten valores más altos de actividad lacasa total. Esto contribuiría a un mejor entendimiento no sólo del comportamiento de los hongos de la pudrición blanca en la degradación de la lignocelulosa, sino también otros aspectos como la morfogénesis de este grupo de hongos.



**Figura 18. Relación entre la producción de proteínas ( $\mu\text{g/l}$ ) y la actividad lacasa (U/L) de hongos de la pudrición blanca en fragmentos de bosque subandino estudiados.**

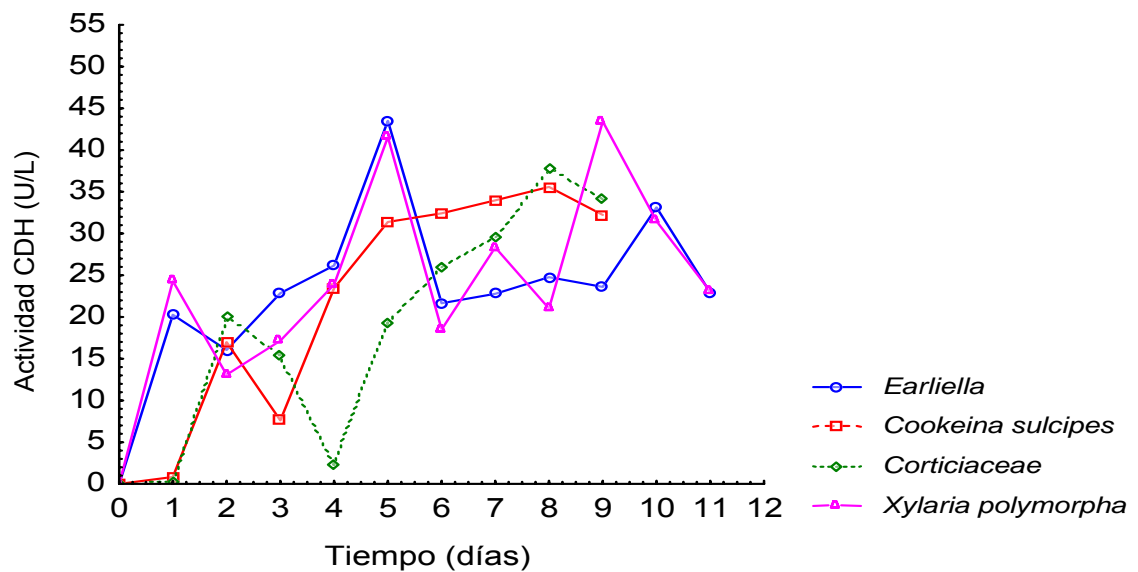
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de las concentraciones de actividad celobiosa deshidrogenasa de los hongos de los diferentes estados de descomposición de los troncos ( $F_r$  0,4,  $P > 0,05$ ) (Figura19). Sin embargo, se observó que a medida que aumenta el estado de descomposición de los troncos, hay un ligero aumento de la actividad enzimática celobiosa deshidrogenasa en los hongos. *Xylaria polymorpha* encontrada en troncos con estado 3 de descomposición tuvo una actividad celobiosa deshidrogenasa de 43,43  $\text{UL}^{-1}$  y *Earliella* sp. encontrada en el tronco con estado 4 de descomposición, presentó una actividad de 43,50  $\text{UL}^{-1}$ , el hongo de la familia Corticiaceae presente en el tronco con estado 2 de descomposición mostró una actividad de 37,66  $\text{UL}^{-1}$  y *Cookeina sulcipes*, que corresponde al tronco con estado 1 de descomposición tuvo una actividad de 35,59  $\text{UL}^{-1}$ . Hasta la fecha, prácticamente son nulos los estudios realizados en el país de la enzima celobiosa deshidrogenasa y, al igual que la actividad enzimática lacasa, este es el primer reporte de actividad celobiosa deshidrogenasa en hongos del género *Cookeina* y *Earliella* sp. Es muy

importante conocer el potencial enzimático que tienen los hongos nativos de bosques en el país, lo cual puede tener aportes a nivel científico y económico, ya que la enzima celobiosa deshidrogenasa tiene diversas aplicaciones biotecnológicas como en industria de alimentos como método de detección de la lactosa, en la industria del papel en el bioblanqueamiento y en detoxificación de aguas residuales; además, esta enzima tiene importantes funciones dentro del ecosistema ya que como se ha mencionado antes participa en la degradación de la celulosa y la lignina, lo cual hace entender a estos no como procesos aislados sino como procesos que se complementan entre sí, lo cual contribuye al entendimiento de la dinámica enzimática de los hongos de la pudrición blanca dentro del ciclo del carbono.



**Figura 19. Comparación entre las medias de las concentraciones de actividad celobiosa deshidrogenasa (U/L) de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* sp.**

La curva de actividad celobiosa deshidrogenasa de los hongos de los encontrados en los estados 1 y 2 tuvo un comportamiento similar, observándose que tuvieron un aumento en la actividad hasta el día 2 de fermentación, descendiendo al día siguiente y llegando a su máxima actividad el día 8 de fermentación. Los hongos de los troncos con estados de descomposición 3 y 4, también mostraron una curva de actividad celobiosa deshidrogenasa similar hasta el día 6, observándose un pico de actividad el día 1, que descendió al día siguiente y el día 3 aumentó notablemente su actividad hasta el día 5. A partir del día 6 *Xylaria polymorpha* presentó dos picos más siendo el último, el de mayor actividad celobiosa deshidrogenasa el día 9. *Earliella* sp. mantuvo la misma actividad del día 6 al día 9, aumentando su actividad el día 10 y descendiendo el día 11 (Figura 20).



**Figura 20. Determinación de actividad celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo por *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* sp. durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**

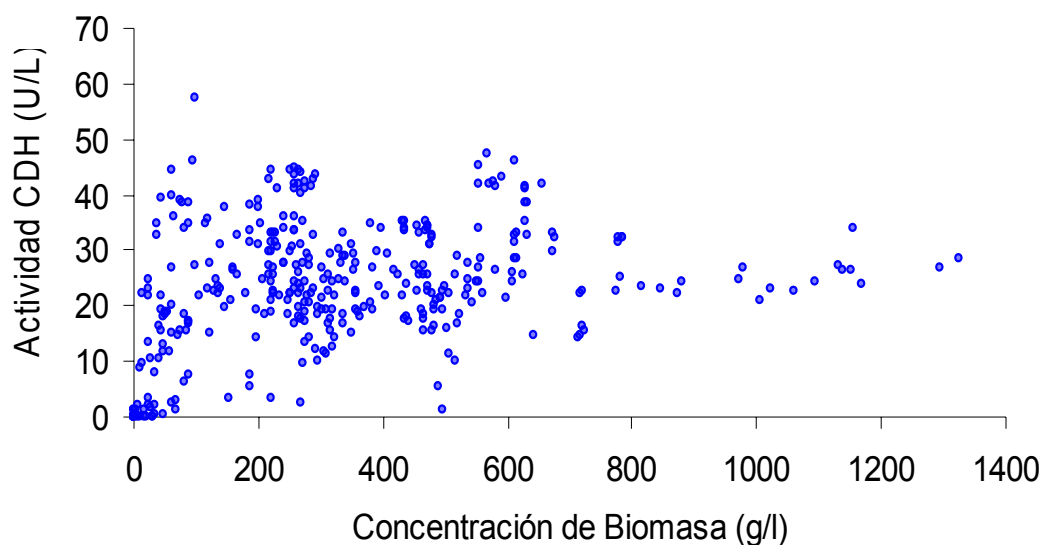
La producción más alta de actividad celobiosa deshidrogenasa reportada en los hongos de la pudrición blanca es en una cepa de *Trametes versicolor*, con un valor de 270 U/l, medida mediante la técnica de clorpromazina (Roy *et al.* 1996). Sin

embargo, es difícil realizar comparaciones en cuanto a la producción de actividad celobiosa deshidrogenasa entre hongos, debido a las grandes diferencias en los resultados que se obtienen entre las diferentes técnicas de ensayo existentes para la cuantificación de esta enzima (Sigoillot *et al.* 2002) ya que aún no se ha logrado establecer una técnica por la cual se obtengan resultados totalmente confiables, puede ser debido a que el conocimiento de esta enzima es reciente, y debido a la reoxidación de los sustratos reducidos por la celobiosa deshidrogenasa de enzimas como la lacasa, interfiriendo así con los resultados, pesar de la utilización de inhibidores de esta enzima como lo es el utilizado en este estudio, NaF 4 mM.

En general, se encontró la existencia de una relación relativamente alta entre la concentración de biomasa y la actividad celobiosa deshidrogenasa ( $r^2= 0,45$ ,  $P < 0,05$ ,  $n= 396$ ) (Figura 21). *Earliella* sp. fue el hongo que presentó mayor actividad celobiosa deshidrogenasa y mayor producción de biomasa; esto demuestra que este hongo tiene una gran actividad metabólica ya que puede asimilar los nutrientes como la celulosa que es la fuente de carbono que se encontraba en el medio extracto de salvado de trigo y el cual es su sustrato natural; esto puede ser debido a que la celobiosa deshidrogenasa incrementa la actividad celulolítica mediante varios mecanismos entre los cuales se encuentra la oxidación de la celobiosa a celobionolactona evitando la inhibición por producto de las enzimas que hidrolizan la celulosa y despolimerizando la celulosa; esto trae como consecuencia el aumento de la tasa de degradación de la celulosa a moléculas que puedan ser asimiladas más fácilmente por el hongo, reflejándose en un incremento en la biomasa. Para *Earliella* sp. esto puede ser una ventaja en cuanto a la colonización y degradación de sustratos de lignocelulosa en comparación con los hongos que colonizan troncos de estados de descomposición más bajos que presentaron una menor actividad celobiosa deshidrogenasa y menor producción de biomasa.

Sin embargo, la relación entre la degradación de la lignocelulosa por la acción de enzimas como la celobiosa deshidrogenasa y la producción de biomasa depende de la fisiología del hongo. Aunque una alta actividad metabólica combinada con una gran producción de biomasa es una característica ideal en los hongos degradadores de madera, hay hongos que presentan un crecimiento inversamente correlacionado a la actividad metabólica para la degradación de lignina y celulosa (Rayner & Boddy

1988) como puede ser el caso de *Cookeina sulcipes*, ya que después de *Earliella* sp. fue el hongo que tuvo mayor producción de biomasa y la más baja actividad celobiosa deshidrogenasa; este comportamiento también fue observado en el hongo de la familia Corticiaceae y *Xylaria polymorpha*.

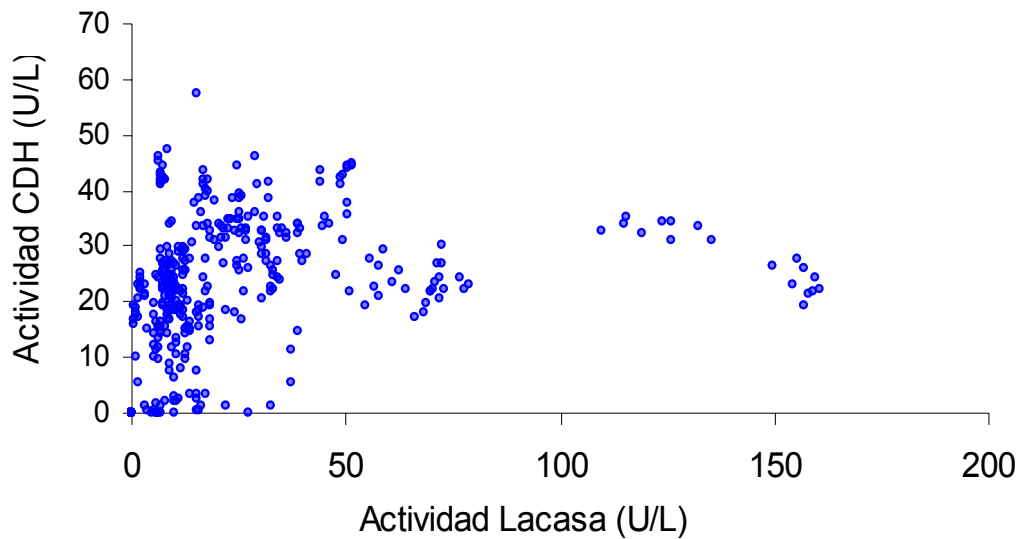


**Figura 21. Relación entre la producción de biomasa (g/l) y la actividad de la CDH (U/L) de hongos de la pudrición blanca en fragmentos de bosque subandino estudiados.**

Estadísticamente, no se presentó una relación entre la actividad celobiosa deshidrogenasa y la concentración de las proteínas extracelulares ( $r^2= 0,05$ ,  $P > 0,05$ ,  $n=396$ ). Se obtuvo una actividad específica de 144 U/g para *Cookeina sulcipes*, 133 U/g para el hongo de la familia Corticiaceae, 110 U/g para *Xylaria polymorpha* y 94 U/g para *Earliella* sp. Como se puede observar, los hongos que corresponden a los troncos de estados iniciales de descomposición presentan mayor actividad específica para la celobiosa deshidrogenasa, lo que puede indicar que biológicamente esta enzima tenga un mayor grado de importancia en los hongos que colonizan troncos de estados de descomposición 1 y 2 ya que el tronco se encuentra compacto y por tal razón la lignina y la celulosa no están disponibles

para las demás enzimas que participan en el proceso de degradación de la madera. Para poder volver estos sustratos disponibles la CDH genera radicales hidroxilo que penetran la pared celular de los troncos y facilitan la degradación de los polímeros de celulosa y lignina. Aunque la función biológica de la celobiosa deshidrogenasa no se conoce con claridad, se ha reportado que hongos como *Phanaerochaete chrysosporium* produce aproximadamente el 0,5 % de proteína correspondiente a la CDH lo que sugiere que es una enzima importante para el metabolismo de estos hongos (Henriksson *et al.* 2000).

La lacasa genera radicales fenólicos y quinonas a partir de la degradación de lignina, los cuales juegan un papel importante en la degradación de la celobiosa por la celobiosa deshidrogenasa; la CDH actúa sinérgicamente con la lacasa evitando la rápida repolimerización de los radicales fenólicos que pueden repolimerizar la lignina, ya que los radicales fenólicos son los precursores en la biosíntesis de la lignina; la remoción de quinonas tóxicas puede prevenir la repolimerización en la degradación de la lignina (Zabel & Morrel 1992). Además, la celobiosa deshidrogenasa genera radicales tipo hidroxilo altamente reactivos, los cuales están involucrados en la degradación de la lignina ya que estos transforman las unidades no fenólicas en fenólicas facilitando así la degradación oxidativa por la lacasa (Sigoillot *et al.* 2002). Este complemento entre las enzimas lacasa y celobiosa deshidrogenasa se pudo concluir en este estudio al observar el comportamiento en la actividad de las dos enzimas en los hongos de la pudrición blanca que colonizan troncos caídos con diferentes estados de descomposición, encontrándose una relación estadísticamente significativa ( $r^2 = 0,53$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 396$ ) (Figura 22). Se observó que a medida que aumentaba el grado de descomposición de los troncos colonizados se presentaba un incremento en la actividad enzimática de la lacasa y de la celobiosa deshidrogenasa, confirmando los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas. Autores como Sigoillot *et al.* (2002) demuestran la fuerte relación de estas enzimas en sistemas ligninolíticos como los encontrados en todas las especies del género *Pycnoporus* ya que la capacidad para degradar la madera depende exclusivamente de la actividad conjunta de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa.



**Figura 22. Relación entre la actividad enzimática de la lacasa (U/L) y la actividad enzimática de la CDH (U/L) de hongos de la pudrición blanca en los fragmentos de bosque subandino estudiados.**

Es necesario el conocimiento de hongos de la pudrición blanca y de su capacidad enzimática en la degradación de la lignocelulosa, ya que al ser los únicos organismos capaces de metabolizar los componentes de la madera hasta  $H_2O$  y  $CO_2$ , son de gran interés en la industria maderera, papelera, de textiles, y en el tratamiento de aguas residuales; además, son de gran importancia dentro del ecosistema ya que son indispensables dentro del ciclo del carbono. En el país se tiene muy poco conocimiento de la biodiversidad de hongos descomponedores de madera de la pudrición blanca y de su actividad metabólica. Este estudio muestra que los hongos nativos de la pudrición blanca recolectados en fragmentos de bosque subandino estudiados tienen potencial enzimático en la degradación de sustratos lignocelulósicos, lo cual permite ampliar el conocimiento en cuanto a la interacción entre las enzimas implicadas en este proceso y de que manera pueden alterar la composición de la madera. Esto puede servir como base para futuros estudios que evalúen sus posibles aplicaciones a nivel biotecnológico e industrial y

como pueden contribuir al mantenimiento de los ecosistemas, en especial del bosque subandino debido a su creciente fragmentación.

## 7. CONCLUSIONES

- El comportamiento de la tasa de actividad enzimática de la lacasa y CDH en los hongos de la pudrición blanca estudiados es intrínseco de la fisiología del hongo, más no tiene relación con el estado de descomposición de los troncos que colonizan ni con su clasificación taxonómica.
- Los hongos Basidiomycota (*Earliella* sp. y el hongo de la familia Corticiaceae evaluado) presentan un patrón diferente a los hongos del Phylum Ascomycota (*Cookeina sulcipes* y *Xylaria polymorpha*) en cuanto a su actividad celulolítica durante la producción de biomasa. En los hongos Basidiomycota, el consumo de glucosa es mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa. En el Phylum Ascomycota, su actividad celulolítica es mayor con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento.
- El estado de descomposición en los troncos se relaciona con la actividad enzimática lacasa de los hongos de la pudrición blanca, aumentando la descomposición a medida que hay un incremento en la producción de actividad lacasa.
- El estado de descomposición en los troncos se relaciona con la actividad enzimática celobiosa deshidrogenasa, aumentando el estado de descomposición en la medida en que incrementa levemente la actividad celobiosa deshidrogenasa.
- El comportamiento metabólico de la lacasa en los hongos de la pudrición blanca actúa de acuerdo a la etapa de descomposición en que se encuentre el tronco; esta enzima puede ser constitutiva en los estados iniciales de descomposición, y en los estados avanzados puede hacer parte del metabolismo secundario.

- Un incremento en la actividad CDH y lacasa de los hongos de la pudrición blanca estudiados se encuentra asociado a una mayor descomposición de la madera.
- Este trabajo es el primer reporte de actividad celobiosa deshidrogenasa en *Xylaria polymorpha*.
- Este es el primer reporte publicado de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en el hongo *Cookeina sulcipes* y en el género *Earliella* sp., lo cual es de gran importancia ya que en Colombia se tiene muy poco conocimiento de los hongos nativos de bosque, y las enzimas reportadas en estos hongos pueden llegar a tener aplicaciones biotecnológicas; así mismo este reporte ayuda a ampliar el conocimiento en cuanto a su comportamiento enzimático de acuerdo con su hábitat natural y su función dentro del proceso de descomposición de la madera y dentro del ciclo del carbono.

## 8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que evalúen la producción de la actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa mediante cultivos mixtos por hongos de la pudrición blanca y habitantes naturales del suelo como *Trichoderma*, ya que en algunas especies de hongos de la pudrición blanca, la presencia de *Trichoderma* incrementa la actividad enzimática en la degradación de los componentes de la madera.
- Estandarizar una técnica para la cuantificación de la enzima celobiosa deshidrogenasa debido a que hasta la fecha, no se ha logrado establecer un protocolo totalmente confiable debido a la oxidación de los indicadores colorimétricos de la CDH por enzimas como la lacasa.
- Se recomienda evaluar la producción enzimática de los hongos de la pudrición blanca simulando las condiciones *in vivo*, es decir, utilizando troncos de madera como sustrato para explicar como se ve afectada la descomposición de la madera por la actividad enzimática de los hongos de la pudrición blanca de una manera más clara.
- Identificar taxonómicamente los hongos evaluados en este trabajo hasta especie, para conocer con mas exactitud acerca de su comportamiento metabólico
- Se debe estudiar la genética de hongos evaluados en este estudio para conocer con mayor profundidad los mecanismos que regulan la producción de enzimas degradadoras de lignocelulosa.
- Evaluar la viabilidad que tienen las enzimas producidas por los hongos evaluados en este estudio para emplearlas en procesos biotecnológicos, considerando factores como costos y tiempo necesario para la obtención de las enzimas.

- Identificar la especie de los troncos colonizados por los hongos, ya que este puede ser otro factor que también se encuentre relacionado con el comportamiento en la actividad enzimática de los hongos descomponedores de madera.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. México: AGT. 491 p.

Alexopoulos C. Introductory Mycology. 1996. Fourth Edition. John Wiley and Sons. New York, USA. 869 p.

Aro N., Pakula T., Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 719-739.

Atlas R., Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley. Madrid, España. 677 p.

Baldrian P. 2004. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 50 (2004) 245–253.

Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30(2):215-242.

Beguin P., Aubert J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 25-58.

Bourbonnais R, Paice M.G., Freiermuth B, Bodie E., Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft Pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4627-4632

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

British Mycological Society. 2006. Collecting and recording fungi. British Mycological Society. Inglaterra 50 p.

Buswell J. 1992. Fungal Degradation of Lignin. en: Arora D.K., Rai B & Knudsen B. Handbook of applied mycology. Vol 1. Soil and plants. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 736 p.

Cameron M., Aust S. 2001. Cellobiose dehydrogenase-an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 129-138.

Cullen D., Kersten P.J. 2004. Enzymology and molecular biology of lignin degradation. en: Brambl R & Marzlut. The Mycota III. Biochemistry and molecular biology. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 447 p.

D'Souza T., Boominathan K., Reddy A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3739-3744.

Deacon J. 2002 *Modern Mycology*. Third Edition. Blackwell Science. Edinburgh, United Kingdom. 303 p.

Dumonceaux T., Bartholomeo K., Valeanu L., Charles T., Archibld F. 2001. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and non essential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 478-489.

Falck R., Haag W. 1927. Der lignin und der cellulose. *Abbau des holzes*. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 60: 225.

Fernandes L., Loguercio-Leite C., Esposito E., Menezes M. 2005. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55:187-193.

Forchiassin F. 2005. *Manual de micología experimental*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina. 29 p.

Garzillo AM.V., Colao M.C., Caruso C. 1998. Laccase from white-rot fungus *Trametes trogii*. Applied Microbiology and Biotechnology 49:545-551.

Ghahfarokhi M., Fazli A., Lofti A., Abyaneh M. 2004. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. Iranian Biomedical Journal 8 (2):107-111.

Glazer A., Nikaido, H . 1998. Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. W.H. Freeman. New York, U.S.A. 662 p.

González R., 1996. Preservación de madera con taninos. Madera y Bosques 2:67-73.

Godio R.P., Mercuri, O.A., Forchiassin, F. 2000. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad ligninolítica de *Stereum hirsutum*. Revista Argentina de Microbiología 32: 7-14.

Guillén-Navarro G., Márquez-Rocha, F., Sánchez-Vásquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Revista Iberoamericana de Micología 15: 302-306.

Ha H. C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. Applied Microbiology Biotechnology 55:704-711.

Henriksson G., Johansson, G., Pettersson, G. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. Journal of Biotechnology 78: 93-113.

Henriksson, G., Zhang, L., Li, J., Ljungkuist, P., Reitberger, T., Pettersson, G., Johansson, G. 2000. Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme?. Biochimica et Biophysica Acta 1480: 83-91.

Herrera, J., Rosas, J. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y

*Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes en la industria papelera (Tesis de pregrado de la carrera Microbiología Industrial). Bogotá, Colombia. 171p.

Instituto Nacional de Biodiversidad INBio. 1999. Curso avanzado de hongos para parataxónomos; taller de seguimiento. Argentina. [http://www.inbio.ac.cr/papers/gt\\_Hongos/es](http://www.inbio.ac.cr/papers/gt_Hongos/es). [Consulta: 13 Agos. 2005].

Jasalavich, C., Ostrofsky, A., Jellison, J. 2000. Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA. Applied and Environmental Microbiology 66: 4725–4734.

Kirk., T., Cullen., D. 1998. Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. Young, R., Akhtar, M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 592 p.

Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K.T, Hatakka, A., Hofrichter, M. 2005. Mineralization of <sup>14</sup>C – labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. Applied Microbiology and Biotechnology 69 (5): 573-579.

Kruys, N., Fries, C., Jonsson, G.B., Lamas, T., Stahl, G. 1999. Wood-inhabiting cryptogams on dead Norway spruce (*Picea abies*) trees in managed Swedish boreal forest. Canadian Journal of Forest Research 29: 178-186.

Mackensen, J., Bauhus, J., Webber, E. 2003. Decomposition rates of coarse woody debris-A review with particular emphasis on Australian tree species. Australian Journal of Botany 51: 27-37.

Mansur, M. Arias., M, Copa-Patiño., J, Flärdh., M, Gonzalez., A. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* laccase isozymes with different substrate specificities. Mycologia 95 (3): 1013-1020.

Markham, P., Bazin, M. 1991. Handbook of applied mycology. Soil and plants. Vol 1. Chapter 15: Decomposition of cellulose by fungi. Banaras Hindu University. Vanarasi, India. 697 p.

Martínez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gutiérrez, A., del Río, J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8:195-204.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annals of Chemistry* 31:426-428.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. 2005. Estimación del consumo aparente de madera en rollo en Colombia. [http://www.agrocadenas.gov.co/forestal/forestal\\_reportes.htm](http://www.agrocadenas.gov.co/forestal/forestal_reportes.htm) [Consulta: 13 Ago. 2005].

Moore-Lackender, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey, USA. 574 p.

Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 1997. Induction and characterization of lacase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* *Current Microbiology* 34:1-5.

Nazareno, M., Bucsinszky, A., Tournier, H., Cabello, M., Arambarri, A. 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 64-68.

Nazareno, M., Martínez, M., Cabello, M., Arambarri, A. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 181-185.

Papinutti., V.L., Forchiassin., F. 2000. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Revista Argentina de Micología* 32:83-88.

Papinutti, V., Diorio, L.A., Forchiassin, F. 2003. Degradación de Madera de Álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Micología* 20:16-20.

Pedroza, A., Matiz, A., Quevedo, B. 2003. Manual de Laboratorio tecnología de fermentaciones. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 106 p.

Penttila, M., Saloheimo, M. 1999. Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. In: Oliver, R. and Schweizer, M. *Molecular fungal Biology*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom. 377 p.

Ramírez, A. 2002. Abundancia y diversidad de Aphylloporales lignícolas en centro y borde de fragmentos de bosque altoandino en el suroccidente de la sabana de Bogotá (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 134 p.

Rayner, ADM., Boddy., L. 1988. *Fungal Decomposition of Wood Its Biology and Ecology*. John Wiley and Sons Ltd. Inglaterra. 587 p.

Richards, D.B. 1954. Physical changes in the decaying wood. *Journal of Forestry* 52: 260-265.

Roy, BP., Dumonceaux, T., Koukoulas , AA., Archibald, FS. 1996. Purification and Characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4417 -4427.

Ryberg, M. 2000. Wood-inhabiting basidiomycetes in cool temperate deciduous forest (species richness and species density on different kinds of dead wood). Master thesis, Gothernburg University. 20 p.

Saldarriaga, Y. 2001. Manual de Micología Aplicada. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 97 p.

Saparrat, M., Guillén, F., Arambarri, A., Martínez, A., Martínez, M. 2002. Induction, Isolation, and Characterization of two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology 68:1534-1540.

Saparrat, M., Martínez, M., Cabello, M., Arambarri, A. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. Revista Iberoamericana de Micología 19: 181-185.

Sasaki, T., Kajino, T., Li, B., Sugiyama, H., Takahashi, H. 2001. New pulp biobleaching system involving manganase peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. Applied and Environmental Microbiology 67:813-817.

Savoie, J-M., Mata, G., Billette, C. 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma sp.* and Shiitake, *Lentinula edodes*. Applied Microbiology and Biotechnology 49: 589-593.

Schlosser, D., Grey, R., Fitsche, W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology 47:412-418.

Shin, K., Lee, Y. 2000. A novel extracellular peroxidase of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. Mycologia 92 (3): 537-544.

Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J.L., Asther, M., Sigoillot, J.C. 2002. Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. Enzyme and Microbial Technology 31:876-883.

Siegel, S., Castellan, N. 2001. Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas. Mexico D.F., México. 437 p.

Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., McClaugherty, C.A., Rayburn, L., Repert, D., Weiland, T. 1992. Wood decomposition over a first-order watershed: mass loss as a function of lignocellulase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 24(8): 743-749.

Siitonen, P., Lehtinen, A., Siitonen, M. 2005. Effects Of Forest Edges On The Distribution, Abundance, And Regional Persistence Of Wood-Rotting Fungi. *Conservation Biology* 19 (1): 250-260.

Srinivasan, C., D'souza, T., Boominathan, K., Reddy, C.A. 1995. Demonstration of Laccase in the white rot basidiomycete *Phanaerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4274-4277.

Temp, U., Eggert, C. 1999. Novel interaction between lacase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:389-395.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.

Universidad del Quindío. 1997. CIBUQ. Reserva natural La Montaña del Ocaso. <http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/index.htm>. [Consulta: 10 Ene. 2006].

Vallim, M., Janse, B., Gaskell, J., Pizzirani-Kleiner, A., Cullen, D. 1998. *Phanaerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood. *Applied and Environmental Microbiology* 64(5): 1924-1928.

Wainwright, M. 1995. Introducción a la biotecnología de hongos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 228 p.

Westermarck, U., Ericsson, K.E. 1988. Cellobiose Dehydrogenase (Quinone). *Methods in Enzymology* 160: 463-472

Worrall, J. 2005. Forest and Shade Tree Pathology. Wood Decay. [www.forestpathology.org](http://www.forestpathology.org). (Consulta: Marzo 3 de 2005).

Youn, H.-D., Kang, S-O. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white rot fungi. FEMS Microbiology Letters 132: 183-188.

Zabel, R., Morrell, J. 1992. Wood Microbiology. Academic Press. San Diego, U.S.A. 476 p.

Zar, J. 1999. Biostatistical analysis. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 663 p.

# AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HONGOS DESCOMPOVEDORES DE MADERA EN LA RESERVA NATURAL LA MONTAÑA DEL OCASO, QUIMBAYA – QUINDÍO

Deisy Fernanda Chaparro<sup>1</sup>, Diana Carolina Rosas<sup>2</sup> y Amanda Varela<sup>3</sup>  
Laboratorio de Ecología de Suelos y Hongos Tropicales, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

## Resumen

Se realizó la búsqueda de hongos de la pudrición blanca en bosque subandino, ubicado en la Reserva natural la Montaña del Ocaso – Quindío, Colombia y se evaluó su actividad ligninolítica. Se recolectaron hongos de la pudrición blanca pertenecientes al Phylum Ascomycota y Basidiomycota encontrados con mayor frecuencia en troncos caídos con diferentes estados de descomposición, con el fin de evaluar la capacidad enzimática de estos hongos y su relación con el estado de descomposición en los troncos colonizados. Los ejemplares fueron cultivados en medio agar extracto de malta 25°C durante 8 días. En las pruebas cualitativas de actividad enzimática los hongos aislados se sembraron en medio agar extracto de salvado de trigo modificado utilizando como inductor enzimático ABTS para evaluar la actividad lacasa y DCPIP para evaluar la actividad celobiosa deshidrogenasa; la temperatura de incubación fue 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días, evaluándose la actividad enzimática por el diámetro de halo que genera un cambio de color en el medio. De acuerdo con los resultados obtenidos en estas pruebas se seleccionaron los hongos con mayor capacidad de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa para evaluar su actividad enzimática en medio líquido extracto de salvado de trigo modificado por cada estado de descomposición en los troncos. Se escogió a *Cookeina sulcipes* para troncos en estado de descomposición 1, un hongo de la familia Corticiaceae para estado 2 de descomposición en troncos, *Xylaria. polymorpha* perteneciente al estado con descomposición 3 y *Earliella* sp. para el tronco con estado 4 de descomposición. No se evaluó ningún hongo del estado con descomposición 5 ya que en estos no se evidenció actividad celobiosa deshidrogenasa. La fermentación de estos hongos se realizó a 28°C por 11 días y 150 rpm; se realizaron mediciones diarias para la determinación de biomasa, glucosa liberada en el medio, actividad lacasa, actividad celobiosa deshidrogenasa y proteínas extracelulares. Se encontró en las pruebas cualitativas que las tasas de actividad enzimática de los hongos pertenecientes a troncos con el mismo estado de descomposición no siguen un mismo patrón. Los hongos que se encontraban en los troncos con estados de descomposición 1 al 3, aumentaban su actividad lacasa a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos. En cuanto a la actividad celobiosa deshidrogenasa se encontró una correlación positiva entre esta y el estado de descomposición de los troncos ya que en los estados 3 y 4 de descomposición se encuentran los hongos con mayores diámetros de los halos. En los resultados obtenidos en la fermentación se observó que el consumo de glucosa fue mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa en los Basidiomycota estudiados (*Earliella* y Corticiaceae); por el contrario, los hongos Ascomycota (*C. sulcipes* y *X. polymorpha*) tienen una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento. *Earliella* fue el hongo que presentó la mayor producción de biomasa (1140.19 g/l), de actividad lacasa (157 UL<sup>-1</sup>) y celobiosa deshidrogenasa (43,50 UL<sup>-1</sup>). Se evidenció que a medida que se presentaba un incremento en la actividad enzimática de la lacasa y de la celobiosa deshidrogenasa, el grado de descomposición de los troncos colonizados aumentaba. Este trabajo es el primer reporte de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en *Cookeina sulcipes* y *Earliella* sp.

**Palabras clave:** Pudrición blanca, lacasa, celobiosa deshidrogenasa, Ascomycota, Basidiomycota.

<sup>1</sup> Microbióloga industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. E-mail: [deisy.chaparro@javeriana.edu.co](mailto:deisy.chaparro@javeriana.edu.co).

<sup>2</sup> Microbióloga Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. E-mail: [d.rosas@javeriana.edu.co](mailto:d.rosas@javeriana.edu.co).

<sup>3</sup> Autora para correspondencia: Bióloga y Microbióloga, Ph.D. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. E-mail: [avarela@javeriana.edu.co](mailto:avarela@javeriana.edu.co).

# ISOLATION AND EVALUATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF WOOD DECAY FUNGI IN NATURAL RESERVE LA MONTAÑA DEL OCASO, QUIMBAYA – QUINDÍO

## Summary

In this work, was carried out the searching of autochthonous white rot fungi in a sub Andean forest, located in the natural reserve “La Montaña del Ocaso”, Quindío, Colombia, and was evaluated their enzymatic activity. White rot fungi belonging to the Phylum Basidiomycota and Ascomycota with more frequency in fallen trunks with different stages of decay was recollected, with the purpose of knowing the enzymatic capacity of these fungi and their relation with the state of decay in the colonized trunks. The strains were cultivated in malt extract agar to a temperature of 25°C during 8 days. In the qualitative tests of enzymatic activity, the isolated fungi were cultivated in modified wheat bran agar at 25°C, using ABTS as enzymatic inducer to evaluate the activity laccase, and DCPIP to evaluate the activity cellobiose dehydrogenase; activity was measured daily, during 8 days in terms of the halo diameter that presents change of color in the medium. In accordance with the results obtained in these test, the strains with higher laccase and cellobiose dehydrogenase activity from each state of decomposition in the trunks were cultivated in modified wheat bran liquid medium. The strains cultivated were: *Cookeina sulcipes* from trunks with stage of decay 1, a strain from the family Corticiaceae from trunks with stage of decay 2, *Xylaria polymorpha* from trunks with stage of decay 3 and *Earliella* sp. from trunks with stage of decay 4. Any strain from stay of decay 5 was not cultivated in liquid medium because of activity cellobiose dehydrogenase was not evidenced. The fermentation was realized at 28°C during 11 days in a rotatory shaker at 150 rpm; Biomass, glucose, extracellular proteins and enzyme activities measurements were performed daily. The rates of enzyme activities of the strains belonging to trunks with the same state of decomposition don't follow oneself pattern. The strains that were in the trunks with states of decomposition 1 to 3, increased their activity laccase as the state of decomposition of the trunks increased. There were found a positive correlation between the celobiose dehydrogenase activity and the state of decay of the trunks, which is evidenced with the maximum diameter of the halos belonging to the trunks with states of decomposition 3 and 4. In the results obtained in the fermentation it was observed that the consumption of glucose went higher than cellulolytic activity when the biomass production increases in the fungi from the Phylum Basidiomycota studied (*Earliella* sp. and Corticiaceae); on the contrary, the Ascomycota (*Cookeina sulcipes* and *Xylaria polymorpha*) have a higher cellulolytic activity than the consumption of glucose in its stage of growth. The fungi which presented the highest biomass production (1140,19 g/l), laccase activity (157 UL<sup>-1</sup>) and cellobiose dehydrogenase activity (43,50 UL<sup>-1</sup>) was *Earliella*. In this work, a synergism was evidenced between the enzymes laccase and cellobiose dehydrogenase. This study shows that the grade of decomposition of the trunks increases as the laccase activity and cellobiose dehydrogenase activity present an increment. This work is the first report of laccase and cellobiose dehydrogenase activity in *Cookeina sulcipes* and *Earliella* sp.

**Key words:** White rot, laccase, cellobiose dehydrogenase, Ascomycota, Basidiomycota.

## **Introducción:**

Los hongos de la pudrición blanca, tanto Ascomycota como Basidiomycota, juegan un papel importante en los bosques al ser los únicos organismos capaces de descomponer los componentes de la madera hasta su total mineralización [1], llegando finalmente a la formación de capas de humus en el suelo. El hongo al establecerse en la madera, desarrolla hifas de 1 a 2  $\mu$  de diámetro colonizando rápidamente las paredes y lúmenes celulares, produciendo una transformación bioquímica con proyección física [2]. Esto causa un menor porcentaje de lignina en el tronco, una lignina que es modificada cualitativamente y una madera más porosa [3].

La actividad enzimática de los hongos descomponedores de madera es de gran importancia tanto a nivel ecológico como industrial ya que su complejo enzimático especializado de peroxidases, lacasas y celulasas como la celobiosa deshidrogenasa, tienen gran importancia dentro del ciclo del carbono. Además, pueden causar grandes perjuicios a nivel económico en la industria maderera ya que al alterar los componentes celulares cambian las propiedades físicas y químicas de la madera. Debido a su inespecificidad, la actividad enzimática de los hongos de la pudrición blanca presenta una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria del papel, de textiles y tintes, de alimentos y en procesos de detoxificación.

Aunque la tasa de descomposición depende parcialmente del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa del tronco[4], la actividad enzimática determina el estado de descomposición del tronco [5]. Sin embargo, no se conoce claramente como influyen enzimas como la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa en el grado de pudrición de la madera.

Se han realizado muy pocos estudios de los hongos nativos de la pudrición tanto en su hábitat natural como *ex situ*, así como, sobre las posibilidades de utilizarlos biotecnológicamente. Por tal razón, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad enzimática de la lacasa y celobiosa deshidrogenasa de hongos en bosque subandino causantes de la pudrición blanca,

que colonizan troncos caídos en La Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya (Quindío) y establecer su relación con el estado de descomposición de los troncos.

## **Materiales y Métodos**

*Área de estudio.* El estudio se realizó en dos fragmentos de bosque subandino (Ocaso y Veraguas) ubicados en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, en el municipio de Quimbaya (Quindío, Colombia) a una altitud que oscila entre 975 y 1100 m. Su precipitación media es de 1691 mm/año y una temperatura media de 24°C [6].

*Recolección de ejemplares.* Se tomaron muestras de hongos presentes en troncos caídos trazando transectos en cada fragmento de bosque de la Reserva La Montaña del Ocaso. Los transectos trazados fueron de 100 m<sup>2</sup> y dentro de estos se encontraban seis parcelas de (20 x 5 m) paralelas entre sí desde el borde del bosque hasta aproximadamente los 100 m hacia el interior.

En cada tronco se colectaron los hongos presentes (carpóforos visibles) con una navaja, conservando fragmentos del tronco como sustrato. Se seleccionaron los hongos que se encontraron con mayor frecuencia y en diferentes estados de descomposición dentro de los transectos estudiados para evaluar la actividad enzimática de cada uno de ellos de acuerdo a su estado de descomposición.

*Determinación del estado de descomposición de los troncos.* Se introdujo una varilla de 25 cm de largo en los troncos colonizados para determinar el estado de descomposición [7]. Se definieron cinco estados de descomposición de acuerdo a la penetración de la varilla y estado del tronco [8]:

Estado 1: el cuchillo penetra unos pocos milímetros del tronco y la madera permanece intacta.

Estado 2: el cuchillo penetra unos pocos milímetros del tronco y la madera empieza a romperse.

Estado 3: el cuchillo penetra de 1 a 2 cm el tronco, la madera se rompe más.

Estado 4: el cuchillo penetra de 2 a 5 cm fácilmente. Algunas partes del tronco se quiebran con facilidad.

Estado 5: el cuchillo penetra todo el tronco. La madera esta totalmente descompuesta.

***Aislamiento y condiciones de cultivo.*** Se realizó una desinfección al carpóforo con hipoclorito de sodio al 5%, alcohol etílico al 70% y agua destilada estéril y posteriormente se sembraron en agar extracto de malta al 2% (p/v) suplementado con extracto de levadura al 0,4% (p/v). Luego se llevaron a incubar a 25°C por 8 días. Una vez aislados se mantuvieron a 4°C, en tubo inclinado con este mismo medio [9].

***Pruebas cualitativas de actividad enzimática.*** Se tomó un disco de agar de los hongos aislados en el medio extracto de malta con un diámetro de 0,5 cm, que se colocó en forma de sandwich sobre placas de agar que contenían un medio reportado por Ha *et al.* [10] modificado cuya composición (p/v) es: 1% de celulosa, 0,5% de peptona, 0,2% de extracto de levadura, 0,0075% de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,01% de  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$  y 2% de agar-agar, disuelto en una solución de extracto de salvado de trigo, previamente preparado por extracción inmediata de 175 g de salvado de trigo con 1000 ml de agua destilada. El pH se ajustó a 5,8-6,0 con la adición de las sales  $KH_2PO_4$  al 0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al 0,05%. La temperatura de incubación fue de 25°C y se realizaron mediciones diarias durante 8 días.

Para la selección de los hongos con actividad lacasa el medio fue suplementado con 0,2 g de ABTS [2,2' azino-bis-(3 ethyl benzthiazoline sulphato acid)] como inductor enzimático. Para la identificar los hongos con actividad celobiosa deshidrogenasa, el medio fue suplementado con 1mM de diclorofenolindofenol (DCPIP). La actividad enzimática se cuantificó de acuerdo al diámetro del halo, con la cual está directamente relacionado: a mayor diámetro mayor actividad enzimática [11,12].

***Fermentación discontinua.*** Se seleccionaron los hongos que presentaron mayor actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa (uno por cada estado de descomposición). Se tomaron tres discos de agar de 0,5 cm de diámetro con los respectivos hongos crecidos, los cuales fueron inoculados en un erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio extracto de salvado de trigo. El pH se ajustó a  $6.0 \pm 0.2$  [13]. Las fermentaciones se realizaron por triplicado durante 10 días en agitación continua a 150 rpm y a una temperatura de  $29 \pm 1$  °C [14].

Se tomaron muestras cada 24 horas verificando la pureza mediante coloración de Gram y azul de lactofenol. Se realizaron mediciones de pH y se tomaron muestras a las cuales se les realizó una centrifugación a 10000 rpm durante 25 minutos y a partir del sobrenadante se determinó el consumo de sustrato, la cantidad de proteínas extracelulares y se cuantificó la actividad enzimática de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa. El pellet se utilizó para la determinación de biomasa. Las anteriores mediciones se realizaron por triplicado.

***Determinación de biomasa.*** A partir de 50 mg de micelio seco homogenizado se realizó una hidrólisis alcalina con 1 ml de NaOH 1N. Esto se llevó a un baño termostataado a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante recuperado se utilizó para cuantificar las proteínas del micelio mediante la técnica de Bradford [15]. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de proteínas de micelio por ml de medio[16].

***Determinación de glucosa en el medio.*** Se utilizó la técnica de DNS, ácido 3,5 dinitrosalicílico [17]. A partir de las muestras tomadas diariamente. Después de centrifugar en cada período de la fermentación se tomaron 0,25 ml del sobrenadante y se agregaron a tubos que contenían 0,25 ml del reactivo de DNS; el blanco contenía 0,25 ml del reactivo. Las mediciones se realizaron determinando la absorbancia a 540 nm, ajustando el cero de la absorbancia con el blanco de la prueba[18].

***Determinación de lacasa.*** Se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación de ABTS. Se tomaron 100 µl del sobrenadante (se ajustó a pH 4,5) y 2,5 de buffer acetato de sodio (pH 4,5), que contiene 0,5 mM de ABTS. La concentración de reacción fue 0,5 mM ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenziazoline-6-sulfonato) en 100 mM buffer acetato de sodio pH 5. La actividad enzimática se halló calculando la absorbancia a 420 nm por 5 minutos a 30°C, ( $\epsilon_{420} 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [16,19]. Una unidad de actividad lacasa se define como moles de producto/min.l [16].

***Determinación de celobiosa deshidrogenasa.*** Se realizó mediante la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). La técnica se llevó a cabo tomando 150 µl de DCPIP 2 mM en 50 mM de buffer acetato de sodio a pH 4,5, que contiene 1700 µl de celobiosa 2,5 mM. Como inhibidor de la actividad lacasa se utilizó 100 µl de fluoruro de sodio 4 mM y se tomaron 100 µl de la muestra. La lectura se realizó a 600 nm, 37°C utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1.85 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [11,20]. Una unidad de actividad celobiosa deshidrogenasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 mmol de DCPIP/ min.l, bajo las condiciones de ensayo [16].

***Determinación de proteínas extracelulares.*** Se llevo a cabo mediante la técnica de Bradford [15].

**Análisis estadístico.** El análisis de los resultados se llevó a cabo con un nivel de significancia de 0,05, utilizando el programa Statistica 6.0. Para el análisis de las pruebas cualitativas se realizó un análisis de covarianza [21]; se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman [22] para encontrar la relación existente entre la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos evaluados con el estado de descomposición de los troncos y, para evaluar la relación existente entre todas variables de la fermentación; se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Friedman [22] con el fin de conocer las diferencias existentes entre los hongos evaluados durante la fermentación para cada variable.

### Resultados y Discusión.

Se tomaron carpóforos de 37 hongos, que correspondían a los más frecuentes en cada estado de descomposición dentro de los transectos trazados. De los hongos sembrados en agar extracto de malta, cuatro de estos no crecieron (Tabla 1).

**Tabla 1. Lista de hongos recolectados, estado de descomposición y crecimiento abundante (++) , crecimiento limitado (+) y ausencia de crecimiento (-) .**

Especie/Gènero/ Familia	Estado de descomposición	Crecimiento
T3P4t34V	1	-
Corticiaceae	1	-
<i>Cookeina sulcipes</i>	1	++
<i>Cookeina tricholoma</i>	1	++
<i>Hypoxylon</i> sp.	1	++
posible Polyporaceae	1	-
<i>Phellinus</i>	1	++
Corticiaceae	1	++
<i>Trametes</i> sp.	1	++
<i>Xylaria hypoxylon</i>	1	+
<i>Hypoxylon</i> sp.	2	+

<i>Phylacia poculiformis</i>	2	++
Corticiaceae	2	++
<i>Earliella</i>	2	++
Polyporaceae	2	++
<i>Polyporus</i>	2	++
<i>Xylaria polymorpha</i>	2	++
<i>Phellinus</i>	3	++
Corticiaceae	3	+
<i>Trametes</i> sp.	3	+
<i>Earliella scabrosa</i>	3	++
<i>Earliella</i>	3	++
Corticiaceae	3	++
<i>Trametes</i> sp.	3	++
<i>Xylaria polymorpha</i>	3	++
Corticiaceae	3	+
<i>Xylaria</i> sp.	3	+
Corticiaceae	4	+
<i>Ramaria</i> sp.	4	++
Corticiaceae	4	++
<i>Cookeina tricholoma</i>	5	+
<i>Ramaria</i> sp.	5	++
T2P5t33h1V	5	+
<i>Mycobonia flava</i>	5	++
Corticiaceae	5	++
Agarical	3	++

### ***Pruebas Cualitativas.***

Se seleccionaron los hongos aislados que tuvieron mayor crecimiento en el medio extracto de malta para evaluar la producción cualitativa. El ABTS evidenció la actividad lacasa por la formación de halos de color verdoso alrededor del micelio debido a la oxidación del ABTS. La actividad de la celobiosa deshidrogenasa se observó por la formación de halos de color amarillo claro como producto de la reacción de reducción del DCPIP.

Los hongos que tuvieron mayor actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa fueron *Trametes* sp. y *Xylaria polymorpha* los cuales se encontraron en troncos en el estado 3 de descomposición, y *Earliella* que se encontraba en troncos en el estado 4 de descomposición (Tabla 2).

**Tabla 2. Evaluación de la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo con ABTS y DCPIP como inductores, a una temperatura de 28°C, durante 8 días.**

<b>Especie/Género/ Familia</b>	<b>Estado de descomposición</b>	<b>Tamaño de halo final de actividad lacasa (mm)</b>	<b>Tamaño de halo final de actividad CDH (mm)</b>
<i>Cookeina sulcipes</i>	1	16	17
<i>Cookeina tricholoma</i>	1	37	39
<i>Phellinus</i>	1	14	13
Corticiaceae	1	17	16
<i>Trametes</i> sp.	1	8	16
<i>Hypoxylon</i>	2	15	12
Corticiaceae	2	13	10
<i>Earliella</i>	2	18	13
Corticiaceae	2	16	12
<i>Xylaria polymorpha</i>	2	35	51
<i>Earliella scabrosa</i>	3	6	15
<i>Earliella</i>	3	13	12
<i>Trametes</i> sp.	3	71	78
<i>Xylaria polymorpha</i>	3	84	82
<i>Earliella</i>	4	20	90
<i>Ramaria</i> sp.	5	60	0
<i>Earliella</i>	5	30	0

En la mayoría de placas de agar, se observaron secreciones de material mucilaginoso oleoso sobre el micelio. Esta secreción se conoce como envoltura hifal y probablemente contribuye a la inmovilización de metales pesados [5].

Se encontró que las tasas de actividad enzimática lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos pertenecientes a troncos con el mismo estado de descomposición no siguen un mismo patrón, es decir, pueden presentar igualdad en la tasa de actividad enzimática así como también presentar diferencias. Lo mismo sucede al evaluar la tasa de actividad enzimática entre los hongos encontrados en troncos con diferentes estados de descomposición. Igualmente, no se puede establecer el comportamiento de la tasa de actividad enzimática de acuerdo al Phylum en que se encuentren los hongos, ya sea Basidiomycota y Ascomycota.

Estos resultados indican que el comportamiento en la tasa de actividad enzimática depende solamente de la fisiología de cada hongo.

No hay estudios reportados acerca de la tasa de actividad lacasa y CDH de los hongos de la pudrición blanca respecto al estado de descomposición de los troncos. Sin embargo, es probable que la tasa de actividad enzimática de un hongo de determinada especie, ya sea del Phylum Ascomycota o Basidiomycota, pueda influenciar en el estado de descomposición del tronco en el que se encuentre; esto se puede observar en el caso de el Ascomycota *Xylaria polymorpha* que se encontraba en troncos con estado de descomposición 2, presentó una tasa de actividad lacasa de 4,50 mm de ABTS oxidado/día, mientras que en troncos con estado 3 de descomposición la tasa de actividad lacasa fue de 11,42 mm de ABTS oxidado/día, mostrando una actividad lacasa casi del doble a la de *X. polymorpha* que se encontraba en troncos con estado 2 de descomposición ( $q= 10,23$ ,  $P < 0,05$ ).

Con respecto a la tasa de actividad celobiosa deshidrogenasa, *X. polymorpha* también tuvo un comportamiento diferente en cada estado de descomposición del tronco. En troncos con estado 2 de descomposición, la tasa de actividad CDH fue de 3,35 mm de DCPIP reducido/día; *Xylaria polymorpha* en troncos con estado 3 de descomposición, aumentó a un poco más del triple su tasa de actividad celobiosa deshidrogenasa a 10,94 mm de DCPIP reducido/día ( $q= 22,05$ ,  $P < 0,05$ ). El basidiomicete *Trametes* sp. encontrándose en troncos con estado 1 de descomposición, presentó un comportamiento parecido, mostrando una tasa de actividad lacasa de 1,60 mm de ABTS oxidado/día; en el tronco de estado 3 de descomposición *Trametes* sp. aumentó notablemente la tasa de actividad lacasa a 10,38 mm de ABTS oxidado/día ( $q= 21,42$ ,  $P < 0,05$ ). En cuanto a la actividad celobiosa deshidrogenasa de *Trametes* sp. en troncos con estado 1 de descomposición, la tasa de actividad fue de 1,33 mm de DCPIP reducido/día, mientras que encontrándose en troncos con estado 3 de descomposición presentó una tasa de 10,17 mm de DCPIP reducido/día, observando un gran aumento en esta producción ( $q= 38,13$ ,  $P < 0,05$ ).

Se observó que en los hongos que se encontraban en los troncos con estado de descomposición 1 al 3, aumentaba la actividad lacasa a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos. En troncos con estado 4 de descomposición se encontró un menor diámetro de halo de actividad lacasa (20 mm); esto pudo deberse a que el hongo del género *Earliella* tenga una tasa menor de actividad lacasa en función al tiempo, ya que a diferencia de los hongos que se encuentran en troncos con estados de descomposición menores, la actividad lacasa se evidencio a partir del día 5. Es probable que a un tiempo de evaluación superior a 8 días, el genero *Earliella* presente una actividad lacasa en las placas de agar aún mayor que la actividad encontrada en los hongos pertenecientes a troncos con estado 3 de descomposición.

En los estados 3 y 4 de descomposición se encuentran los hongos con mayores diámetros de los halos de la actividad CDH. No se detectó actividad celobiosa deshidrogenasa en los hongos que se encontraban en troncos de estado 5 de descomposición; esto pudo suceder porque en este estado de descomposición se presentan muy bajos porcentajes de celulosa y lignina debido a que la mayor parte del tronco se ha degradado totalmente, dando como producto otras fuentes de carbono como la glucosa, dextrinas y dímeros de celobiosa. La celobiosa deshidrogenasa se produce generalmente bajo condiciones celulolíticas, es decir cuando la celulosa es la principal fuente de carbono y sufre una represión catabólica cuando la celobiosa o la glucosa se encuentran en altas concentraciones [23], razón por la cual, pudo no haberse evidenciado actividad celobiosa deshidrogenasa en los hongos de troncos de estado de descomposición 5 (Tabla 2).

En general, se evidenció que la actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos evaluados aumentan proporcionalmente ( $r^2 = 0,70$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 41$ ). Aunque no se conoce claramente la función biológica de la celobiosa deshidrogenasa, esta enzima es esencial para la invasión y degradación de la madera en los ecosistemas forestales [24].

Los hongos encontrados en los troncos con estado 5 de descomposición presentaron actividad lacasa mas no evidenciaron actividad celobiosa deshidrogenasa. Esto pudo suceder porque la enzima lacasa reoxida todos los aceptores de electrones conocidos de la celobiosa deshidrogenasa incluyendo el DCPIP [23], por lo tanto la lacasa pudo enmascarar la actividad de la celobiosa deshidrogenasa.

Pueden encontrarse grandes variaciones en la actividad enzimática entre diferentes cepas de una misma especie, de acuerdo al estado de descomposición en que se encuentra el tronco [4]. Este es el caso de *Trametes* sp. que se encontraba colonizando troncos en estado 1 de descomposición presentó halos de actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de 8 y 16 mm, mientras que en el tronco de estado 3 de descomposición esta misma especie presentó halos de 71 y 78 mm respectivamente. Asimismo *X. polymorpha* en estado 2 de descomposición del tronco evidenció halos de actividad lacasa de 35 mm y halos de actividad celobiosa deshidrogenasa de 51 mm y en el tronco de estado 3 de descomposición, *X. polymorpha* presentó una mayor actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa con halos de 84 y 82 mm, respectivamente.

#### ***Fermentación discontinua.***

De los hongos evaluados en las pruebas cualitativas se seleccionaron los hongos con mayor diámetro de halo de actividad lacasa y actividad celobiosa deshidrogenasa. Se seleccionó un hongo de troncos con diferente estado de descomposición: *Cookeina sulcipes* para el tronco con estado de descomposición 1, un hongo de la familia *Corticaceae* para el tronco con estado de descomposición 2, *Xylaria polymorpha* para el tronco de estado con descomposición 3 y el genero *Earliella* para el tronco con estado de descomposición 4. No se evaluó ningún hongo perteneciente a los troncos con estado 5 de descomposición ya que presentaron muy poca actividad lacasa y ausencia de actividad celobiosa deshidrogenasa en placa.

*Cookeina sulcipes* es un hongo del Phylum Ascomycota que se encuentra principalmente en troncos caídos con un estado de descomposición 1, el hongo de la familia Corticiaceae pertenece al Phylum Basidiomycota es representativo de troncos en estado 2, *Xylaria polymorpha* es un Ascomycota que coloniza troncos con estados de descomposición 3 y por último, el hongo del genero *Earliella* es un hongo del Phylum Ascomycota que se encuentra generalmente en troncos con estados de descomposición 4.

### ***Biomasa y glucosa.***

Los Basidiomycota presentaron una relación inversa entre la biomasa y la glucosa en el medio (Figura 1 y 2), lo cual indica que en los hongos que pertenecen a este Phylum, el consumo de glucosa es mayor a la actividad celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa. Por el contrario, en los Ascomycota el pico más alto de glucosa liberada se presentó al mismo tiempo que hubo mayor producción de biomasa; esto muestra que los hongos del Phylum Ascomycota tienen una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento.

Aunque el comportamiento de la glucosa es uno de los factores más relacionados con el crecimiento fúngico, no sólo está involucrado el proceso de degradación de glucosa sino también el proceso enzimático de degradación de celulosa y celobiosa, siendo la celulosa la principal fuente de carbono disponible en el medio extracto de salvado de trigo y en el hábitat natural de los hongos de la pudrición blanca [24].

### ***Actividad Enzimática.***

Mediante el análisis de varianza de Friedman se determinaron diferencias significativas entre los hongos encontrados en troncos de diferentes estados de descomposición para la actividad lacasa ( $Fr = 1, P < 0,05$ ), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre

*Cookeina sulcipes* que se encontraba en troncos con estado 1 de descomposición y *Earliella* que se encontraba en troncos con estado de descomposición 4, la cual tuvo la mayor producción de lacasa con una actividad de  $157 \text{ UL}^{-1}$ , en comparación con los hongos pertenecientes a los estados de descomposición de los troncos 1, 2 y 3 que tuvieron una actividad de  $37 \text{ UL}^{-1}$ ,  $62 \text{ UL}^{-1}$  y  $72 \text{ UL}^{-1}$  respectivamente, lo cual indica que a mayor estado de descomposición mayor actividad lacasa. También se observó que la actividad lacasa de los hongos de estados de descomposición de troncos 1 y 2 expresaron la enzima con mayor rapidez que en los hongos de estados de descomposición de troncos 3 y 4; *C. sulcipes* y el hongo de la familia Corticiaceae presentaron su mayor actividad el día 6, *X. polymorpha* el día 8 y *Earliella* el día 9 (Figura 3).

La actividad lacasa se ha reportado en *Xylaria* sp., *Xylaria hypoxylon* y *Xylaria polymorpha*. Mediante la técnica de ABTS *X. hypoxylon* y *X. polymorpha* han mostrado una alta actividad lacasa [25]. Por otro lado, no se han publicado estudios de actividad lacasa en hongos del género *Cookeina* ni *Earliella*. Este es el primer reporte de actividad enzimática lacasa para estos hongos nativos.

Se ha reportado que la síntesis de la actividad lacasa es constitutiva [26], ya que la actividad incrementa proporcionalmente con la producción de biomasa; sin embargo, otros autores afirman que las enzimas ligninolíticas de los hongos de la pudrición blanca son producidas en el metabolismo secundario, es decir en la idiofase [10,27]. En este estudio, se observaron los dos fenómenos de acuerdo al estado de descomposición de los troncos, ya que a medida que aumentaba el estado de descomposición de los troncos, hubo una menor relación de la actividad lacasa con la producción de biomasa por los hongos evaluados, encontrándose el tronco con estado de descomposición 1 colonizado por *C. sulcipes* presentó la mayor producción de la enzima y la mayor concentración de biomasa y *Earliella* que se encontraba en troncos con estado con descomposición 4 presentó la máxima producción de actividad lacasa el día 9, es decir, cinco días después del punto máximo de producción de biomasa.

Con esto se podría afirmar que en los troncos de estados iniciales de descomposición la actividad enzimática lacasa producida por los hongos se comporta de manera constitutiva, y en los troncos con estados avanzados de descomposición la actividad lacasa hace parte del metabolismo secundario.

Se observó que a medida que aumenta el estado de descomposición de los troncos, hay un ligero aumento de la actividad enzimática celobiosa deshidrogenasa en los hongos. *Xylaria polymorpha* encontrada en troncos con estado 3 de descomposición tuvo una actividad celobiosa deshidrogenasa de 43,43 UL<sup>-1</sup> y *Earliella* encontrada en el tronco con estado 4 de descomposición, presentó una actividad de 43,50 UL<sup>-1</sup>, el hongo de la familia Corticiaceae presente en el tronco con estado 2 de descomposición mostró una actividad de 37,66 UL<sup>-1</sup> y *Cookeina sulcipes*, que corresponde al tronco con estado 1 de descomposición tuvo una actividad de 35,59 UL<sup>-1</sup> (Figura 4). Hasta la fecha, prácticamente son nulos los estudios realizados en el país de la enzima celobiosa deshidrogenasa y, al igual que la actividad enzimática lacasa, este es el primer reporte de actividad celobiosa deshidrogenasa en hongos del género *Cookeina* y *Earliella*.

La producción más alta de actividad celobiosa deshidrogenasa reportada en los hongos de la pudrición blanca es en una cepa de *Trametes versicolor*, con un valor de 270 U/l, medida mediante la técnica de clorpromazina [28]. Sin embargo, es difícil realizar comparaciones en cuanto a la producción de actividad celobiosa deshidrogenasa entre hongos, debido a las grandes diferencias en los resultados que se obtienen entre las diferentes técnicas de ensayo existentes para la cuantificación de esta enzima [29] ya que aún no se ha logrado establecer una técnica por la cual se obtengan resultados totalmente confiables.

Se encontró la existencia de una relación relativamente alta entre la concentración de biomasa y la actividad celobiosa deshidrogenasa ( $r^2 = 0,45$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 396$ ). *Earliella* fue el hongo que presentó mayor actividad celobiosa deshidrogenasa y mayor producción de biomasa; esto demuestra que este hongo tiene una gran actividad metabólica ya que puede asimilar los

nutrientes como la celulosa que es la fuente de carbono que se encontraba en el medio extracto de salvado de trigo y el cual es su sustrato natural; esto puede ser debido a que la celobiosa deshidrogenasa incrementa la actividad celulolítica mediante varios mecanismos entre los cuales se encuentra la oxidación de la celobiosa a celobionolactona evitando la inhibición por producto de las enzimas que hidrolizan la celulosa y despolimerizando la celulosa; esto trae como consecuencia el aumento de la tasa de degradación de la celulosa a moléculas que puedan ser asimiladas más fácilmente por el hongo, reflejándose en un incremento en la biomasa. Para *Earliella* esto puede ser una ventaja en cuanto a la colonización y degradación de sustratos de lignocelulosa en comparación con los hongos que colonizan troncos de estados de descomposición más bajos que presentaron una menor actividad celobiosa deshidrogenasa y menor producción de biomasa.

Sin embargo, la relación entre la degradación de la lignocelulosa por la acción de enzimas como la celobiosa deshidrogenasa y la producción de biomasa depende de la fisiología del hongo. Aunque una alta actividad metabólica combinada con una gran producción de biomasa es una característica ideal en los hongos degradadores de madera, hay hongos que presentan un crecimiento inversamente correlacionado a la actividad metabólica para la degradación de lignina y celulosa [4] como puede ser el caso de *Cookeina sulcipes*, ya que después de *Earliella* fue el hongo que tuvo mayor producción de biomasa y la más baja actividad celobiosa deshidrogenasa; este comportamiento también fue observado en el hongo de la familia Corticiaceae y *Xylaria polymorpha*.

La lacasa genera radicales fenólicos y quinonas a partir de la degradación de lignina, los cuales juegan un papel importante en la degradación de la celobiosa por la celobiosa deshidrogenasa; la CDH actúa sinérgicamente con la lacasa evitando la rápida repolimerización de los radicales fenólicos que pueden repolimerizar la lignina, ya que los radicales fenólicos son los precursores en la biosíntesis de la lignina; la remoción de quinonas tóxicas puede prevenir la repolimerización en la degradación de la lignina [30]. Además, la

celobiosa deshidrogenasa genera radicales tipo hidroxilo altamente reactivos, los cuales están involucrados en la degradación de la lignina ya que estos transforman las unidades no fenólicas en fenólicas facilitando así la degradación oxidativa por la lacasa [29]. Este sinergismo entre las enzimas lacasa y celobiosa deshidrogenasa se evidenció en este estudio al comparar la actividad de las dos enzimas en los hongos de la pudrición blanca que colonizan troncos caídos con diferentes estados de descomposición, encontrándose una relación estadísticamente significativa ( $r^2 = 0,53$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 396$ ).

Se observó que a medida que aumentaba el grado de descomposición de los troncos colonizados se presentaba un incremento en la actividad enzimática de la lacasa y de la celobiosa deshidrogenasa, confirmando los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas. Se ha demostrado la fuerte relación entre estas enzimas en sistemas ligninolíticos como los encontrados en todas las especies del género *Pycnoporus* [29] ya que la capacidad para degradar la madera depende exclusivamente de la actividad conjunta de la lacasa y la celobiosa deshidrogenasa.

Es necesario el conocimiento de hongos de la pudrición blanca y de su capacidad enzimática en la degradación de la lignocelulosa, ya que al ser los únicos organismos capaces de metabolizar los componentes de la madera hasta  $H_2O$  y  $CO_2$ , son de gran interés en la industria maderera, papelera, de textiles, y en el tratamiento de aguas residuales; además, son de gran importancia dentro del ecosistema ya que son indispensables dentro del ciclo del carbono. Se han realizado muy pocos estudios con el fin de conocer la biodiversidad de hongos descomponedores de madera de la pudrición blanca nativos y de su actividad metabólica. Este trabajo muestra que los hongos nativos de la pudrición blanca recolectados en bosque subandino tienen potencial enzimático en la degradación de sustratos lignocelulósicos, lo cual permite ampliar el conocimiento de la interacción entre las enzimas implicadas y como pueden alterar la composición de la madera. Esto sirve como base para

futuras investigaciones que evalúen sus posibles aplicaciones a nivel biotecnológico y como pueden contribuir al mantenimiento del ecosistema.

### **Agradecimientos.**

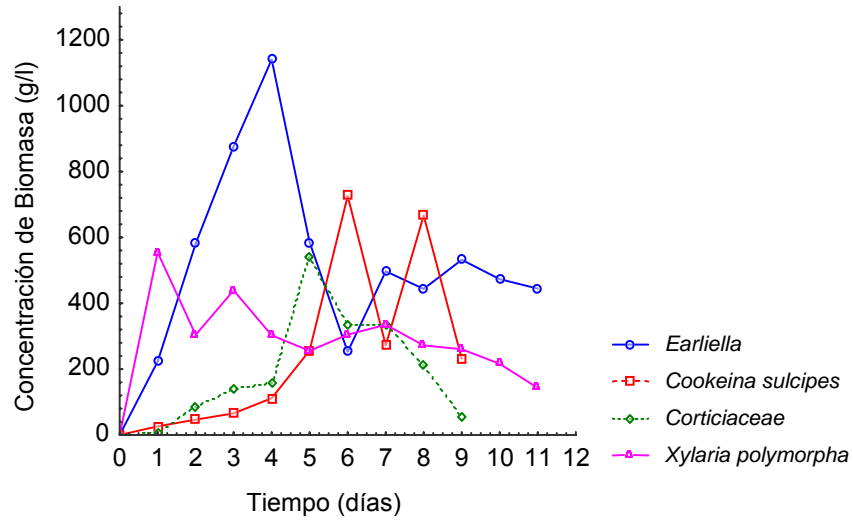
A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo financiero en el proyecto N° 2097. Al CIBUQ por permitirnos la entrada a la Reserva Natural La Montaña del Ocaso. A la Doctora Flavia Forchassin y compañeros del laboratorio de Micología experimental de la Universidad de Buenos Aires por su apoyo y capacitación sobre el tema. A Germán Darío Gómez por su asesoría y colaboración en la fase de campo y a Daniel Rodríguez por su colaboración en la recolección de ejemplares para la realización de este estudio.

### **Referencias.**

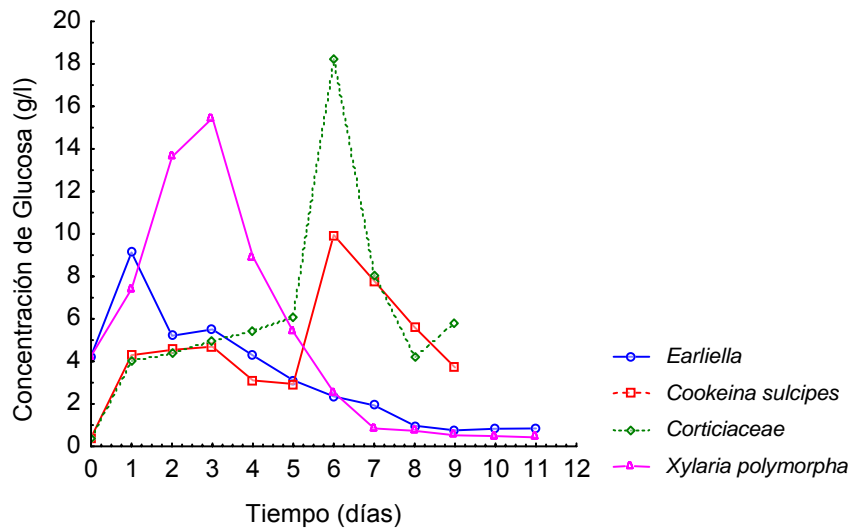
1. Buswell J. 1992. Fungal Degradation of Lignin. en: Arora D.K., Rai B & Knudsen B. Handbook of applied mycology. Vol 1. Soil and plants. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 736 p.
2. Kirk., T., Cullen., D. 1998. Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. Young, R., Akhtar, M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 592 p.
3. Wainwright, M. 1995. Introducción a la biotecnología de hongos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 228 p.
4. Rayner, ADM., Boddy., L. 1988. Fungal Descomposition of Wood Its Biology and Ecology. John Wiley and Sons Ltd. Inglaterra. 587 p.
5. Fernandes L., Loguercio-Leite C., Esposito E., Menezes M. 2005. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. International Biodeterioration and Biodegradation 55:187-193.
6. Universidad del Quindío. 1997. CIBUQ. Reserva natural La Montaña del Ocaso. <http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/index.htm>. [Consulta: 10 Ene. 2006].
7. Kruys, N., Fries, C., Jonsson, G.B., Lamas, T., Stahl, G. 1999. Wood-inhabiting cryptogams on dead Norway spruce (*Picea abies*) trees in managed Swedish boreal forest. Canadian Journal of Forest Research 29: 178-186.

8. Siitonen, P., Lehtinen, A., Siitonen, M. 2005. Effects Of Forest Edges On The Distribution, Abundance, And Regional Persistence Of Wood-Rotting Fungi. *Conservation Biology* 19 (1): 250-260.
9. Nazareno, M., Martínez, M., Cabello, M., Arambarri, A. 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 181-185.
10. Ha H. C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 55:704-711.
11. Ghahfarokhi M., Fazli A., Lofti A., Abyaneh M. 2004. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. *Iranian Biomedical Journal* 8 (2):107-111.
12. Herrera, J., Rosas, J. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes en la industria papelera (Tesis de pregrado de la carrera Microbiología Industrial). Bogotá, Colombia. 171p.
13. D'souza T., Boominathan K., Reddy A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3739-3744.
14. Guillén-Navarro G., Márquez-Rocha, F., Sánchez-Vásquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 302-306.
15. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
16. Forchiassin F. 2005. Manual de micología experimental. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina. 29 p.
17. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annals of Chemistry* 31:426-428.
18. Pedroza, A., Matiz, A., Quevedo, B. 2003. Manual de Laboratorio tecnología de fermentaciones. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 106 p.
19. Papinutti, V.L., Forchiassin, F. 2000. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Revista Argentina de Micología* 32:83-88.

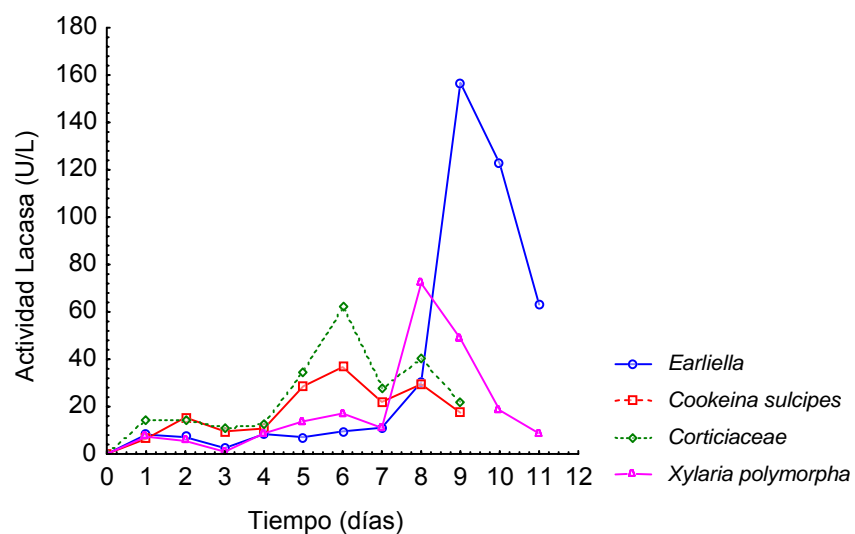
20. Temp, U., Eggert, C. 1999. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:389-395.
21. Zar, J. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 663 p.
22. Siegel, S., Castellan, N. 2001. *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta*. Editorial Trillas. Mexico D.F., México. 437 p.
23. Henriksson G., Johansson, G., Pettersson, G. 2000. A critical review of cellobiose deshydrogenases. *Journal of Biotechnology* 78: 93-113.
24. Dumonceaux T., Bartholomeo K., Valeanu L., Charles T., Archibld F. 2001. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and non esencial for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 478-489.
25. Liers, C., Ullrich, R, Steffen, K.T, Hatakka, A., Hofrichter, M. 2005. Mineralization of <sup>14</sup> – labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (5): 573-579.
26. Mansur, M. Arias., M, Copa-Patiño., J, Flärdh., M, Gonzalez., A. 2003. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95 (3): 1013-1020.
27. Penttila, M., Saloheimo, M. 1999. Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. In: Oliver, R. and Schweizer, M. *Molecular fungal Biology*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom. 377 p.
28. Roy, BP., Dumonceaux, T., Koukoulas , AA., Archibald, FS. 1996. Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4417 -4427.
29. Sigoillot , C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J.L., Asther, M., Sigoillot, J.C. 2002. Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology* 31:876-883.
30. Zabel, R., Morrell, J. 1992. *Wood Microbiology*. Academic Press. San Diego, U.S.A. 476 p.



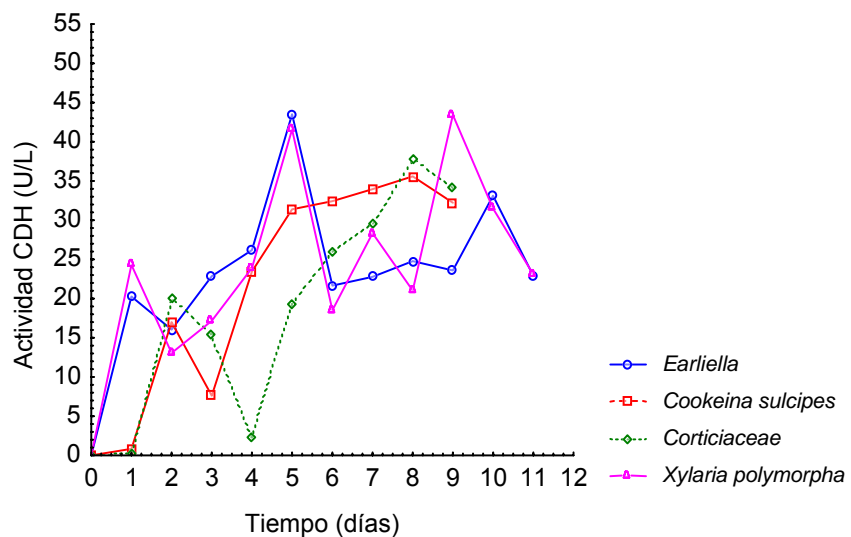
**Figura 1. Determinación de biomasa en el medio extracto de salvado de trigo de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha*, y *Earliella* durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**



**Figura 2. Determinación de glucosa en el medio extracto de salvado de trigo de *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha*, y *Earliella* durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**



**Figura 3. Determinación de actividad lacasa en el medio extracto de salvado de trigo por *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm**



**Figura 4. Determinación de actividad celobiosa deshidrogenasa en el medio extracto de salvado de trigo por *C. sulcipes*, el hongo de la familia Corticiaceae, *X. polymorpha* y *Earliella* durante 11 días, a una temperatura de 28°C y 150 rpm.**