

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE UN HONGO XILÓFAGO NO REPORTADO¹

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE LIGNOCELLULOLYTIC ACTIVITY OF AN UNREPORTED XYLOPHAGUS FUNGUS

Juárez-Hernández, E.O.; Molina-Calderón, C.C.

Instituto Politécnico Nacional. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, campus Guanajuato (UPIIG), Av. Mineral de Valenciana 200-Interior, Col. Fraccionamiento Industrial Puerto, 36275 Silao de la Victoria, México.

* E-mail: cielocmc@hotmail.com

Fecha de envío: 14, abril, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

Resumen:

La actividad enzimática de hongos xilófagos cambia las propiedades fisicoquímicas de la madera, dañando y fracturando así su estructura. Sin embargo, debido a su inespecificidad, presentan una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria. Se realizó la caracterización de un hongo no reportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, Guanajuato; durante un año en las instalaciones de UPIIG se realizó el análisis de su morfología para proponer su identificación a nivel especie, así como se evaluó su capacidad para degradar madera y actividad lignocelulolítica. Se cultivó el hongo por triplicado en medio PDA por seis semanas a 26°C, obteniendo un crecimiento lento de acuerdo a la bibliografía. Se evaluó su capacidad para degradar madera creciendo el hongo en medio PDA con 0, 0.8, 2.8 y 4% m/v de aserrín de pino bajo las mismas condiciones, disminuyendo así el diámetro de crecimiento en los mismos según aumentaba dicho porcentaje en comparación al control sin aserrín e identificando diferencias significativas entre los crecimientos en medios con y sin este compuesto mediante un análisis ANOVA y de Tukey. De igual manera, se evaluó su actividad ligninolítica, con resultados negativos en cuanto a su degradación. La actividad celulolítica se evaluó creciéndolo en medio sólido de celulosa por 21 días a 24°C; se obtuvo una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 y 33.02 mm/día para un periodo de cero a tres y de tres a veintiún días, respectivamente, describiendo así un organismo celulolítico de alta o rápida capacidad según la bibliografía, lo anterior tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días. Los resultados obtenidos en la caracterización de su morfología permitieron proponer la identificación del hongo como *Verticillium dahliae*, especie que infecta diversas especies de arces y demás huéspedes forestales.

Palabras clave: identificación, celulosa, aserrín, plaga, *Verticillium*.

¹ Proyecto de investigación.

Abstract:

The enzymatic activity of xylophagous fungi changes the physicochemical properties of wood, thus damaging and fracturing its structure. However, due to their non-specificity, they present a great variety of biotechnological applications in the industry. The characterization of an unreported fungus, considered a pest in the Sierra de Santa Rosa, Guanajuato, was carried out; During a year at the UPIIG facilities, an analysis of its morphology was carried out to propose an identification at the species level, as well as its capacity to degrade wood and lignocellulolytic activity. The fungus was cultivated in triplicate in PDA medium for six weeks at 26°C, obtaining slow growth according to the literature. Its ability to degrade wood was evaluated by growing the fungus in PDA medium with 0, 0.8, 2.8 and 4% m/v of pine sawdust under the same conditions, thus decreasing the growth diameter in them as this percentage increased compared to the control without sawdust and identifying significant differences between the growths in media with and without this compound by means of an ANOVA and Tukey analysis. Similarly, its ligninolytic activity was evaluated, with negative results in terms of its degradation. The cellulolytic activity was evaluated by growing it in solid cellulose medium for 21 days at 24°C; a speed of appearance of the cellulose degradation halo of 5.33 and 33.02 mm/day was obtained for a period of zero to three and three to twenty-one days, respectively, thus describing it as a cellulolytic organism of high or rapid capacity according to the bibliography, the above after a latency period of approximately three days. The results obtained in the characterization of its morphology allowed to propose the identification of the fungus as *Verticillium dahliae*, a species that infects various species of maples and other forest hosts.

Keywords: identification, cellulose, sawdust, plague, *Verticillium*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos xilófagos son aquellos que se alimentan de los componentes que contiene la madera, provocando en ella severos daños (Sanite, 2022). La pudrición que este tipo de organismos causa en la madera de los árboles es una de las enfermedades más comunes que pueden sufrir, debilitándola hasta llegar a fracturarlos; este fenómeno puede afectar diferentes partes de los árboles, desde las ramas, hasta las raíces Passer (2022).

Dichos componentes, refiriéndose a la pared celular de la madera, son principalmente hemicelulosa, celulosa y lignina; el rango común es de 38 a 50% de celulosa, de 23 a 32% de hemicelulosa y de lignina de un 15 a un 25% (Chávez & Domine, 2013).



De acuerdo a lo anterior, la molécula orgánica de la celulosa es la que más abunda y se encuentra disponible en la naturaleza para así ser sintetizada y degradada por una gran variedad de microorganismos. Los que son capaces de lograrlo son particularmente los hongos y las bacterias. Estos son reconocidos ya que permiten reciclar el material orgánico de nuevo al suelo (Guzmán *et al.*, 2014). Según Giraldo & Villa (2016), específicamente, los hongos xilófagos de tipo podredumbre parda son aquellos que solamente degradan la celulosa y hemicelulosa, dejando lignina como residuo.

Por otro lado, un reducido grupo de hongos filamentosos cuenta con la capacidad de descomponer la lignina, siendo este el componente de las paredes celulares de las plantas más recalcitrante. Estos, en comparación a los de podredumbre parda, son los de podredumbre o pudrición blanca, y poseen un valioso papel en el ciclo del carbono (Muñoz, 2012).

Para lograr identificar y caracterizar este tipo de microorganismos, se realizan pruebas de naturaleza microbiológica; el análisis microbiológico es el uso de métodos biológicos, bioquímicos, moleculares o químicos para la detección, identificación o enumeración de microorganismos en un material. A menudo se aplica a los microorganismos responsables de enfermedades y del deterioro de alimentos o compuestos, ya que ayuda a mantener bajo control la proliferación de virus, bacterias y microorganismos que pueden causar contaminación, intoxicación y enfermedades (Elga Veolia, 2021). En el caso de los hongos, además nos permite indagar en sus aplicaciones potenciales en la industria. Los principales métodos de identificación de hongos filamentosos se han basado en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas (Solé *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó la caracterización microbiológica y evaluación de la actividad lignocelulolítica de un hongo considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, México, ya que causa una degradación en la corteza de los árboles que se encuentran en la sierra, se suma, que no existe un reporte o estudio realizado sobre esta situación.



La caracterización de su morfología y evaluación de su posible actividad lignocelulolítica guiada a la propuesta de una identificación a nivel de especie permitiría su uso en futuros estudios de biorremediación y degradación de polímeros como la celulosa, así como podría contribuir al control de la considerada plaga en la sierra. Para cumplir estos objetivos, se contó con todos los equipos, reactivos y materiales necesarios para la realización del presente proyecto, además de la asesoría y condiciones adecuadas, esto en las instalaciones de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Campus Guanajuato (IPN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de la muestra

Se proporcionó un pedazo de tronco con muestra previamente tomado de un árbol infectado, colocado dentro de una bolsa de plástico y ésta siendo posteriormente sellada (figura 1). Dicha muestra fue aislada de la sierra de Santa Rosa, Guanajuato.



Figura 1. Muestra de tronco infectado con hongo xilófago filamentoso aislado de la Sierra de Santa Rosa, Guanajuato.

Figure 1. Sample of trunk infected with filamentous xylophagous fungus isolated from the Sierra de Santa Rosa, Guanajuato.

Se aislaron las células de dicho hongo a través de la toma de muestra en zonas infectadas del mismo (Figura 1) y posterior crecimiento en medio de cultivo PDA a 27°C por un periodo de tres semanas por triplicado.

Caracterización macroscópica

Se elaboraron por triplicado cultivos del hongo en medio PDA en cajas Petri (Pucci & Baztan, 2017). Asimismo, se realizó una segunda prueba elaborando por triplicado medios PDA con 0, 0.8, 2.8 y 4% m/v de aserrín proveniente de pino cada uno. Los medios de ambas pruebas fueron incubados a 26°C por un periodo de seis semanas; se registró la morfología, así como se midieron los diámetros de crecimiento para cada medio con el fin de realizar las cinéticas de crecimiento para cada tipo de prueba, de manera diaria para la primera y de manera semanal para la segunda.

Caracterización microscópica

La identificación de los hongos requiere de la obtención de datos morfológicos mediante la observación microscópica de los aislamientos, mucho más minuciosa en el caso de los hongos filamentosos (Gadea *et al.*, 2007).

Técnica de microcultivo. Se basó en la metodología enunciada por García (2004); se elaboró por triplicado dicho protocolo. Se añadió agua con 30% de glicerol estéril al papel filtro en el fondo para producir una cámara de humedad y se incubaron los microcultivos a 26°C durante tres semanas. Finalmente, se observaron al microscopio óptico bajo objetivo 40X las muestras obtenidas con azul de lactofenol y se registraron las estructuras del hongo para su identificación.

Evaluación de la actividad ligninolítica

Esta prueba se realizó de acuerdo al estudio realizado por Muñoz (2012) en medio agar lignina en cajas Petri, junto a un control sin lignina y otro sin muestra (con lignina), todos por triplicado, incubándose durante tres semanas a 24°C. La actividad ligninolítica positiva se observaría en los medios por el vire a una coloración rojiza por la oxidación del guayacol. A lo largo del periodo de la prueba, se mediría diariamente el diámetro del halo de oxidación en milímetros y el de crecimiento generado en la misma unidad, para así obtener la velocidad de degradación de lignina por el hongo en milímetros por día además de dos cinéticas, una para cada uno de los controles.



Evaluación de la actividad celulolítica

La evaluación de la actividad celulolítica se realizó en medio sólido de celulosa (Galván, 2018). Se incubó el hongo durante tres semanas a 24°C en medio de celulosa y en un control de medio celulosa sin celulosa, además de otro control sin muestra en medio de celulosa, todos por triplicado. Durante este tiempo, se evaluaron diariamente los respectivos diámetros de crecimiento y de halo de degradación generado en milímetros, con el fin de elaborar sus respectivas cinéticas; dicha medición diaria de halos de degradación se realizó a través de su observación a simple vista en condiciones de contraluz, esto gracias a la posible apreciación del consumo de celulosa por el hongo de esta manera, ya que dicho compuesto fue posible diferenciarlo del resto en el medio de cultivo, pues éste no se homogenizó con el resto de componentes (la celulosa se observó como pequeñas acumulaciones blancas de dicho compuesto en forma circular), sin embargo, estas mediciones representaron una mera aproximación. Se reveló el medio con solución rojo congo al 0.1% (m/v) una vez pasadas las tres semanas, y se dejó actuar el colorante durante 15 minutos. Después, se lavó con una solución de cloruro de sodio 1 M. Se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestadas por la hidrólisis de la celulosa, las cuales fueron de igual manera medidas en milímetros.

Análisis estadístico

Todos los análisis de datos se trataron de acuerdo a las medias y desviaciones estándar de cada prueba utilizando el software estadístico SAS, para finalmente ser representados gráficamente mediante el programa Origin 2023. Además, para el caso de la prueba de degradación de aserrín, las mediciones de los diámetros de crecimiento obtenidos en dicha prueba también fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de factor único en SAS, así como se evaluaron las diferencias significativas entre las medias de los aislados en cada porcentaje de aserrín por semana mediante comparaciones múltiples de medias usando la prueba de Tukey, $P < 0.05$ (Galván, 2018).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microbiológica

Se obtuvo una curva representativa al ser promediadas las tres réplicas evaluadas en medio PDA sin modificaciones, observando un crecimiento total al cabo de dichas seis semanas (Figura 2). Pucci & Baztan (2017) mencionan que de acuerdo a la velocidad de crecimiento del hongo en caja Petri estos se pueden clasificar como de crecimiento rápido (entre una y dos semanas), moderado (entre dos y tres semanas) y lento (entre tres y cuatro semanas) al abarcar tres cuartas partes del espacio de la misma, por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento del hongo en medio PDA donde se abarcó un crecimiento en la caja de tres cuartos del espacio (aproximadamente 60 mm de diámetro) en un periodo de entre tres a cuatro semanas (Figura 2), este hongo se puede clasificar como uno de crecimiento lento.

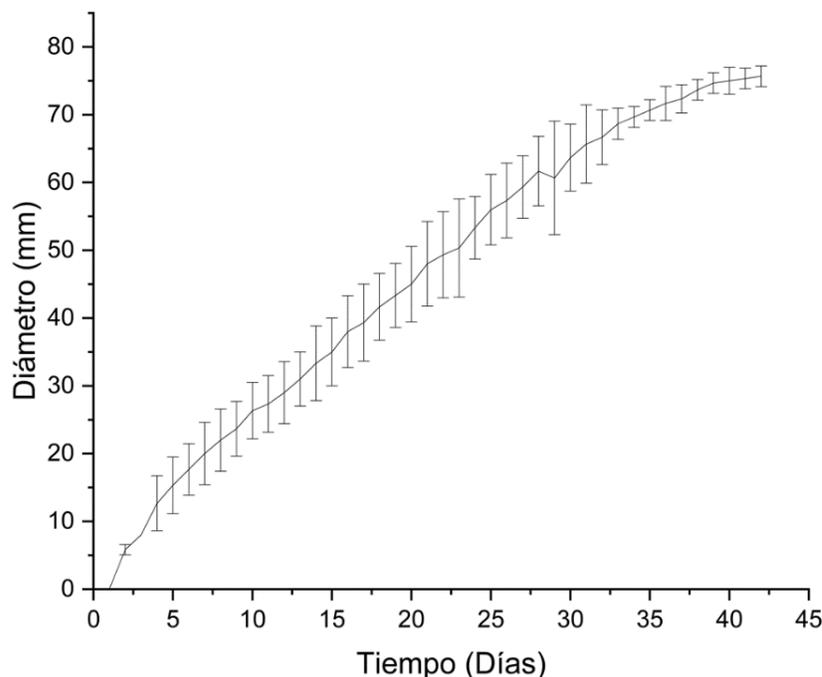


Figura 2. Cinética de medias con desviación estándar del crecimiento del hongo por triplicado en medio PDA a 26°C durante seis semanas.

Figure 2. Kinetics of means with standard deviation of the growth of the fungus in triplicate in PDA medium at 26°C for six weeks.

En dicha prueba, las colonias presentaron una forma filamentosa, elevación plana, borde filamentoso y superficie lisa; se observó una textura de micelio algodonosa con esporas de color negro, con micelio vegetativo y reproductivo, siendo el primero de un color blancuzco crema oscureciéndose a café gradualmente en el centro debido a pigmentación, así como un crecimiento invasivo (Figura 3).

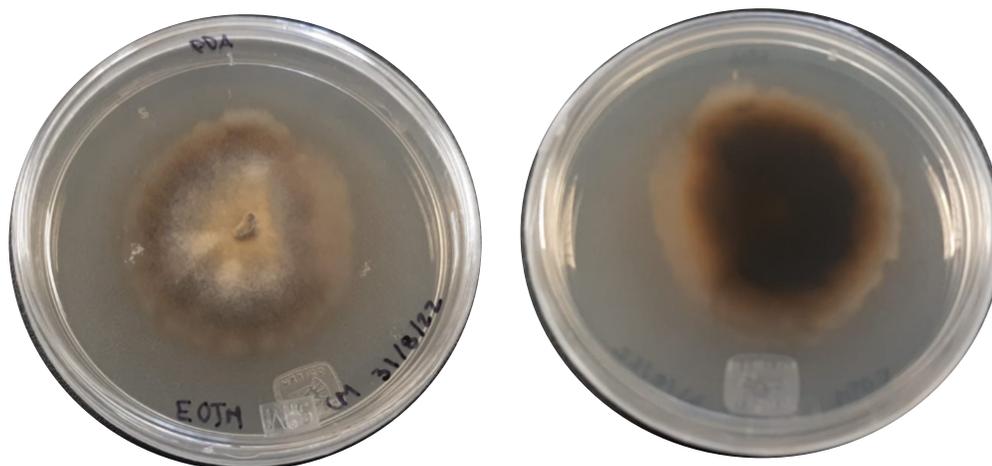


Figura 3. Crecimiento del hongo en medio PDA después de tres semanas de incubación a 26°C (anverso, izquierda; reverso, derecha).

Figure 3. Growth of the fungus in PDA medium after three weeks of incubation at 26°C (front, left; back, right).

Por otro lado, de acuerdo a la prueba de microscopía (Figura 4), se identificaron hifas de modalidad rizoide, hialinas y septadas, con microconidias de conidióforos verticilados, además de largas fiálides. Asimismo, se apreciaron abundantes microesclerocios y conidios de tipo fialospora, esféricos u ovoides, hialinos y unicelulares; así como reproducción asexual por fragmentación.



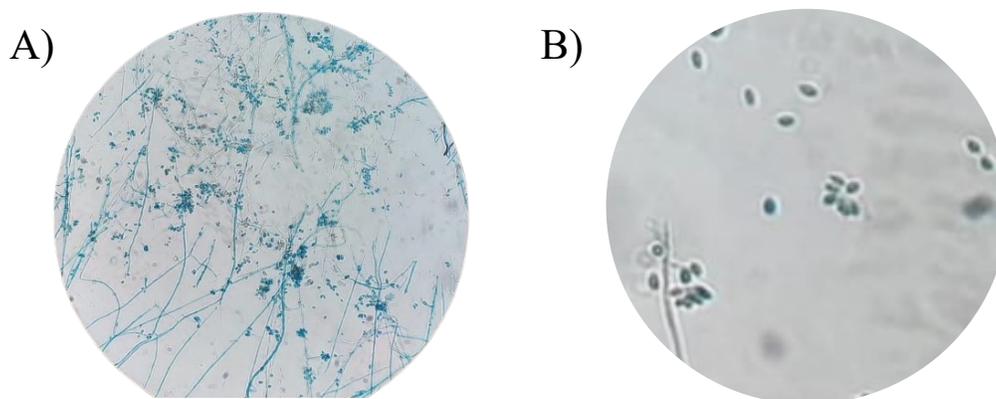


Figura 4. Observación del hongo a través de la técnica de microcultivo tras tres semanas de incubación a 26°C en medio PDA al microscopio óptico bajo objetivo 40X. A) Visualización de hifas; B) Visualización de conidios.

Figure 4. Observation of the fungus through the microculture technique after three weeks of incubation at 26°C in PDA medium under an optical microscope under a 40X objective. A) Visualization of hyphae; B) Visualization of conidia.

Las características morfológicas fueron comparadas de forma macroscópicas observadas a 26°C en medio PDA tras tres semanas de incubación del hongo estudiado y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium* (Cuadro 1), así como las características morfológicas a objetivo 40X del hongo, tras incubación de tres semanas a 26°C en microcultivo y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium* (Cuadro 2). Cabe mencionar que se menciona a este género como uno de organismos fitopatógenos no e específicos (Koppert, 2022), lo cual concuerda con la degradación de corteza y ahuecamiento que genera el hongo estudiado en los árboles. Además, Xiaorong (2018) reporta el crecimiento de una especie de este género (*Verticillium longisporum*) en medio PDA durante 24 días en oscuridad a aproximadamente 20°C, obteniendo un diámetro de 42 mm tras 14 días de incubación, mientras que la muestra analizada en este trabajo adquirió uno en promedio de 34 mm en este mismo tiempo (figura 2). Como se observa, ambos crecimientos son parecidos. Debido a lo anterior y a lo mostrado en los cuadros 1 y 2, el género de *Verticillium* concuerda con las características tanto morfológicas como las concernientes al ritmo de crecimiento identificadas en el organismo analizado, por lo que se propone el mismo para su identificación.

Cuadro 1. Comparativa de las características morfológicas macroscópicas del hongo estudiado y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium*.

Table 1. Comparison of the macroscopic morphological characteristics of the fungus studied and those reported in the literature for the genus *Verticillium*.

Hongo de análisis (Figura 3)	<i>Verticillium longisporum</i> (Xiaorong, 2018)	<i>Verticillium dahliae</i> (Yu, Cafarov & Badadoost, 2016)
Forma filamentosa. Elevación plana, borde filamentoso, superficie lisa. Micelio algodonoso. Colonia blancuzca crema oscureciéndose a café gradualmente en el centro.	Morfología macroscópica plana. Borde filamentoso. Pigmentación al centro color café. Micelio algodonoso.	Colonia blanca al crecer en medio PDA inicialmente. Micelio algodonoso. Gradualmente se torna oscuro en el centro. Conidios esféricos

Nota. Las características reportadas por Xiaorong (2018) fueron resultado del estudio del microorganismo mencionado en cultivo en medio PDA durante 24 días en oscuridad a 20°C.

Cuadro 2. Comparativa de las características morfológicas a objetivo 40X del hongo de estudio y las reportadas por la bibliografía para el género *Verticillium*.

Table 2. Comparison of the morphological characteristics at 40X objective of the fungus under study and those reported in the literature for the genus *Verticillium*.

Hongo de análisis (figura 4)	<i>Verticillium sp.</i> (Larone, 1995)	<i>Verticillium</i> (Sociedad Microbiológica Española, 2021)
Hifas rizoides, hialinas y septadas. Presencia de verticilos. Largas fiálides. Conidios esféricos u ovoides, hialinos y unicelulares. Presencia de microesclerocios.	Conidióforos hialinos, simples o ramificados. Verticilos de esbeltas fiálidas divergentes en forma de punzón. Hifas hialinas y septadas. Conidios hialinos o de colores brillantes, en su mayoría unicelulares.	Fiálides largas. Conidióforos ramificados en verticilos. Conidias hialinas y de forma generalmente ovalada.



Sin embargo, para lograr una propuesta más completa, se tomó como referencia el estudio realizado por Yu, Cafarov & Badadoost (2016), quienes mencionan que para diferenciar entre las dos especies mencionadas previamente para el género propuesto (*V. dahliae* y *V. longisporum*), las cuales han sido las más coincidentes en cuanto a morfología descrita por la bibliografía, es importante la forma de los conidios, ya que *V. dahliae* produce unos relativamente esféricos, mientras que *V. longisporum* produce unos elongados. Además, los mismos autores caracterizan a *V. dahliae* como un organismo de colonia blanca y micelio algodonoso abundante al crecer en medio PDA inicialmente, para gradualmente volverse de un tono oscuro, produciendo abundantes conidias hialinas y de forma generalmente ovalada. Debido a lo anterior, se propone la identificación del hongo analizado como *V. dahliae*, presentando este las características atribuidas a dicha especie, diferenciándose de *V. longisporum* al observarse la mencionada diferencia morfológica en los conidios.

Para la evaluación de degradación de aserrín, se observó en los diferentes medios el micelio vegetativo de color más oscuro justo por debajo del micelio reproductivo (figura 5), esto de manera similar a lo observado en la caracterización macroscópica sin aserrín (Figura 3). Al finalizar la prueba, se observó que el diámetro de crecimiento en los medios tendía a disminuir a medida que aumentaba el porcentaje de aserrín en los mismos. Dicho crecimiento se ve ilustrado en la figura 5.



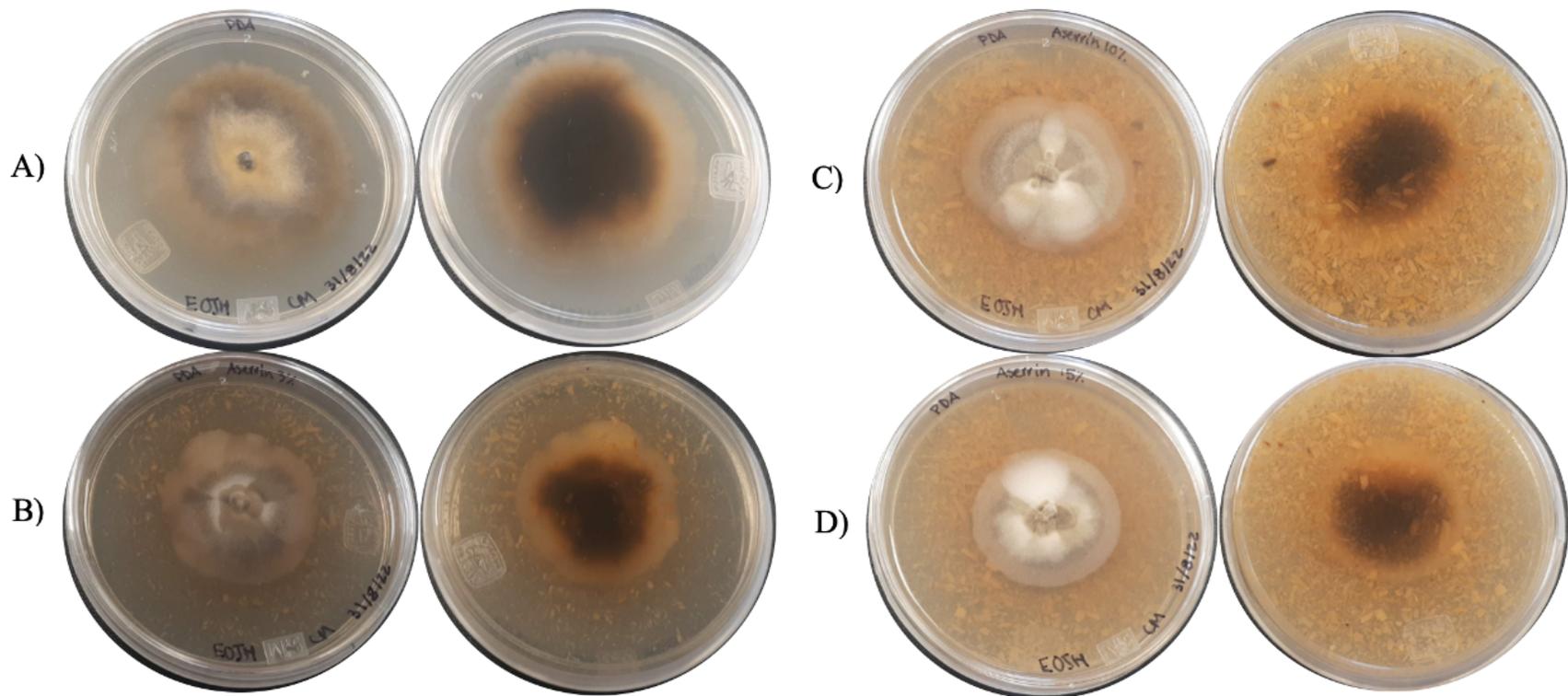


Figura 5. Crecimiento del hongo en medios PDA con diferentes porcentajes m/v de aserrín de pino tras cuatro semanas de incubación a 26°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio PDA sin aserrín; B) Medio PDA+Aserrín 0.8%; C) Medio PDA+Aserrín 2.8%; D) Medio PDA+Aserrín 4%.

Figure 5. Growth of the fungus in PDA media with different m/v percentages of pine sawdust after four weeks of incubation at 26°C (front, left; back, right). A) PDA medium control without sawdust; B) Medium PDA+Sawdust 0.8%; C) Medium PDA+Sawdust 2.8%; D) Medium PDA+Sawdust 4%.

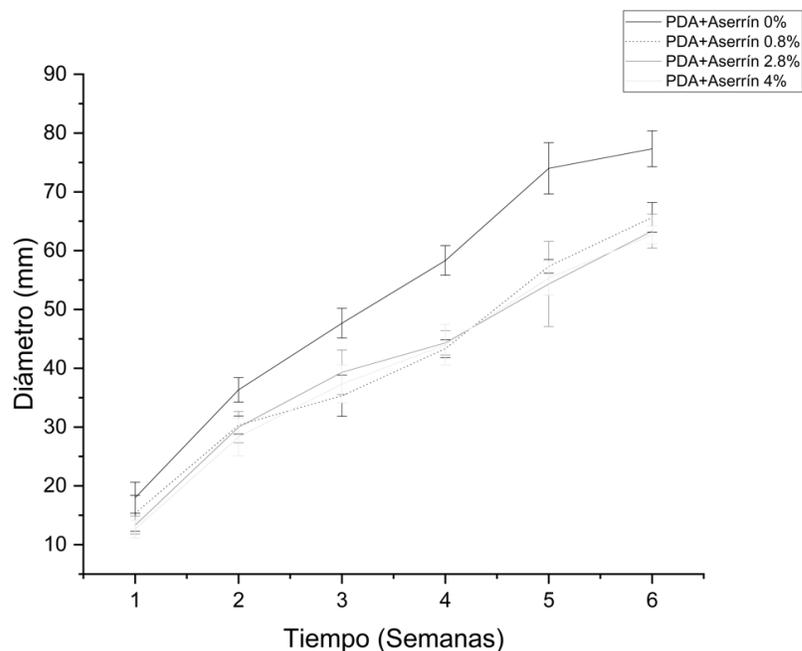


Figura 6. Cinéticas de las medias con desviación estándar del crecimiento del hongo en medios PDA con diferentes porcentajes m/v.

Figure 6. Kinetics of the means with standard deviation of the growth of the fungus in PDA media with different percentages m/v.

En cuanto al análisis ANOVA, se obtuvo un valor P para cada semana (cuadro 3, columna 6), además de la identificación de las diferencias significativas entre las medias por porcentaje de aserrín de manera semanal (Cuadro 3, columnas 2-5).

De acuerdo a los resultados, en cuanto al valor P semanal, se tienen diferencias significativas entre las semanas a excepción de la primera al haber obtenido valores inferiores a 0.05, por lo que para los últimos tres casos se rechaza la hipótesis nula de que las medias poblacionales son iguales. Sin embargo, según los resultados obtenidos en la prueba de Tukey, se observan diferencias estadísticamente significativas únicamente en el caso del control dentro de cada semana (cuadro 3, columna 2) al ser comparadas las respectivas medias de este tipo con las medias obtenidas en los casos de medios PDA con aserrín (Cuadro 3, columnas 3-5). Cabe mencionar que dichas diferencias se identificaron de manera gradual a medida que se

avanzaba en el número de semanas, ya que en la primera no se determinaron diferencias significativas de esta clase.

Por lo tanto, se observó la capacidad de degradación de madera del hongo al identificarse una disminución estadísticamente significativa en los diámetros de crecimiento con porcentajes (m/v) de aserrín respecto a los obtenidos sin este compuesto con el pasar de las semanas (Cuadro 3), demostrando un retardo en el crecimiento del hongo analizado posiblemente debido a dicho proceso de degradación.

Cuadro 3. Resultados obtenidos tras el análisis ANOVA usando la prueba de Tukey ($P < 0.05$) para los diámetros obtenidos de crecimiento en milímetros en la prueba de degradación de aserrín.

Table 3. Results obtained after the ANOVA analysis using the Tukey test ($P < 0.05$) for the diameters obtained from growth in millimeters in the sawdust degradation test.

Semana	Control medio PDA	Medio PDA+Aserrín 0.8%	Medio PDA+Aserrín 2.8%	Medio PDA+Aserrín 4%	Valor P semanal
1	18 abcd	15.33 abcd	13.33 abcd	12.67 abcd	0.0795
2	36.33 abc	30.33 abcd	30 abcd	28.33 bcd	0.0181
3	47.67 ac	35.33 cdb	39.33 acdb	37.33 cdb	0.0082
4	58.33 a	43.33 cdb	44.33 cdb	44 cdb	0.0002
5	74 a	57.33 bdc	54.33 bdc	55.33 bdc	0.0021
6	77.33 a	65.67 bcd	63.33 bcd	62.67 bcd	0.0004

Nota. Los datos corresponden a la media de tres réplicas realizadas en cada caso. Para la prueba de Tukey, las letras representan la diferencia significativa existente entre dicho número de repeticiones, en donde las medias en la misma fila (ya que se realizó el análisis de manera semanal) y con la misma letra no se determinaron como estadísticamente diferentes. La última columna corresponde al valor P obtenido tras la realización del análisis ANOVA, esto realizado de igual forma semanalmente.



Evaluación de la actividad ligninolítica

Se pretendió medir el diámetro de crecimiento y halo de degradación de lignina de manera diaria para así calcular sus respectivas velocidades, sin embargo, dicho crecimiento y halo no fue observado a lo largo y una vez concluido el periodo de análisis en ningún tipo de medio (Figura 7), por lo que se concluye que este hongo no es productor de enzimas ligninolíticas.

De acuerdo con Muñoz (2012), la actividad ligninolítica debería ser evidenciada por un proceso oxidativo debido al guayacol en el agar lignina; Laura & Castellanos (2009) mencionan que el compuesto de lignina presenta un color café por los grupos cromóforos unidos a esta molécula, y, para que se reduzca este color el oxígeno y peróxido de hidrógeno actúan como cofactores, ocasionando así una ruptura en los enlaces carbono-carbono destruyendo algunos de estos grupos, por lo que el añadido del factor de aeración a la prueba podría llegar a complementar dicha catálisis.

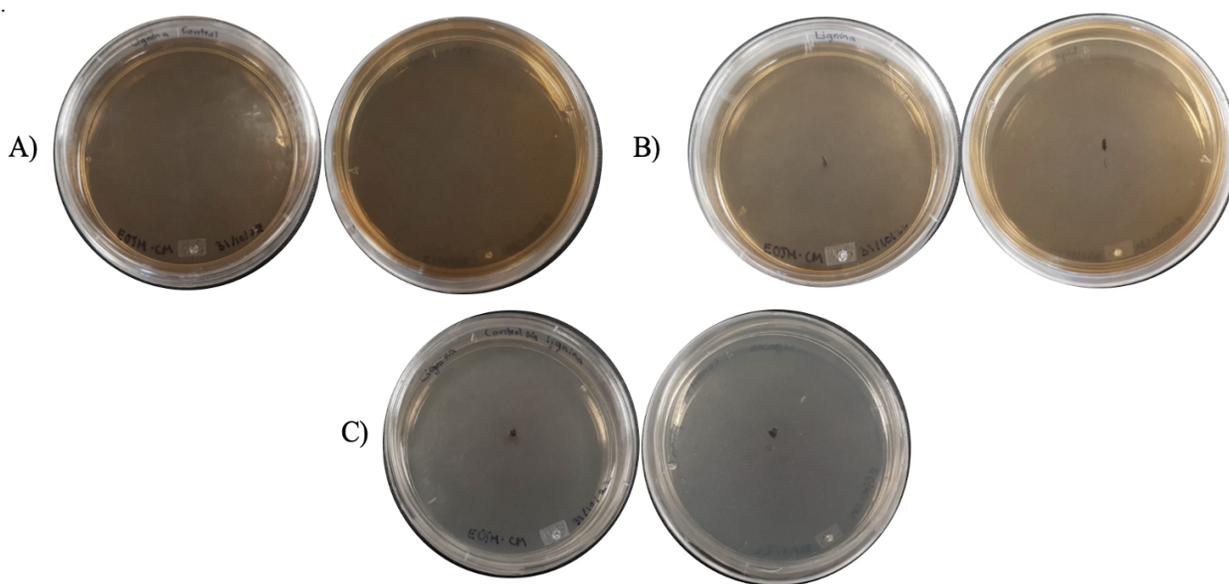


Figura 7. Cultivos de lignina en medio sólido del hongo tras tres semanas de incubación a 24°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio sólido de lignina sin muestra; B) Medio sólido de lignina con muestra; C) Control medio sólido de lignina sin lignina y con muestra.

Figure 7. Lignin cultures in solid medium of the fungus after three weeks of incubation at 24°C (front, left; back, right). A) Lignin solid medium control without sample; B) Solid lignin medium with sample; C) Medium solid lignin control without lignin and with sample.

Evaluación de la actividad celulolítica

Se evaluó la velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa y el crecimiento del hongo cada 24 horas, midiendo los diámetros generados en milímetros, para finalmente ser revelados los halos de los medios con rojo congo 0.1% (m/v). En la figura 8 se presentan los resultados de dicha revelación, donde se ve confirmada esta degradación de acuerdo a la comparación del anverso y reverso de los medios evaluados respecto a los controles realizados. En dicha figura, se observa un fondo rojo en la caja Petri debido a la adición de solución de rojo congo al 0.1% (m/v), con zonas claras alrededor del crecimiento de la muestra, siendo esto los ya mencionados halos de degradación de celulosa.

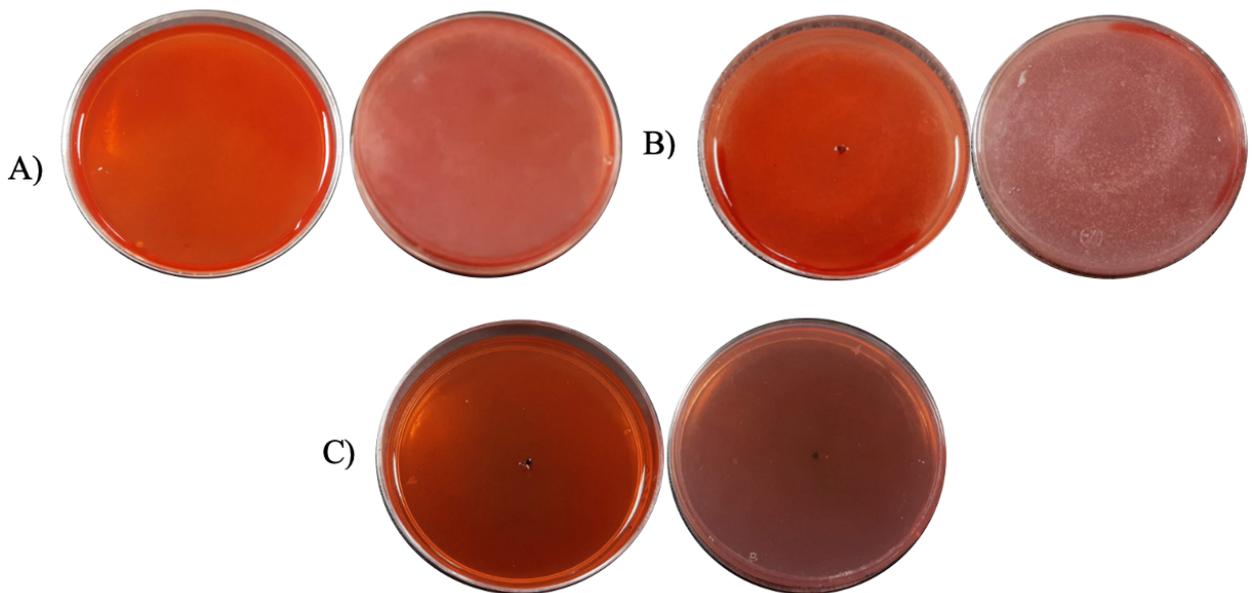


Figura 8. Cultivos en medio sólido de celulosa revelados con rojo congo 0.1% (m/v) tras incubación de tres semanas a 24°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio celulosa sin muestra; B) Medio celulosa con muestra; C) Control medio celulosa sin celulosa.

Figure 8. Cultures in solid cellulose medium developed with Congo red 0.1% (m/v) after three weeks incubation at 24°C (front, left; back, right). A) Cellulose medium control without sample; B) Cellulose medium with sample; C) Control medium cellulose without cellulose.

Se elaboró la cinética de crecimiento del hongo en en medio de celulosa por tres semanas de incubación a 24°C junto con las respectivas velocidades de degradación de celulosa por periodo definido, además de la cinética de crecimiento del control sin celulosa bajo las mismas condiciones (Figura 9), observando un crecimiento ligeramente mayor que al representado en el cultivo en medio PDA para el periodo comprendido hasta 21 días.

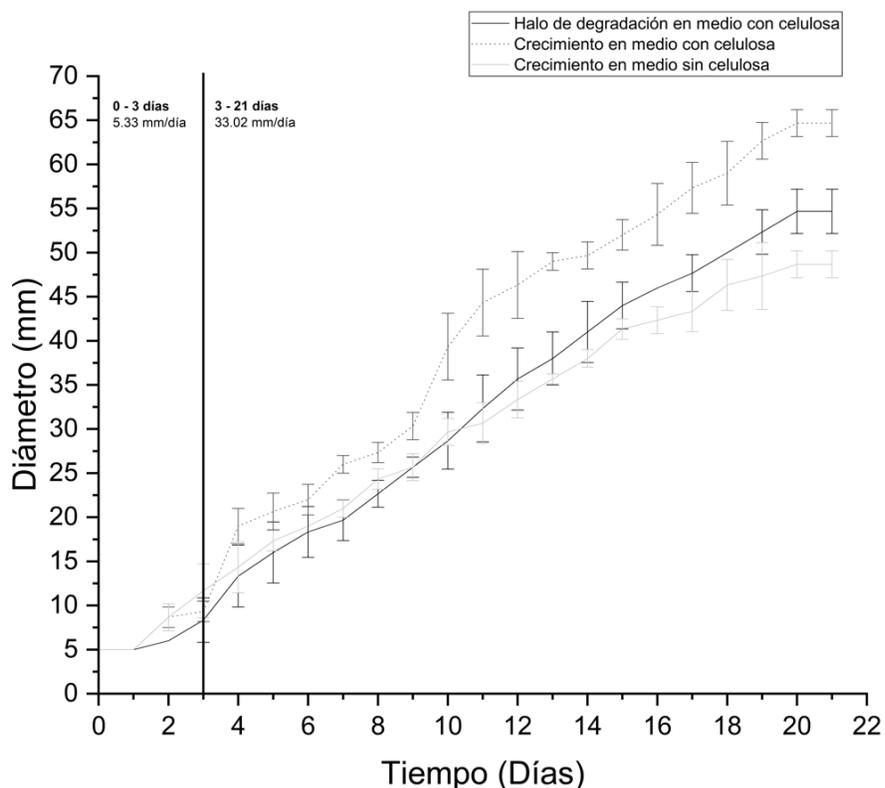


Figura 9. Cinéticas de la actividad celulolítica y de crecimiento del hongo en medio de celulosa por tres semanas de incubación a 24°C.

Figure 9. Kinetics of the cellulolytic activity and growth of the fungus evaluated in cellulose medium for three weeks of incubation at 24°C

Respecto a lo mostrado en la cinética de crecimiento para el control del cultivo del hongo en medio sólido de celulosa sin celulosa (medio en el cual no hubo aparición de halo de degradación de este compuesto) se tiene un crecimiento menor al del caso con celulosa, y, sin embargo, presente (Figura 9).

La posible presencia de una fuente alternativa de carbono presente en el componente de agar del medio de cultivo, específicamente Agar bacteriológico BIOXON 215000, pues BD BIOXON™ (2011) reporta que este es un agente solidificante, un agar purificado en el cual se han reducido mínimamente los cuerpos extraños, sales y también las porciones pigmentadas, no obstante, no se hace mención de una composición exenta de dicho elemento. Sin embargo, se observa un crecimiento mayor en el medio con celulosa que el control sin ella (Figura 9), por lo que se le adjudica este comportamiento a la degradación de este compuesto, supuesto que ya se ha visto comprobado mediante la aparición del halo correspondiente.

Igualmente, se evaluó la velocidad de degradación de celulosa a lo largo del periodo de evaluación (Figura 9); se dividió en dos partes esta cinética de acuerdo a la visible diferencia en el comportamiento presentado, la primera abarcando desde el momento de la inoculación hasta el tercer día de incubación, y la segunda parte desde el tercer día post inoculación hasta el vigésimo primero. Así, se obtuvieron dos medias de velocidades de degradación al ser promediadas las comprendidas por periodo de tiempo, una correspondiente a cada parte: de 5.33 y 33.02 mm/día respectivamente, apreciando así una mayor velocidad para el segundo periodo determinado.

De acuerdo con Galván (2018), quien evaluó de manera similar la degradación de celulosa en diferentes hongos xilófagos, obtuvo las máximas velocidades de 18.816 mm/día (correspondiente a *Aspergillus fumigatus*) y 9.432 mm/día (para *Aspergillus flavus*) para cada periodo de tiempo evaluado, en dicho estudio siendo estos de cero a cuatro y de cuatro a seis días, bajo las mismas condiciones de incubación. Al comparar estas velocidades con las obtenidas, se observa una notable diferencia, ya que, para el primer periodo de tiempo, se obtuvo una velocidad más baja, y, en contraste, para el segundo, se obtuvo una mayor, sin embargo, para este último caso se tiene un periodo de tiempo más largo. De esta manera, en comparación, la capacidad de degradación del hongo estudiado podría entenderse como alta o rápida tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

Habiendo comprobado su capacidad de degradación de celulosa como se mencionó, se tienen aplicaciones en distintas áreas de la industria, entre ellas, la industria extractiva (extracción de aceites esenciales, pigmentos, saborizantes y aromas, así como la producción de jugos), actividad que se ha visto limitada debido a la naturaleza

química compleja de los comúnmente utilizados vegetales (Chacón & Waliszewski, 2005). Por lo que se tiene el potencial de este hongo al respecto en cuanto a su naturaleza de hongo filamentoso, ya que estos microorganismos sobresalen al caracterizarse por formar hifas capaces de colonizar matrices sólidas (tecnología más sencilla y con menor costo para su producción) y así ser más eficaces y competitivos debido a su tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Escudero et al., 2013).

CONCLUSIÓN

Se realizó la caracterización de un hongo no reportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, Guanajuato, esto a través de la realización de pruebas microbiológicas con el fin de observar su morfología, identificando características del género *Verticillium dahliae* y determinando un crecimiento lento del mismo al cultivarlo en medio PDA de acuerdo a la bibliografía. Asimismo, se realizó la evaluación de su actividad enzimática en cuanto a su capacidad para degradar madera y actividad lignocelulolítica. Para el primer caso, al evaluar su crecimiento en medios PDA con porcentajes ascendentes de aserrín (0.8, 2.8 y 4% m/v), se obtuvo una disminución del diámetro en los mismos a medida que aumentaba este porcentaje respecto al control sin aserrín. Para el segundo caso, la prueba de degradación de lignina mostró una carente capacidad para degradar dicho compuesto. Y para el tercer caso, se obtuvo una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 mm/día y 33.02 mm/día para un periodo de cero a tres y de cuatro a veintiún días, respectivamente, características que describen a este hongo como uno celulolítico con una capacidad alta o rápida según la bibliografía, esto tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, campus Guanajuato, Instituto Politécnico Nacional. Así como por la Dra. Karla Lizbeth Macías Sánchez, la Dra. Mariana Macías Alonso, la Ing. Ariadna Denisse Andrade Alvarado y la Ing. Claudia Paola Lozano Escalante.

LITERATURA CITADA

- BD BIOXON™ (2011). Catálogo de medios de cultivo deshidratados. Becton Dickinson and Company.
- Cañedo, V. & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa.
- Chacón, O. & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*, 21(42), 111-120.
- Chávez, M. & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46
- Elga Veolia (2021). Análisis microbiológico. Recuperado de: <https://es.elgalabwater.com/microbiological-analysis>
- Escudero, J., Daza, Z., Gil, N. & Mora, O. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108-117.
- Estrada, G. & Ramírez, M. (2019). Micología general. Universidad Católica de Manizales. Recuperado de: https://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/2021/03/Micologia_general.pdf
- Gadea, I., Cuencua, M., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J. & Rodríguez, J. (2007). Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(5), 336-340.
- Galván, B. (2018). *Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de Pinus hartwegii*. (Grade dissertation, Universidad Autónoma del Estado de México).
- García, M. (2004). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamientos de agua residual*. (Grade dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Giraldo, S. & Villa, A. (2016). Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera.
- Guzmán, M., Zambrano, A., Efrén, D., Rondón, A., Silva, L., Pérez, M., Quintana, M., Aguilar, L. & Rivera R. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(2), 177-189.

- Koppert (2022). Verticilosis. Recuperado de: <https://www.koppert.mx/retos/control-de-enfermedades/verticilosis/>
- Laura, J. & Castellanos, P. (2009). Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Rev. peru. biol.*, 16(1), 125- 128.
- Larone, D. (1995). *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*. 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Muñoz, L. (2012). *Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz*. (Grade dissertation, Pontificia Universidad Javeriana).
- Pucci, G. & Baztan, M. (2017). *Micología Ambiental*. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>
- Sanite (2022). Guía de hongos xilófagos. Sitio Web: <https://diagnosisdelamadera.com/diagnosis-de-la-madera-guia-de-hongos-xilofagos/>
- Sociedad Microbiológica Española (2021). Clave dicotómica para la identificación de hongos aislados sistemáticamente en ambientes mediterráneos: Especial hongos filamentosos y levaduras. Recuperado de: https://www.semicrobiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/30_Clave.pdf
- Solé, M., Espadale, R. & Aubert, A. (1998). *NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos*. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
- Universidad Católica de Manizales. Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera. Recuperado de: <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/1320/1/Sara%20Jein%20Giraldo%20Naranjo.pdf>
- Universitat de Valencia (2019). Estudio morfológico y fisiológico (hongos filamentosos). Universitat de Valencia. Recuperado de: <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/caracterizacion-eucariotas/estudio-morfologico-fisiologico-hongos-filamentosos-1285978915995.html>
- Xiaorong, Z. (2018). *Verticillium longisporum* on Oilseed Rape (*Brassica napus* L.): Differential Roles of Salicylic Acid, Seed Transmission and Plant Colonization in Greenhouse and Field Conditions. (Grade dissertation, Universidad Göttingen).
- Yu, J., Cafarov, I. & Badadoost, M. (2016). Morphology, Molecular Identity, and Pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. Associated with Internally Discolored Horseradish Roots. *Plant Dis.* 100, 749-757.