



# **Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Ciencias

**PROFESOR PATROCINANTE: DR.  
EDUARDO VALENZUELA  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA  
DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS CARBONADOS Y NITROGENADOS EN  
CEPAS DE APHYLLOPHORALES**

**Tesis de Grado presentada como  
Parte de los requisitos para optar al  
Grado de Licenciado en ciencias  
Biológicas**

**NATALIA DEL PILAR PAREDES LEAL**

**VALDIVIA – CHILE**

**2006**

*Dedico esta tesis a mis padres Hada y Juan por el esfuerzo enorme que han hecho durante todos mis años de estudio. A mis abuelos por su cariño y preocupacion, a mi hermano Rodrigo por estar ahí siempre y a mi amor Carlos por su inmenso amor*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradesco al Doctor Eduardo Valenzuela por permitirme realizar esta tesis bajo su alero y por su entrega desinteresada de conocimientos, su comprensión y sobre todo paciencia.

Agradesco al Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile por permitirme realizar mi trabajo en sus dependencias y a todo el personal que allí trabaja por su disposición para enseñarme y ayudarme, en especial a don Nelson y a Armín Mella.

Agradesco también a la doctora Angara Zambrano y al Doctor Roberto Godoy por evaluar mi trabajo.

Agradesco a la Doctora Gladis Ruiz, directora de la Escuela de Ciencias.

Y quisiera agradecer en forma muy especial a mis compañeros y amigos Sandra, Pancho, Katty, Loreto y Caro, que hicieron que mi trabajo en el laboratorio fuera mas llevadero y alegre y por que siempre tuvieron una palabra de aliento.

A mi amiga Marjorie le agradezco la compañía y el apoyo y a mi pololo Carlos le agradezco su ayuda y compañía en el desarrollo de esta tesis y sobre todo el amor que ha entregado.

Y principalmente agradezco a mi familia por su apoyo, preocupación, confianza, cariño y esfuerzo incondicionales a lo largo de mi vida.

## INDICE

|   | Páginas    |
|---|------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>   | <b>I</b>   |
| <b>INDICE DE CONTENIDOS.....</b>  | <b>II</b>  |
| <b>INDICE DE TABLAS.....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>INDICE DE ANEXOS.....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>INDICE DE FIGURAS.....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>1 RESUMEN.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>SUMMARY.....</b>   | <b>2</b>   |
| <b>2 INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>3</b>   |
| <b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>9</b>   |
| <b>3.1 MATERIALES.....</b>  | <b>9</b>   |
| <b>3.1.1 Biológico.....</b>   | <b>9</b>   |
| <b>3.1.2 Reactivos.....</b>   | <b>9</b>   |
| <b>3.1.3 Equipos.....</b>   | <b>10</b>  |
| <b>3.1.4 Otros.....</b>   | <b>10</b>  |
| <b>3.2 MÉTODOS.....</b>   | <b>10</b>  |
| <b>3.2.1 Recolección de basidiocarpos.....</b>  | <b>10</b>  |
| <b>3.2.2 Obtención de cepas miceliales en cultivo puro a partir de basidiocarpos de<br/>Aphylophorales.....</b> | <b>11</b>  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2.3 | Determinación macro-microscópica de estructuras indicativas en cepas miceliales desarrollados a partir de basidiocarpos de Aphylophorales.....                  | 11 |
| 3.2.4 | Masificación de cepas miceliales.....   | 12 |
| 3.3   | Detección cualitativa directa sobre el micelio de enzimas de interés lignocelulolítico producidas por las cepas miceliales.....                                 | 12 |
| 3.4   | Determinación cualitativa de enzimas de interés lignocelulolítico mediante el cultivo de cepas miceliales en medios de cultivos selectivos o diferenciales..... | 13 |
| 3.4.1 | Enzimas amilolíticas.....   | 14 |
| 3.4.2 | Enzimas celulolíticas.....  | 14 |
| 3.4.3 | Enzima lipasa.....  | 14 |
| 3.4.4 | Enzima oxidasa-extracelular.....  | 15 |
| 3.4.5 | Enzimas proteolíticas.....  | 15 |
| 3.4.6 | Enzima ureasa.....  | 15 |
| 4     | <b>RESULTADOS</b> .....   | 16 |
| 4.1   | Características macro-microscópicas de cepas miceliales desarrolladas a partir de basidiocarpos de Aphylophorales.....  | 16 |
| 4.2   | Determinación enzimática cualitativa.....   | 26 |
| 4.2.1 | Distribución porcentual de cepas de Aphylophorales versus las enzimas determinadas cualitativamente.....  | 26 |
| 4.2.2 | Determinación cualitativa de enzimas de interés lignocelulolítico producidas por las cepas miceliales de Aphylophorales.....                                    | 27 |
| 5     | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | 37 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.1 | Características macro-microscópicas de cepas miceliales desarrolladas a partir de<br>basidiocarpos de Aphylophorales..... | 37 |
| 5.2 | Determinación enzimática cualitativa.....   | 41 |
| 5.3 | Conclusiones.....   | 49 |
| 7   | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 50 |
|     | <b>ANEXOS</b> .....   | 58 |

**INDICE DE TABLAS**

|   | Páginas |
|---|---------|
| <b>Tabla 1</b> Enzimas detectadas en micelios fúngicos cultivados en AEM.....   | 13      |
| <b>Tabla 2</b> Características macroscópicas de las colonias de cepas miceliales de<br>Aphylophorales.....                                | 16      |
| <b>Tabla 3</b> Características microscópicas de cepas de Aphylophorales desarrollados en agar<br>extracto malta al 2%.....                | 19      |
| <b>Tabla 4</b> Cepas de Aphylophorales y sus enzimas determinadas.....  | 28      |
| <b>Tabla 5</b> Otras cepas de Aphylophorales donde se detectó la producción de enzimas de<br>interés lignocelulolítico.....               | 31      |
| <b>Tabla 6</b> Distribución porcentual y numérica de cepas miceliales de Aphylophorales según<br>presencia de las enzimas detectadas..... | 68      |

## INDICE DE ANEXOS

|   | Páginas |
|---|---------|
| <b>Anexo 1</b> .....  | 59      |
| 1.1 Constitución de soluciones para medir enzimas directamente sobre<br>el micelio..... | 59      |
| 1.2 Constitución de medios de cultivo.....  | 60      |
| 1.3 Constitución líquido de montaje.....  | 64      |
| <br><b>Anexo 2</b> .....  | <br>65  |
| 2.1 Masificación de micelio en placas con AEM al 2%.....                                | 65      |
| 2.2 Reacciones enzimáticas.....   | 67      |
| 2.2.1 Detección cualitativa directa sobre el micelio.....                               | 67      |
| 2.2.2 Detección Cualitativa de enzimas en medios selectivos.....                        | 67      |



## INDICE DE FIGURAS

|  | Páginas |
|--|---------|
| <b>Figura 2</b> <i>Bjerkandera adusta</i> (UACH20).....                        | 65      |
| <b>Figura 3</b> <i>Conchomyces bursiformis</i> (UACH64).....                   | 65      |
| <b>Figura 4</b> <i>Fistulina hepatica</i> (UACH45).....                        | 65      |
| <b>Figura 5</b> <i>Ganoderma applanatum</i> (UACH83d).....                     | 65      |
| <b>Figura 6</b> <i>Gloeophyllum trabeum</i> (UACH3).....                       | 66      |
| <b>Figura 7</b> <i>Grifola gargal</i> (UACH8a).....                            | 66      |
| <b>Figura 8</b> <i>Phlebiopsis gigantea</i> (UACH65).....                      | 66      |
| <b>Figura 9</b> <i>Stereumihirsutum</i> (UACH72).....                          | 66      |
| <b>Figura 10</b> <i>Trametes hirsuta</i> (UACH54).....                         | 66      |
| <b>Figura 11</b> <i>Trametes versicolor</i> (UACH4a).....                      | 66      |
| <b>Figura 12</b> Detección de algunas enzimas de interés ignocelulolítico..... | 67      |
| <b>Figura 13</b> Detección actividad enzima oxidasa-extracelular.....          | 67      |
| <b>Figura 14</b> Detección de enzima ureasa en medio de cultivo selectivo..... | 68      |

## 1. RESUMEN

Los hongos del Orden Aphyllophorales pertenecen a la División Basidiomycetes que se caracteriza por presentar fíbulas en todos o algunos de sus septos. Los Aphyllophorales tienen como característica propia la presencia de tres tipos de hifas: generativas, esqueléticas y envolventes. Estos hongos se desarrollan en restos vegetales de árboles, troncos en descomposición y tocones, aunque también los hay terrícolas. Además, son conocidos por su capacidad de degradar material lignocelulolítico y por su posible utilización en procesos industriales.

En este estudio fueron recolectados basidiocarpos de Aphyllophorales en bosques y parques de la Provincia de Valdivia obteniéndose 66 cepas miceliales en cultivo puro, las cuales fueron masificadas en placas que contenían de AEM al 2% e incubadas a  $23\pm 2$  °C por 7 a 10 días. A partir de ellas se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas del micelio.

La determinación de enzimas se realizó directamente sobre el micelio, agregando gotas de distintas soluciones que acusan la presencia de determinadas enzimas y también en medios de cultivo, que contienen el sustrato sobre el cual actúan las correspondientes enzimas.

Los resultados del estudio permiten comprobar que, existen similitudes de ciertos caracteres en cepas miceliales de Aphyllophorales aisladas de diferentes basidiocarpos de una misma especie. Del total de cepas las enzimas que se presentaron en mayor porcentaje fueron celulasa (92,42%) y amilasa (90,91%), también destaca la presencia de lacasa (83,33%), el resto de las enzimas lo hizo en un porcentaje inferior, siendo lipasa (4,55%) la de menor presencia.

## SUMMARY

The fungi of the Aphyllophorales Order belong to the Basidiomycetes Division and the main characteristic of this kind of fungi is that presents clamp connections. The Aphyllophorales have hyphae of tree kinds: generative, skeletal and binding hyphae. These fungi growth on soil and in decaying wood (including standing trees), trunks, shrubs and stumps. Although they are well known by its capacity to degrade lignocellulolitic matherial and use in industrial processes.

In this study basidiocarps were collected from parks and forests of the Province of Valdivia, obtaining 66 mycelial strains in pure culture, which ones were growth on plates of AEM to 2% and incubated at  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  by 7 to 10 days. Macroscopic and microscopic observations of the mycelium were made from this strains.

Determination of lignocellulitic enzymes was made directly on mycelium, by adding drops of different solutions and also in different medium that contains the substrate of the corresponding enzymes.

The results of this study showed similarities of some characters between Aphyllophorales strains isolated from different basidiocarps of a same species. Cellulase (92.42%), amylase (90.91%) and laccasa (83.33%) were the enzymes with the higher percentage of presence; the rest of the enzymes had a lower percentage of presence, like lipasa (4.55%).

## 2. INTRODUCCION

Según Stalpers (1978), Patouillard en 1900 fue el primer autor en utilizar las características microscópicas para clasificar los Basidiomycetes. El los separó en Heterobasidiomycetes (con esporas secundarias) y en Homobasidiomycetes (sin esporas secundarias). Los Heterobasidiomycetes fueron subdivididos según la septación del basidio. Por el contrario los Homobasidiomycetes cuentan con un basidio no septado y fueron agrupados en cuatro familias.

El Orden Aphyllophorales esta dentro de los Homobasidiomycetes y su principal característica es poseer un basidiocarpo gimnocárpico, es decir, de textura dura, leñosa, coriácea o papirácea, pero nunca blanda y putrescible (Alexopoulos, 1966; Valenzuela, 2003), con un himenio al descubierto desde su formación, que puede estar sobre un solo lado del esporóforo (unilateral) o sobre los dos lados o todo alrededor (anfígeno), (Alexopoulos, 1966), pueden presentar formas de repisas, claviformes, coraloides, etc.

El Orden Aphyllophorales propuesto por Rea (después Patouillard) para basidiomicetes que presentan basidiocarpos microscópicos en los cuales el himenóforo es liso (Thelephoraceae); forma de dedos o ramas (Clavariaceae); dentados (Hydnaceae); o tienen himenios con tubos (Polyporaceae) o algunas veces laminados. Los himenóforos poroides o laminados deben presentar consistencia dura y no carnosos como en los Agaricales. Tradicionalmente el Orden ha constado de cuatro familias (como se indicó anteriormente) basado en la forma del himenóforo, pero recientes estudios microscópicos detallados de las estructuras del basidiocarpo, muestran que la agrupación no es natural (Hawksworth *et al.*, 1995).

Mucha de la literatura del Orden Aphyllophorales esta basada en el agrupamiento de familias tradicionales y como una Familia puede exhibir diferentes tipos de himenóforo, (Ej.

Gomphaceae tiene himenóforos efusos, clavarioides, hidnoides y cantarelloides). La referencia a la literatura es complicada, porque la información acerca del género de cualquier familia puede ocurrir en monografías aparentemente no relacionadas, dándose información específica bajo muchas familias y géneros (Hawksworth *et al.*, 1995).

Según Stalpers (1978), Corner en 1932 distinguió tres tipos de hifas que podían presentarse en el basidiocarpo: vegetativas o generativas que son dicarióticas, generalmente hialinas, de paredes delgadas, son las únicas que pueden presentar fíbulas y formar basidios, basidiolos y cistidios, son hifas ramificadas y septadas y dan origen a los demás tipos de hifas. Hifas esqueléticas son de paredes gruesas, no presentan septos, fíbulas ni ramificaciones y actúa reforzando el basidiocarpo, por lo tanto, le dan la dureza a estos hongos porque están cutinizadas y el último tipo de hifas denominadas vinculadas o conectivas o envolventes son de paredes gruesas, presentan ramificaciones, pero no septaciones ni fíbulas y cuentan con un crecimiento limitado. Es así como se pueden encontrar especies de Aphylllophorales con sistema hifal monomítico (solo hifas generativas), dimítico o trimítico. (Valenzuela, 2003). El género *Ramaria* presenta una trama dimítica con hifas generativas y envolventes, carece de hifas esqueléticas por lo que su consistencia es putrescible, lo que la hace un caso especial dentro del Orden.

Los sustratos en los que se desarrollan los Aphylllophorales son principalmente restos vegetales en descomposición de árboles, arbustos, tocones, troncos en pudrición, también hay Aphylllophorales terrícolas, principalmente son saprófitos o micorrizógenos y juegan un rol importante en la naturaleza, degradando restos de madera y de plantas herbáceas, y fundamentales en la degradación de lignina, pudiendo hacerlo incluso en la planta viva. Se destacan las especies *Polyporus adustus* (Willd.) Fr. y también *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. que atacan simultáneamente la lignina y la celulosa en el medio natural, así como otras

especies que son utilizadas en el pretratamiento de árboles y otros sustratos lignocelulolíticos para ser utilizados como alimento para animales o para pulpa biológica y procesos de blanqueamiento de la pulpa y producción de papel (Adaskaveg, 1991). Además, pueden ser utilizados en la degradación de contaminantes de agua y suelos, aumentando la digestibilidad de lignocelulasas y posiblemente la conversión de ligninas en productos de mas alto valor (Reid, 1995). Organismos utilizados como modelo o control en la degradación de lignina son *Phanerochaete chryosporium* Burds. y *Trametes vesicolor* (L. ex Fr.) Pilát, que por medio de distintos métodos han probado su acción con la lignina (Brock *et al.*, 2000, Xiao *et al.*, 2004), y la naturaleza multienzimática de la degradación de esta, pues solo algunas enzimas presentes en algunos hongos de la División Basidiomicetes la pueden atacar, puesto que generan compuestos intermediarios que conllevan a la descomposición de la lignina (Reid, 1995; Gutiérrez y Martínez, 1996, Manzano *et al.*, 2004).

Una alternativa distinta a la metodología usada tradicionalmente para clasificar los Aphylophorales fue propuesta por Nobles (1948), basada en el cultivo de estos hongos y el posterior estudio de las colonias desarrolladas, en lo que respecta a las características macro-microscópicas, fisiológicas y enzimáticas. Así Nobles (1948), describió 126 especies de Basidiomycetes que habitan en madera, centrando la atención en características morfológicas tales como: tipos y septación de hifas, ocurrencia de esporas secundarias, cistidios, y formación de cuerpos fructíferos, pigmentación de las colonias, cambios de color del agar inducido por el hongo, diámetro de la colonia, efecto enzimático sobre agar extracto de malta (AEM) adicionado de ácido tánico o gálico y olor, colocando especial énfasis sobre los caracteres de la zona marginal de la colonia (Gárnica, 1995). Esta ha sido la descripción más amplia que se ha realizado de Basidiomycetes de la madera, además Nobles (1958) incluyó como importantes

características hifales, la distribución de las fíbulas, los tipos de diferenciación de las hifas, su color y forma al sistema de clasificación alternativo propuesto para estos hongos. Según Stalpers (1978) luego de Nobles (1958), los estudios realizados han sido para categorías pequeñas de hongos, como es el caso de *Coriolellus* que fue descrita por Sarkar en 1959, o *Pycnoporus* descrito por Nobles y Frew.

Se propuso una clasificación para los hongos pudridores de madera, que ha sido utilizada hasta hoy, las especies degradadoras de celulosa y hemicelulosa que forman una raíz café crean una “podredumbre parda”, que además solo modifican la lignina y las especies que degradan lignina completamente provocando una raíz blanca “podredumbre blanca” (Reid, 1995). El color de la raíz luego fue tomado como un carácter clasificatorio (Stalpers, 1978), así como lo fueron la determinación de enzimas degradadoras de compuestos lignocelulolíticos como lacasa y peroxidasa, que cumplen una acción frente a la lignina rompiendo los enlaces y generando compuestos fenólicos de bajo peso molecular que pueden seguir degradándose. (Manzano *et al.*, 2004)

Son varios los autores que han realizados estudios basándose en las enzimas que poseen estos hongos, entre los pioneros se encuentran Boidin que en 1951 determinó la tirosinasa y la lacasa; Käärik en 1965 probó 857 aislamientos de hongos habitantes de la madera con diferentes sustancias fenólicas y aminos orgánicos; Taylor en 1974 describió un número considerable de pruebas sobre varias enzimas (Stalpers, 1978). En la actualidad el rol de las enzimas aisladas de hongos lignolíticos es intensamente estudiado (Reid, 1995). Es así como Papinutti *et al.* (2003) midió la producción de enzimas lignicelulolíticas como: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en *Fomes sclerdermeus* (Lév.) Cooke, Tello *et al.* (2000) caracterizó tres tipos de peroxidadas en *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvanden y Larrondo *et al.*

(2003) midió la expresión de lacasa a nivel molecular de la misma especie. Por su parte Xiao *et al.* (2004) trabajó con *Trametes sp.* en la caracterización de lacasa.

Actualmente los antiguos Aphyllophorales se encuentran distribuidos en varios ordenes, están en pleno proceso taxonómico de modificación, referente a las familias que componen estos ordenes, aún no se tiene un consenso en cuanto al número y a sus límites taxonómicos; en gran parte, debido a la complejidad de estos hongos, a traslapes morfológicos que se presentan entre sus integrantes y al uso de técnicas moleculares utilizadas para sus estudios (Martínez & Valenzuela, 2004). Es por esto que una caracterización de los cultivos miceliales de estos hongos, se hace necesaria para aportar información sobre sus aspectos culturales y enzimáticos que se puedan utilizar en el ordenamiento taxonómico. Además algunos de los cultivos miceliales pueden ser utilizados en la biodegradación de lignina o la industria del papel, dependiendo de sus potencialidades enzimáticas.



En base a lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo:

### **HIPOTESIS:**

Cepas de una misma taxa perteneciente a Aphylophorales presentan cualitativamente diferencias enzimáticas, para degradar o utilizar compuestos carbonados y nitrogenados.

### **OBJETIVOS:**

#### **Objetivo General:**

Obtener en cultivo puro cepas miceliales desde basidiocarpos de Aphylophorales y determinar cualitativamente su capacidad para degradar compuestos carbonados y nitrogenados.

#### **Objetivos Específicos:**

1. Aislar y obtener en cultivo puro cepas de Aphylophorales a partir de basidiocarpos que fructifican sobre restos lignocelulolíticos.
2. Caracterizar el micelio de cada una de las cepas de Aphylophorales obtenidas en cultivo puro.
3. Determinar cualitativamente a las cepas de Aphylophorales las enzimas amilolíticas, celulolíticas, citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa, lipasa, oxidasa extracelular, peroxidasa, proteasa, tirosinasa y ureasa.
4. Determinar y relacionar la variabilidad de las cepas de Aphylophorales de acuerdo a las enzimas y a los basidiocarpos desde las cuales fueron obtenidas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Biológico

Se utilizaron 82 basidiocarpos de hongos pertenecientes al Orden Aphyllophorales recolectados en bosques y parques de la Provincia de Valdivia y 66 cepas miceliales de Aphyllophorales. Como controles se utilizaron una cepa de *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilát y una cepa de *Fusarium oxysporum* Schltdl.

##### 3.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en la fase experimental se presentan en orden alfabético y se señala en paréntesis la abreviatura usada en el texto: Acetona, ácido ascórbico, agar-agar, alcohol 96%, almidón soluble, cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de sodio (NaCl), celulosa, p-cresol ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ ), extracto de carne, extracto de malta, fast red I.T.R., fosfato ácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), gelatina, glucosa, guaiacol ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ), lactofenol, lugol, naftíl acetato ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ),  $\alpha$ -naftol ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$ ), nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), peptona, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), pirogalol, rojo fenol (1:500), sal ácida de naftíl fosfato monosódica ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4\text{PNa}$ ), solución antibiótica constituida por 1  $\mu$  de penicilina y 250 mg de estreptomina en 5 mL de agua destilada estéril (antb), tetrametil-p-fenildiamina dihidrógeno clorhídrico ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2 \times 2\text{HCl}$ ), tween 80, urea.

### **3.1.3 Equipos**

Autoclave Orthmann, cámara de incubación J Kottermann, balanzas Sartorius 2462, cámara fotográfica digital Kodak Easy Share CX7300, horno Pasteur Orthmann, lupa estereoscópica Carl Zeiss, microscopio óptico Carl Zeiss modelo KF2, refrigerador Trotter.

### **3.1.4 Otros**

Agua destilada estéril, aguja de siembra; algodón, bandas para medir pH Merck, bisturí número 4, bolsas de polietileno, bolsas de papel, botellas de vidrio (250 mL), cuchillo, cubreobjetos (18 x 18 mm), embudos, filtros, jeringas (10 mL), lápiz marcador, parafilm, pipetas (1, 5, 10 mL), pipetas Pasteur, placas Petri (90 mm de diámetro), portaobjetos, tubos de ensayo (22 mm de diámetro), tubos de ensayo con casquetes de aluminio, sierra de manualidades, vasos precipitados (500 y 1000 mL).

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Recolección de basidiocarpos**

Se recolectaron basidiocarpos de hongos pertenecientes a los Aphylophorales que fructifican en restos de ramas, tocones y troncos de árboles muertos o vivos que se encuentran en parques y bosques de la Provincia de Valdivia. Para la recolección de basidiocarpos se utilizó el método descrito por Moreno et al. (1986), que se indica a continuación:

Los basidiocarpos en distintos estadios de desarrollo se retiraron del sustrato y se depositaron en bolsas de polietileno. Posteriormente las muestras fueron llevadas al Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, para la obtención de las respectivas cepas miceliales.

### **3.2.2 Obtención de cepas miceliales en cultivo puro a partir de basidiocarpos de Aphylophorales**

Todos los basidiocarpos recolectados fueron limpiados superficialmente con un algodón impregnado en alcohol, luego con un bisturí estéril se procedió a cortarlos longitudinalmente, con el mismo bisturí previamente esterilizado se obtuvieron pequeños trozos de pseudotejido que fueron sembrados por triplicado en placas Petri que contenían agar extracto malta (AEM) al 2% adicionado de una solución antibiótica (a razón de 0.5 mL por placa). Las placas inoculadas fueron incubadas a  $23\pm 2$  °C hasta el desarrollo de micelio. Una vez desarrolladas las colonias se determinó su pureza mediante un análisis microscópico y las colonias que pertenecían a los Aphylophorales fueron replicadas en tubos de cepario que contenían AEM al 2%, tras la siembra, los tubos se incubaron a  $23\pm 2$  °C por 7 a 10 días (hasta cubrir la tercera parte de la superficie del medio de cultivo). Finalmente los tubos con cultivo puro fueron almacenados a 4 °C hasta su estudio.

### **3.2.3 Determinación macro-microscópica de estructuras indicativas en cepas miceliales desarrollados a partir de basidiocarpos de Aphylophorales**

La observación macroscópica de las colonias se realizó en forma periódica a ojo desnudo y con ayuda de una lupa estereoscópica, consistió en determinar de acuerdo a Stalpers (1978) la forma, tamaño, elevación y margen de las colonias a medida que se desarrollaron.

La observación de estructuras microscópicas se realizó mediante preparaciones en fresco, utilizando como líquido de montaje agua destilada estéril y lactofenol (ver anexo 1) para su posterior fotografía. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico con aumento de 40X y 100X. Los cultivos que presentaron hifas con fíbulas u otros elementos característicos similares a los descritos por Nobles (1948, 1958,1965) y por Stalpers (1978) para Aphyllophorales fueron considerados puros.

### **3.2.4 Masificación de cepas miceliales**

Previo a realizar las pruebas de caracterización enzimática cualitativa de las cepas miceliales obtenidas, las cepas fueron masificadas. A partir de los tubos de cepario respectivos, se extrajeron cuadrados de agar con micelio de  $0.2 \text{ cm}^2$  y fueron sembrados en forma independiente en placas Petri que contenían AEM al 2% pH  $4.8 \pm 2$ . Una vez sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 2$  °C hasta que la colonia desarralla alcanzó 50 mm de diámetro.

### **3.3 Detección cualitativa directa sobre el micelio de enzimas de interés lignocelulolítico producidas por las cepas miceliales**

Para la detección de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa, peroxidasa y tirosinasa se siguieron los métodos indicados por Stalpers (1978) y Gárnica (1995). Una vez masificadas las cepas por duplicado como se señaló en el punto 2.2.4, se procedió a la detección de las enzimas depositando en el margen de las colonias gotas de las soluciones específicas correspondientes (ver anexo 1 para la constitución de cada solución) y observando el posible cambio de color. La lectura para las enzimas esterasa, fosfatasa, lacasa, peroxidasa y tirosinasa se

realizó a las 3, 24 y 72 horas y para citocromo-oxidasa a los 30 minutos después de la aplicación de la solución indicadora.

Como controles se utilizaron placas con AEM al 2% pH 4.8 $\pm$ 2 sin micelio fúngico y otra sembrada con una cepa de *Tametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilát (control positivo), en ambos casos se le adicionaron las gotas de las distintas soluciones.

En la Tabla 1 se indican las enzimas a detectar, las abreviaturas de las soluciones empleadas en el texto y la coloración que se observa cuando la reacción es positiva. La presencia o ausencia de las enzimas en lo que resta del texto se denota como (+) y (-), respectivamente.

**Tabla 1.** Enzimas detectadas en micelios fúngicos cultivados en AEM.

| ENZIMA            | SOLUCION | REACCION (+)      |
|-------------------|----------|-------------------|
| Citocromo-oxidasa | A        | Azul              |
| Esterasa          | B        | Púrpura           |
| Fosfatasa         | C        | Púrpura           |
| Lacasa            | D        | Púrpura           |
| Lacasa            | E        | Azul oscuro-negro |
| Peroxidasa        | F        | Pardo-amarillento |
| Tirosinasa        | G        | Marrón            |

#### **3.4 Determinación cualitativa de enzimas de interés lignocelulolítico mediante el cultivo de cepas miceliales en medios de cultivos selectivos o diferenciales.**

La determinación de las enzimas amilasa, celulasa, lipasa, oxidasa-extracelular, proteasa y ureasa se realizó cultivando las cepas miceliales en medios de cultivo (ver anexo 1 para la

constitución de los medios de cultivo) adicionados del sustrato sobre el cual actúan las correspondientes enzimas.

El producto de la reacción enzima-sustrato se determino luego de 14 días de incubación, de la siguiente forma:

#### **3.4.1 Enzimas amilolíticas**

Se determinan según la técnica modificada de Pochon & Tardieux (1965). La cepa fúngica a estudiar fue sembrada en tubos de ensayo que contengan agar-almidón al 2% y se incuban a  $23\pm 2$  °C por 14 días. La detección de la enzima se lleva a cabo agregando una solución de lugol (0.5 mL) a cada tubo con cultivo. Se traduce en una reacción positiva la aparición de una zona amarillenta alrededor de la colonia. La hidrólisis parcial o nula del sustrato se manifiesta por una coloración que puede variar del azul al violeta o caoba.

#### **3.4.2 Enzimas celulolíticas**

Para determinar este tipo de enzimas se utiliza la técnica modificada de Pochon & Tardieux (1965). Las cepas fúngicas se cultivan en tubos de ensayos que contengan agar-celulosa al 2% y se incuban a  $23\pm 2$  °C por 14 días. La capacidad del hongo para crecer en este medio determina la presencia de la enzima.

#### **3.4.3 Enzima lipasa**

Se utiliza para su detección el método descrito por Hankin & Anagnostakis (1975). Las cepas fúngicas en estudio se cultivan en placas que contengan agar peptona adicionado con Tween 80 como sustrato y se incuban a  $23\pm 2$  °C por 14 días. La presencia de la enzima se delata

por la aparición de un precipitado blanco alrededor o bajo la colonia. Como control positivo se utiliza una cepa de *Fusarium oxysporum* Schltdl.

#### **3.4.4 Enzima oxidasa-extracelular**

La detección de esta enzima se realiza de acuerdo a la técnica descrita por Nobles (1948,1965). Las cepas fúngicas se cultivan en tubos de ensayo que contengan AEM al 2% adicionado de ácido tánico y se incuban a  $23\pm 2$  °C por 14 días. Una reacción positiva se denota por la aparición de una coloración café bajo o alrededor de la colonia.

#### **3.4.5 Enzimas proteolíticas**

Para detectar esta enzima se utiliza la técnica indicada por Mac Faddin (1976). Las cepas fúngicas a estudiar se siembran en tubos de ensayo que contengan gelatina al 12% y se dejan incubar por 14 días a temperatura ambiente. Para medir la actividad enzimática los tubos cultivados se mantienen durante 90 minutos a 3 °C. La reacción positiva se denota por la licuefacción del medio.

#### **3.4.6 Enzima ureasa.**

Esta enzima se detecta utilizando la técnica indicada por Mac Faddin (1976). Las cepas fúngicas se siembran en tubos con agar-urea adicionado del indicador de pH rojo fenol y se incuban a  $23\pm 2$  °C por 14 días. La presencia de la enzima se determina por la coloración rosada del medio de cultivo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características macro-microscópicas de cepas miceliales desarrolladas a partir de basidiocarpos de Aphylophorales

En la Tabla 2 primera columna, se indican las especies de Aphylophorales estudiados, en la segunda columna se señalan las siglas de las cepas miceliales aisladas desde los basidiocarpos de Aphylophorales. Las siguientes columnas describen las principales características de las colonias desarrolladas por las cepas de Aphylophorales en agar extracto malta al 2%.

Por su parte la Tabla 3, en la primera columna indica las especies de Aphylophorales estudiados y la sigla de las cepas miceliales en la segunda columna, en las siguientes columnas se describen la presencia o ausencia de los tipos de hifas, de fibulación y estructuras de resistencia observadas microscópicamente.

**Tabla 2.** Características macroscópicas de las colonias de cepas miceliales de Aphylophorales.

| <b>Aphylophorales</b>                               | <b>Cepas</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> |
|---|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst. | UACH20       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst. | UACH48       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak     | UACH62       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak     | UACH64       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.         | UACH42       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.         | UACH45       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH46       | -        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH83a      | -        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | -        |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter. Colonia:(1) algodonosa, (2) farinácea, (3) felposa, (4) flocosa, (5) plumosa, (6) colonia de color blanco, (7) colonia con tintes naranjo-amarillentos, (8) colonia con gotas de material resinoso.

Continuación Tabla 2.

| <b>Aphylophorales</b>                                     | <b>Cepas</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> |
|---|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83b      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83c      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83d      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH1a       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH1b       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH3        | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                              | UACH8a       | +        | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                              | UACH8b       | -        | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.                         | UACH73       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.                 | UACH15       | -        | +        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.                 | UACH18       | -        | +        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34a      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34b      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                  | UACH65       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                  | UACH67       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Schizophyllum commune</i> Fr.                          | UACH63       | -        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | -        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH6a       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH6b       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH14a      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH14b      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH44       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH50       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH72       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH77a      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH77b      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH10       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH23       | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH75a      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH75b      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH75c      | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                    | UACH31a      | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                    | UACH31b      | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                    | UACH36       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter. Colonia:(1) algodonosa, (2) farinácea, (3) felposa, (4) flocosa, (5) plumosa, (6) colonia de color blanco, (7) colonia con tintes naranjo-amarillentos, (8) colonia con gotas de material resinoso.

Continuación Tabla2.

| <b>Aphylophorales</b>                        | <b>Cepas</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> |
|--|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH41       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH51       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH52       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH54       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH59       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH70       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH74a      | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH74b      | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH78a      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH78b      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH2        | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4a       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4b       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4c       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4d       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH12       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH38       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH39       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH43       | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH68       | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84a      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84b      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84c      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84d      | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | -        |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter. Colonia:(1) algodonosa, (2) farinácea, (3) felposa, (4) flocosa, (5) plumosa, (6) colonia de color blanco, (7) colonia con tintes naranja-amarillentos, (8) colonia con gotas de material resinoso.

**Tabla 3.** Características microscópicas de cepas de Aphylophorales desarrollados en agar extracto malta al 2%.

| Aphylophorales                                      | Cepas   | Tipos de hifas |    |    |    |    | Fibulación |    |    | Estructuras de propagación y resistencia |    |    |    |
|---|---------|----------------|----|----|----|----|------------|----|----|--|----|----|----|
|   |         | 9              | 10 | 11 | 12 | 13 | 14         | 15 | 16 | 17                                       | 18 | 19 | 20 |
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst. | UACH20  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst. | UACH48  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak     | UACH62  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak     | UACH64  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.         | UACH42  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.         | UACH45  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH46  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | +  | +  | -  | -  | +  |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH83a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | +  | +  | -  | -  | +  |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH83b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | +  |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH83c | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | +  |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.            | UACH83d | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | +  |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.        | UACH1a  | +              | +  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.        | UACH1b  | +              | +  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.        | UACH3   | +              | +  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                        | UACH8a  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                        | UACH8b  | +              | -  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.                   | UACH73  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.           | UACH15  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.           | UACH18  | +              | +  | +  | -  | -  | -          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter, (9) hifas generativas, (10) hifas esqueléticas, (11) hifa envolventes, (12) hifas en espiral, (13) hifas incrustadas, (14) fíbulas simples, (15) fíbulas dobles, (16) fíbulas múltiples, (17) clamidosporas, (18) conidias, (19) cistidios, (20) células cuticulares.

Continuación Tabla 3.

| Aphylophorales  | Cepas   | Tipos de hifas |    |    |    |    | Fibulación |    |    | Estructuras de propagación y resistencia |    |    |    |
|---|---------|----------------|----|----|----|----|------------|----|----|--|----|----|----|
|   |         | 9              | 10 | 11 | 12 | 13 | 14         | 15 | 16 | 17                                       | 18 | 19 | 20 |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34a | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34b | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                  | UACH65  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                  | UACH67  | +              | -  | -  | -  | -  | -          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Schizophyllum commune</i> Fr.                          | UACH63  | +              | +  | -  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH6a  | +              | -  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH6b  | +              | -  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH14a | +              | +  | -  | -  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH14b | +              | +  | -  | -  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH44  | +              | +  | +  | -  | -  | -          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH50  | +              | -  | +  | -  | -  | +          | +  | -  | -  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH72  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | +  | -  | -  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH77a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH77b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray        | UACH79  | +              | -  | -  | -  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH10  | +              | -  | +  | -  | -  | +          | +  | -  | -  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH23  | +              | -  | +  | -  | -  | -          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH75a | +              | -  | +  | +  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr.   | UACH75b | +              | -  | +  | +  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter, (9) hifas generativas, (10) hifas esqueléticas, (11) hifa envolvente, (12) hifas en espiral, (13) hifas incrustadas, (14) fíbulas simples, (15) fíbulas dobles, (16) fíbulas múltiples, (17) clamidosporas, (18) conidias, (19) cistidios, (20) células cuticulares.

Continuación Tabla 3.

| Aphylophorales  | Cepas   | Tipos de hifas |    |    |    |    | Fibulación |    |    | Estructuras de propagación y resistencia |    |    |    |
|---|---------|----------------|----|----|----|----|------------|----|----|--|----|----|----|
|   |         | 9              | 10 | 11 | 12 | 13 | 14         | 15 | 16 | 17                                       | 18 | 19 | 20 |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH75c | +              | -  | +  | +  | -  | +          | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH31a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH31b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH36  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH41  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH51  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH52  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH54  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH59  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | +  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH70  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH74a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH74b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH78a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH78b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát            | UACH2   | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát            | UACH4a  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát            | UACH4b  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát            | UACH4c  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát            | UACH4d  | +              | +  | +  | -  | +  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter, (9) hifas generativas, (10) hifas esqueléticas, (11) hifa envolventes, (12) hifas en espiral, (13) hifas incrustadas, (14) fíbulas simples, (15) fíbulas dobles, (16) fíbulas múltiples, (17) clamidosporas, (18) conidias, (19) cistidios, (20) células cuticulares.

Continuación Tabla 3.

| Aphylophorales                               | Cepas   | Tipos de hifas |    |    |    |    | Fibulación |    |    | Estructuras de propagación y resistencia |    |    |    |
|--|---------|----------------|----|----|----|----|------------|----|----|--|----|----|----|
|  |         | 9              | 10 | 11 | 12 | 13 | 14         | 15 | 16 | 17                                       | 18 | 19 | 20 |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH12  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH38  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH39  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH43  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH68  | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84a | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84b | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84c | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84d | +              | +  | +  | -  | -  | +          | -  | -  | +  | -  | -  | -  |

(+) presencia del carácter, (-) ausencia del carácter, (9) hifas generativas, (10) hifas esqueléticas, (11) hifa envolventes, (12) hifas en espiral, (13) hifas incrustadas, (14) fíbulas simples, (15) fíbulas dobles, (16) fíbulas múltiples, (17) clamidosporas, (18) conidias, (19) cistidios, (20) células cuticulares

En la Tabla 2, se observa que las dos cepas miceliales de *Bjerkandera adusta*, presentan colonias de color blanco y la textura varia de felposa en la cepa UACH20 a algodonosa en UACH48. Microscópicamente (Tabla 3) presentan una trama monomítica formada solo por hifas generativas, la fibulación es simple, además presentaron clamidosporas.

Para las dos cepas de *Conchomyces bursiformis*, se observan colonias algodonosas y de color blanco (Tabla 2). Una trama monomítica, con fibulación simple y presencia de clamidosporas. Mientras que artroconidias se observaron sólo en la cepa UACH62 (Tabla 3).

Las dos cepas de *Fistulina hepatica*, presentaron colonias blancas, algodonosas y felposas (Tabla 2). La trama es monomítica con fíbulas simples, hay presencia de clamidosporas. Por su parte las conidias se observaron sólo en la cepa UACH45 (Tabla 3).

Las cinco cepas de *Ganoderma applanatum* (Tabla 2), presentaron colonias de textura felposa, en las cepas UACH46 y UACH83a además algo plumosas, en todas las colonias la coloración es blanca. Al microscopio (Tabla 3) se observó una trama trimítica con hifas generativas, esqueléticas y envolventes, la fibulación es simple. Además en las cepas UACH46 y UACH83a se observó fibulación múltiple. En las cinco cepas hay presencia de clamidosporas y células cuticulares.

En las tres cepas de *Gloeophyllum trabeum* (Tabla 2), las colonias tienen una textura algodonosa y coloración blanca. La trama (Tabla 3) es dimítica con hifas generativas y esqueléticas, fibulación simple y clamidosporas. Sólo en la cepa UACH3 se observaron artroconidias.

Las dos cepas miceliales de *Grifola gargal* (Tabla 2), presentaron colonias blancas de textura flocosa, además la colonia de UACH8a es en algunas zonas algodonosa. En la Tabla 3 se observa que la cepa UACH8a presenta una trama trimítica con hifas generativas esqueléticas y



envolventes, mientras que la cepa UACH8b presenta solo hifas generativas y envolventes (trama dimítica). Ambas cepas tienen fíbulas simples y además UACH8a presenta clamidosporas.

Solo se obtuvo una cepa micelial de *Lenzites betulina* (Tabla 2), la cual presenta una colonia algodonosa-felposa de coloración blanca, la trama hifal es monomítica con fibulación simple y presencia de clamidosporas (Tabla 3).

Las dos cepas de *Phanerochaete chrysosporium*, presentan colonias blancas y de textura farinácea (Tabla 2), una trama trimítica, con fíbulas simples que sólo se observan en la cepa UACH15, las clamidosporas están presentes en ambas cepas (Tabla 3).

Las dos cepas de *Phlebia lilascens*, (Tabla 2) presentan colonias algodonosas y blancas con algunos tintes naranja-amarillentos. La microscopia (Tabla 3) muestra una trama monomítica con fibulación simple y ausencia de clamidosporas.

En las cepas de *Phlebiopsis gigantea* (Tabla 2), se observaron colonias blancas de textura algodonosa-felposa en la cepa UACH65 y sólo felposa en UACH67. Mientras que la trama es monomítica, hay presencia de clamidosporas en ambas cepas y solo en UACH65 se observaron fíbulas y arthroconidias (Tabla 3).

Sólo se obtuvo una cepa de *Schizophyllum commune* (Tabla 2), la cual presenta una colonia de textura plumosa-felposa y coloración blanca. Una trama dimítica con hifas generativas e hifas esqueléticas (Tabla 3), fibulación simple y clamidosporas.

En las Tabla 2, se indican las diez cepas miceliales de *Stereum hirsutum*, todas las colonias presentaron texturas algodonosas y coloración blanca, en las cepas UACH14a, UACH14b, UACH72, UACH77a y UACH77b se presentan además algunos tintes naranja-amarillento, en estas mismas cepas se pueden observar gotas de material resinoso. Microscópicamente (Tabla 3) se observó una trama hifal trimítica en las cepas UACH44, UACH72, UACH77a y UACH77b.

Dimítica con hifas generativas y esqueléticas en las cepas UACH14a y UACH14b, dimítica con hifas generativas y envolventes en las cepas UACH6a, UACH6b y UACH50 y monomítica en la cepa UACH79. Se observó fibulación simple y doble, excepto en las cepas UACH6a y UACH6b donde sólo es simple y en UACH44 sólo se observan fíbulas dobles. Sólo las cepas UACH50 y UACH72 no presentaron clamidosporas, mientras que en todas las cepas se observaron cistidios.

Las cinco cepas de *Stereum sanguinolentum* (Tabla 2), presentaron colonias de textura algodonosa, blancas con tintes naranja-amarillentos y gotas de material resinoso con excepción de UACH23. En todas las cepas (Tabla 3) se presenta una trama dimítica con hifas generativas y envolventes, las cepas UACH75a, UACH75b y UACH75c presentan también hifas en espiral. Cuatro de las cinco cepas presentan fibulación simple y doble a la vez, en la cepa UACH23 sólo se observó fibulación doble. Los cistidios están presentes en todas las cepas y clamidosporas no fueron observadas en la cepa UACH10.

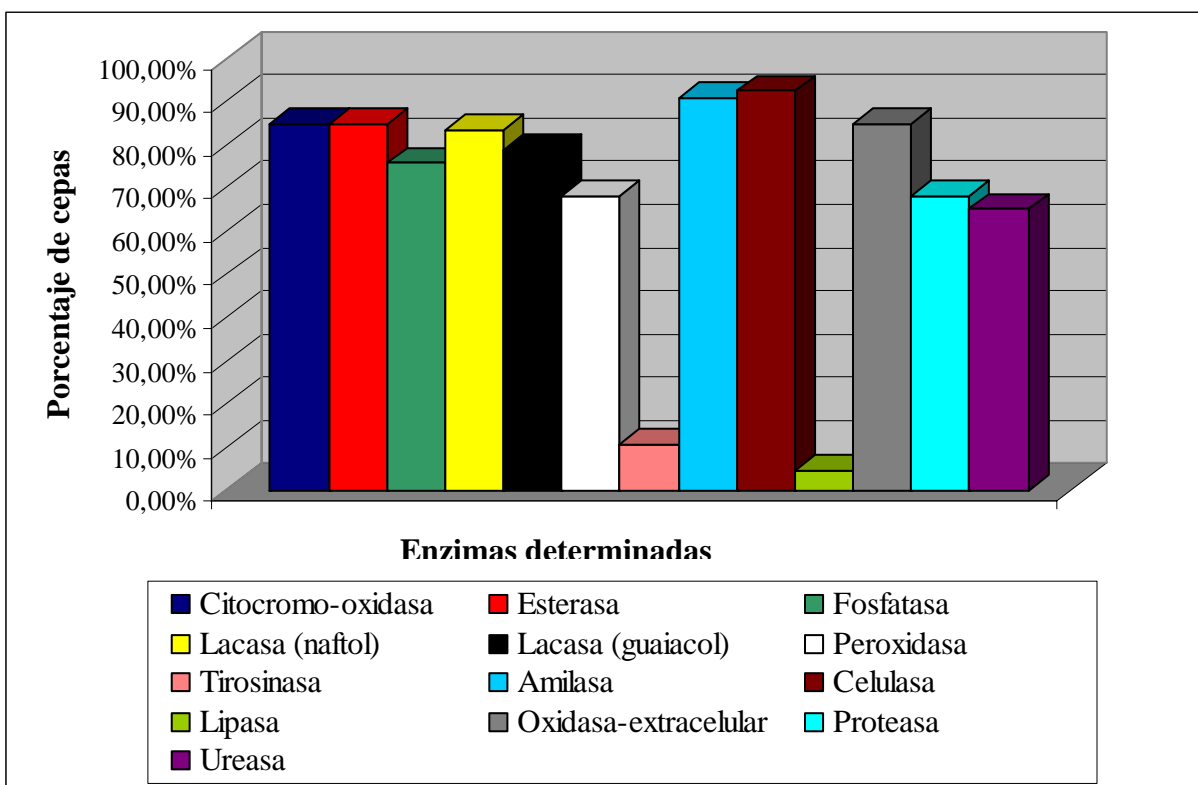
Las trece cepas miceliales de *Trametes hirsuta* (Tabla 2), presentan colonias de color blanco y textura algodonosa-felposa, excepto en UACH78a y UACH78b donde sólo es felposa. La trama hifal (Tabla 3) es trimítica, en las cepas UACH41 y UACH52 se observan también hifas incrustadas. Las fíbulas son simples en todas las cepas. Sólo se observaron clamidosporas en las cepas UACH36, UACH41, UACH52, UACH59, UACH78a y UACH78b, y artroconidias en UACH41, UACH52 y UACH59.

Por último las catorce cepas miceliales de *Trametes versicolor* (Tabla 2), presentaron una textura algodonosa-felposa en sus colonias y una coloración blanca. La trama es trimítica y las cepas UACH4a, UACH4b, UACH4c y UACH4d presentan además hifas incrustadas. En las catorce cepas hay fibulación simple y clamidosporas (Tabla 3).

## 4.2 Determinación enzimática cualitativa

### 4.2.1 Distribución porcentual de cepas de Aphylophorales versus las enzimas determinadas cualitativamente

En la Figura 1 se muestra la distribución porcentual de las 66 cepas ensayadas, en relación con las enzimas determinadas cualitativamente.



**Figura 1.** Distribución porcentual de cepas miceliales de Aphylophorales con respecto a las enzimas determinadas cualitativamente.

En la Figura 1, se observa que la enzima celulasa fue la que se determinó en un mayor porcentaje de cepas (92,42%). Mientras que el menor porcentaje de cepas (4,55%) fue positiva a la enzima lipasa.

#### **4.2.2 Determinación cualitativa de enzimas de interés lignocelulolítico producidas por las cepas miceliales de Aphylophorales**

La Tabla 4, en su primera columna muestra las especies de Aphylophorales a que corresponden las cepas ensayadas, en la segunda columna se indican las siglas asignadas a las cepas y en la última columna se señalan las enzimas determinadas cualitativamente para cada cepa en estudio.

**Tabla 4.** Cepas de Aphylophorales y sus enzimas determinadas.

| <b>Aphylophorales</b>                                     | <b>Cepas</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>H</b> | <b>I</b> | <b>J</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>M</b> |
|---|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst.       | UACH20       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Willd. ex Fr.) P. Karst.       | UACH48       | *+       | d        | d        | d        | d        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak           | UACH62       | *+       | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Conchomyces bursiformis</i> (Berk.) E. Horak           | UACH64       | *+       | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.               | UACH42       | *+       | +        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | +        |
| <i>Fistulina hepatica</i> (Schaeff.) ex Fr.               | UACH45       | *+       | d        | -        | d        | d        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH46       | *+       | d        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | +        | +        | +        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83a      | +        | d        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83b      | +        | -        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83c      | +        | -        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.                  | UACH83d      | +        | -        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH1a       | -        | -        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | -        | -        | -        | -        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH1b       | -        | d        | +        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | -        | -        | -        | +        |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.              | UACH3        | -        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | d        |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                              | UACH8a       | +        | +        | +        | +        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | -        | -        | +        |
| <i>Grifola gargal</i> Singer                              | UACH8b       | *+       | -        | +        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | d        | -        | d        |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.                 | UACH15       | +        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | -        | +        | +        |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds.                 | UACH18       | +        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | -        | +        | d        |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34a      | -        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        | -        | +        |
| <i>Phlebia lilascens</i> (Bourdot) J. Erikss. & Hjortstam | UACH34b      | -        | +        | -        | +        | d        | -        | -        | -        | +        | -        | +        | -        | +        |

(A) citocromo-oxidasa, (B) esterasa, (C) fosfatasa, (D) lacasa (naftol), (E) lacasa (guaiacol), (F) peroxidasa, (G) tirosinasa, (H) amilasas, (I) celulasa, (J) lipasa, (K) oxidasa-extracelular, (L) proteasa, (M) ureasa, (+) reacción positiva, (-) reacción negativa, (d) reacción débil positiva, (\*) reacción luego de 24 h.

Continuación Tabla 4.

| <b>Aphylophorales</b>                                   | <b>Cepas</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>H</b> | <b>I</b> | <b>J</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>M</b> |
|---|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                | UACH65       | -        | -        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Phlebiopsis gigantea</i> (Fr.) Jülich                | UACH67       | +        | d        | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | -        | -        | +        | -        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH6a       | +        | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH6b       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH14a      | +        | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH14b      | +        | -        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH44       | -        | -        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH50       | -        | +        | -        | -        | -        | -        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | d        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH72       | *+       | +        | d        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH77a      | *+       | +        | d        | d        | d        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH77b      | *+       | +        | -        | d        | d        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Stereum hirsutum</i> (Willd. ex Fr.) S. F. Gray      | UACH79       | -        | +        | -        | -        | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        | -        | -        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH10       | *+       | -        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH23       | +        | -        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | -        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH75a      | *+       | +        | -        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH75b      | *+       | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Stereum sanguinolentum</i> (Alb. & Schw. ex Fr.) Fr. | UACH75c      | *+       | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH31a      | *+       | +        | -        | +        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | -        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH31b      | *+       | +        | +        | +        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH36       | +        | d        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH41       | *+       | +        | -        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát                  | UACH51       | -        | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |

(A) citocromo-oxidasa, (B) esterasa, (C) fosfatasa, (D) lacasa (naftol), (E) lacasa (guaiacol), (F) peroxidasa, (G) tirosinasa, (H) amilasas, (I) celulasa, (J) lipasa, (K) oxidasa-extracelular, (L) proteasa, (M) ureasa, (+) reacción positiva, (-) reacción negativa, (d) reacción débil positiva, (\*) reacción luego de 24 h.

Continuación Tabla 4.

| <b>Aphylophorales</b>                        | <b>Cepas</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>H</b> | <b>I</b> | <b>J</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>M</b> |
|--|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH52       | +        | d        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH54       | +        | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH59       | d*       | +        | +        | +        | +        | d        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH70       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | d        | +        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH74a      | *+       | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH74b      | *+       | +        | +        | +        | +        | -        | -        | +        | +        | -        | d        | +        | -        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH78a      | *+       | +        | -        | d        | d        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes hirsuta</i> (Wulfen) Pilát       | UACH78b      | *+       | +        | -        | d        | d        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH2        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4a       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | d        | d        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4b       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | d        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4c       | +        | d        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH4d       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | d        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH12       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH38       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH39       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | -        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH43       | +        | +        | d        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | -        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH68       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84a      | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84b      | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84c      | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |
| <i>Trametes versicolor</i> (L. ex Fr.) Pilát | UACH84d      | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | d        |

(A) citocromo-oxidasa, (B) esterasa, (C) fosfatasa, (D) lacasa (naftol), (E) lacasa (guaiacol), (F) peroxidasa, (G) tirosinasa, (H) amilasas, (I) celulasa, (J) lipasa, (K) oxidasa-extracelular, (L) proteasa, (M) ureasa, (+) reacción positiva, (-) reacción negativa, (d) reacción débil positiva, (\*) reacción luego de 24 h.

**Tabla 5.** Otras cepas de Aphylophorales donde se detectó la producción de enzimas de interés lignocelulolítico.

| <b>Aphylophorales</b>             | <b>Cepas</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>H</b> | <b>I</b> | <b>J</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>M</b> |
|-----------------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr. | UACH73       | +        | +        | +        | -        | -        | +        | -        | +        | +        | -        | +        | +        | +        |
| <i>Schizophyllum commune</i> Fr.  | UACH63       | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        | -        | -        |

(A) citocromo-oxidasa, (B) esterasa, (C) fosfatasa, (D) lacasa (naftol), (E) lacasa (guaiacol), (F) peroxidasa, (G) tirosinasa, (H) amilasas, (I) celulasa, (J) lipasa, (K) oxidasa-extracelular, (L) proteasa, (M) ureasa, (+) reacción positiva, (-) reacción negativa.



En la Tabla 4, se observa que en las dos cepas miceliales de *Bjerkandera adusta* (UACH20 y UACH48), se determinó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), amilasa, celulasa y oxidasa-extracelular, presentando una reacción débil positiva en la cepa UACH48 para esterasa, fosfatasa, y lacasa (naftol y guaiacol). No se detectó en ambas cepas la producción de las enzimas tirosinasa, lipasa, proteasa y ureasa. La detección de la enzima peroxidasa fue positiva sólo para la cepa UACH20.

En las dos cepas miceliales de *Conchomyces bursiformis* (UACH62 y UACH64), se determinó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), amilasa, celulasa, oxidasa-extracelular y proteasa. En ambas cepas no se detectó la producción de las enzimas peroxidasa, lipasa y ureasa. La detección de la producción de la enzima tirosinasa fue positiva sólo para la cepa UACH64.

Referente a las dos cepas miceliales de *Fistulina hepatica* (UACH42, UACH45), se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa y ureasa, (en la cepa UACH45 la reacción fue positiva débil para esterasa). En ambas cepas no se detectó la producción de las enzimas fosfatasa, tirosinasa y lipasa. La detección de la producción de las enzimas lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, amilasa, celulasa, oxidasa-extracelular y proteasa fue positiva o débil positiva sólo para la cepa UACH45.

En la Tabla 4, se indican las cinco cepas miceliales de *Ganoderma applanatum* (UACH46, UACH83a, UACH83b, UACH83c y UACH83d) obtenidas, en las cuales se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, amilasa, celulasa, oxidasa-extracelular y proteasa. En las cinco cepas no se detectó la producción de la enzima tirosinasa. La detección de la enzima lipasa fue positiva solo en la cepa UACH46. La detección de esterasa fue débil positiva solo para las cepas UACH46 y UACH83a. Mientras que

la detección de la enzima ureasa fue positiva para la cepa UACH83b y débil positiva para UACH83d.

Por su parte en las tres cepas miceliales de *Gloeophyllum trabeum* (UACH1a, UACH1b y UACH3) obtenidas, no se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, celulasa, lipasa, oxidasa-extracelular y proteasa. La detección de las enzimas tirosinasa y amilasa fue negativa para UACH3 y la detección de esterasa y ureasa fue positiva o débil positiva para las cepas UACH1b y UACH3. Mientras que la detección de la producción de la enzima fosfatasa fue positiva sólo para la cepa UACH1b.

En lo que respecta a las dos cepas miceliales de *Grifola gargal* (UACH8a y UACH8b), en ambas se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, fosfatasa, amilasa, celulasa y ureasa, en esta última en forma positiva o débil positiva. En ambas cepas no se detectó la producción de las enzimas lacasa (guaiacol), tirosinasa, lipasa y proteasa. La detección de esterasa, lacasa (naftol) y peroxidasa fue positiva sólo para UACH8a, mientras que la detección de la producción oxidasa-extracelular fue débil positiva para la cepa UACH8b.

En la Tabla 4, se observa que en las dos cepas miceliales de *Phanerochaete chrysosporium* (UACH15 y UACH18), se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, amilasa, celulasa, proteasa y ureasa. El resto de las enzimas pesquisadas no se detectaron en ambas cepas.

En las dos cepas miceliales de *Phlebia lilascens* (UACH34a y UACH34b) obtenidas, se detectó la producción de las enzimas esterasa, celulasa, oxidasa-extracelular y ureasa. No se detectó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, fosfatasa, peroxidasa, tirosinasa, amilasa y proteasa en ambas cepas. La detección de la producción de la enzima lacasa (naftol y guaiacol)

fue positiva o débil positiva para la cepa UACH34b. Mientras que la producción de la enzima lipasa sólo se detectó en UACH34a.

En el presente estudio se obtuvieron dos cepas miceliales de *Phlebiopsis gigantea* (UACH65 y UACH67), las cuales reaccionaron en forma positiva a la detección de la producción de las enzimas fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, celulasa y proteasa. En ambas cepas no se detectó la producción de las enzimas lipasa y ureasa. Para la cepa UACH67 la detección de la enzima citocromo-oxidasa fue positiva y débil positiva para esterasa. Mientras sólo en la cepa UACH65 la detección de la producción de las enzimas tirosinasa y amilasa fue positiva y débil positiva para oxidasa-extracelular.

Como se observa en la Tabla 4, se obtuvieron diez cepas miceliales de *Stereum hirsutum*, todas reaccionaron en forma positiva a la detección de la producción la enzima celulasa y en ninguna de ellas se detectó la producción de la enzima lipasa. A parte de la lipasa en la cepa UACH6a no se detectó la producción de peroxidasa, tirosinasa y proteasa. En las cepas UACH6b y UACH72 tirosinasa, en UACH14a peroxidasa y tirosinasa. En UACH14b esterasa, peroxidasa y tirosinasa. La cepa UACH44 no registró reacción para citocromo-oxidasa y esterasa. Por su parte UACH50 presentó reacción negativa para citocromo-oxidasa, fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, tirosinasa y proteasa, en lo que respecta a UACH77a fue negativa a tirosinasa al igual que UACH77b, además esta última cepa también fue negativa para fosfatasa. Por último la cepa UACH79 a parte de reaccionar positivamente para celulasa lo hizo a esterasa y tirosinasa, para el resto de las enzimas ensayadas fue negativa.

En la Tabla 4, se observa que se obtuvieron cinco cepas miceliales de *Stereum sanguinolentum* (UACH10, UACH23, UACH75a, UACH75b y UACH75c), en las cuales se determinó la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, lacasa (naftol y guaiacol),

peroxidasa, amilasa, oxidasa-extracelular y ureasa en forma positiva o débil positiva. En las cinco cepas no se detectó la producción de las enzimas tirosinasa y lipasa. La detección de la producción de las enzimas esterasa y proteasa, fue positiva sólo para las cepas UACH75a, UACH75b y UACH75c. Además en la cepa UACH75a no se detectó la producción de fosfatasa y en la cepa UACH23 la celulasa.

En las trece cepas que se obtuvieron de *Trametes hirsuta*, se detectó la producción de esterasa, lacasa (naftol), amilasa y celulasa en forma positiva o débil positiva. En todas las cepas no se determinó tirosinasa y lipasa. En la cepa UACH31a además no se detectó la producción de fosfatasa, lacasa (guaiacol) y oxidada-extracelular, en UACH31b lacasa (guaiacol). En la cepa UACH36 proteasa, UACH41 fosfatasa. En UACH51 no se determinó citocromo-oxidasa y peroxidasa. La cepa UACH54 no registró reacción para la producción de peroxidasa al igual que UACH74a y UACH74b. En las cepas UACH78a y UACH78b la reacción fue negativa en la detección de la producción de la enzima fosfatasa. Por último las cepas UACH52, UACH70 UACH78a y UACH78b fueron las únicas donde la detección de la producción de ureasa fue positiva.

Por su parte en las catorce cepas obtenidas de *Trametes versicolor*, la detección de la producción de las enzimas citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa, lacasa (naftol y guaiacol), peroxidasa, amilasa, celulasa y oxidasa-extracelular fue positiva o débil positiva. En todas las cepas no se determinó la producción de tirosinasa y lipasa. No se detectó la enzima proteasa en las cepas UACH2, UACH12, UACH38 y UACH39, el resto de las cepas reaccionaron en forma débil positiva o positiva, mientras que la detección de la producción de ureasa fue negativa en UACH4b y UACH43, en el resto de las cepas se determinó en forma positiva o débil positiva.

Como se observa en la tabla 5 se obtuvo una cepa de *Lenzites betulina* y una de *Schizophyllum commune*, los resultados de la determinación enzimática en estas cepas no serán tratados en el presente estudio para fines de discusión, pues el objetivo de esta tesis es comparar la producción de enzimas de interés lignocelulolítico por cepas pertenecientes a una misma especie.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Características macro-microscópicas de cepas miceliales desarrolladas a partir de basidiocarpos de Aphylophorales

Las características de las colonias miceliales de *Bjerkandera adusta* coinciden con lo citado por Nobles (1948) y Stalpers (1978), textura algodonosa convirtiéndose en felposa, así como las características microscópicas donde se destacan la presencia de clamidosporas, fíbulas simples y ausencia de hifas esqueléticas y envolventes. Si bien los autores describen la presencia de artroconidias, la ausencia de estas en las cepas estudiadas puede deberse a que los cultivos trabajados eran muy jóvenes y esto no permitió la observación de dicha estructuras, como ocurrió con cepas de otras especies que se describen más adelante.

Según Gárnica (1995), las características más resaltantes de *Conchomyces bursiformis* son la textura subfelposa y color blanco-crema de su colonia, la presencia de numerosas fíbulas y escasas hifas con protuberancias y la presencia de cristales incrustados en las hifas. En los cultivos miceliales observados en este estudio no se observaron hifas con protuberancia, ni cristales incrustados, la textura de las colonias es mas bien algodonosa quizás un poco plumosa como cita Gárnica (1995), para cultivos de a lo menos un mes. Si bien el autor antes citado no describe la presencia de clamidosporas ni artroconidias, en las cepas del presente estudio fueron observadas.

Las cepas de *Fistulina hepatica* no se alejan de lo descrito por la literatura (Stalpers 1978 y Valenzuela *et al.* 2006), en cuanto a características macro-microscópicas. Valenzuela *et al.* (2006) desde cultivos no describe la presencia de conidias como ocurre en Stalpers (1978) sí. En

el presente estudio fueron observadas conidias, si bien sólo en la cepa UACH45, pues quizás la cepa UACH42 era muy joven al momento realizar las preparaciones para la observación.

Stalpers en 1978, describió para *Ganoderma applanatum*, como característica macroscópica, una colonia micelial blanca a crema, vellosa a algodonosa que luego se convierte en felposa, lo que concuerda con las cepas estudiadas, si bien, en la Tabla 3 se indica textura plumosa para *G. applanatum*, según la literatura es lo mismo que referirse a vellosa. La microscopía coincide también al describir una trama trimítica con hifas con muchas ramificaciones cortas, ausencia de cistidios y conidias y presencia de células cuticulares. Se destaca la presencia de fíbulas en todos los septos y además en algunas cepas como UACH46 y UACH83a más de una fíbula en un mismo septo. Si bien Stalpers (1978) toma la ausencia de clamidosporas como una característica taxonómica, hay otros autores que las mencionan como presentes y esto es factible, ya que las clamidosporas son muy comunes en los cultivos miceliales de Basidiomycetes en especial en el Orden Aphyllophorales (Nobles 1948, 1958, 1965, Kendrick 1971, Stalpers 1978) y su formación es una respuesta a condiciones ambientales adversas o bien a la edad del cultivo (Watling 1979, citado por Gárnica 1995). Estas estructuras permiten al hongo, por una parte, colonizar sustratos de acentuado déficit nutritivo y, por otra, resistir factores ambientales extremos como, por ejemplo, humedad y temperatura, representando un importante mecanismo de preservación de la especie, en condiciones adversas (Hawksworth *et al.* 1995).

La trama dimítica de *Gloeophyllum trabeum*, con hifas generativas y envolventes, clamidosporas y presencia de artroconidias, aunque sólo en la cepa UACH3 es similar a lo descrito por Stalpers (1978). Se observó en las cepas trabajadas la presencia de fíbulas simples, pero no en la zona marginal coincidiendo con el autor, al igual que la textura algodonosa de las colonias miceliales y la coloración blanca de estas.

*Grifola gargal*, es una especie endémica de los bosques nativos del sur de Chile y Argentina (Valenzuela, 2003\*), por lo que estudios sobre sus características macro-microscópicas en cultivos de cepas miceliales no son conocidos, y no se puede realizar una comparación sobre la presencia o no de estructuras.

Una colonia micelial de coloración blanca a crema, con textura farinácea a granulosa, se presenta en *Phanerochaete chrysosporium* Stalpers (1978). Sobre la trama hifal este autor no hace ninguna descripción, pero en el estudio se observó la presencia de tres tipos de hifas (generativas, esqueléticas y envolventes). La literatura describe para *P. chrysosporium* la presencia en forma escasa o ausencia total de clamidosporas, es así como en la cepa UACH15 se observaron algunas de estas estructuras. Las conidias se catalogaron como ausentes en las preparaciones observadas, lo que puede indicar que las cepas estudiadas sólo realizaron un crecimiento vegetativo de la hifa.

Stalpers (1978) no cita en su texto a *Phlebia lilascens* dentro de las cepas estudiadas, por lo que la comparación al igual que en *Grifola gargal*, no es posible realizarla. Breitebach & Kränzlin (1986) destacan la presencia de un sistema hifal monomítico y fíbulas simples en los septos al realizar preparaciones en fresco de muestras de basidiocarpos, lo que corresponde a lo observado en este estudio.

La textura de las colonias de *Phebiopsis gigantea* difiere de la literatura, según esta debe ser vellosa convirtiéndose pronto en farinácea a flocosa. Lo observado en este estudio es una textura algodonosa a felposa de coloración blanca. Según Stalpers (1978) las fíbulas en esta especie son escasas y así fue observado, ya que sólo se presentaron en la cepa UACH65 al igual que las artroconidias que según la literatura (Nobles 1948) son abundantes para esta especie. Lo contrario



ocurrió con las clamidosporas, ya que al igual que *G. applanatum* las claves taxonómicas las describen como ausentes, pero en las cepas estudiadas si se presentan.

Para las cepas de *Stereum hirsutum* las colonias miceliales densamente algodonosas de color blanco y luego con tintes amarillentos y gotas de material resinoso en algunas cepas, descritas por Stalpers (1978), son similares a las descritas en este estudio, incluso según el autor las zonas con tintes amarillos en las colonias se vuelven rojas al reaccionar con KOH. Se realizó el experimento en las cepas del presente estudio que presentaban los tintes y el resultado fue positivo. La característica principal del micelio es la presencia de múltiples fíbulas específicamente fíbulas dobles en los septos. Tal como describe la literatura no se observaron conidias, pero si clamidosporas en algunas cepas, que deben responder básicamente a necesidades nutricionales. En todas las cepas estudiadas se observaron cistidios, que son estructuras estériles que dan principalmente sostén al micelio.

Tal como en las cepas anteriores, *Stereum sanguinolentum* presenta colonias algodonosas o algo lanosas de color blanco, pero las zonas con tintes amarillentos, que se vuelven rojas al reaccionar con KOH, son mas abundantes que en *S. hirsutum* al igual que la presencia de gotas de material resinoso. Raramente poseen dos fíbulas en un septo, pero según Stalpers (1978) existen cepas que pueden presentar de 3 a 5 fíbulas por septo. Tal como en *S. hirsutum* la literatura no describe la presencia de clamidosporas, pero en este estudio hay cepas que las presentan, junto con cistidios en todas las cepas trabajadas.

*Trametes hirsuta* presenta una colonia algodonosa a algodonosa-lanosa que luego se convierte en felposa, de color blanco o crema. Las fíbulas están presentes en todos los septos, presenta tanto hifas esqueléticas como envolventes, además de las generativas. A menudo presenta artroconidias que pueden volverse redondas. Clamidosporas están ausentes (Stalpers,

1978). En el presente estudio son sólo tres las cepas en que se observaron artroconidias y cabe destacar que en cuatro cepas se observaron clamidosporas, estas mismas cepas son las que presentaron artroconidias. Las demás características son coincidentes con la literatura.

Según Stalpers (1978) la presencia de hifas esqueléticas y envolventes, fíbulas presentes en todos los septos, la colonia micelial blanca o crema, de textura algodonosa convirtiéndose rápidamente en subfelposa y finalmente felposa es una característica común de *Trametes sp.* En particular *Trametes versicolor* presenta clamidosporas, tal como se observó en las 14 cepas de esta especie que se analizaron en este estudio. El autor citado también describe la presencia de artroconidias en algunas cepas, las cuales no fueron observadas en el presente estudio.

## **5.2 Determinación enzimática cualitativa**

De especial importancia es la determinación de enzimas relacionadas con los procesos degradativos de materiales lignocelulolíticos. Existe un gran interés en el estudio de los hongos que contengan enzimas capaces de degradar compuestos como la lignina y celulosa principalmente, con un énfasis especial en la posible utilización de estos en la biodegradación (Bennett, 1998), de modo de conseguir un aprovechamiento óptimo de los materiales lignocelulolíticos en su mayoría de origen forestal y paralelamente, poder disminuir la contaminación ambiental derivada de la utilización de estos.

Uno de los constituyentes mayoritarios de los materiales lignocelulolíticos es la lignina, corresponde al tercer compuesto en abundancia (Schlegel, 1997) y sólo algunos microorganismos son capaces de degradarla, ya que presenta una estructura molecular compleja principalmente en los enlaces. Su degradación se lleva a cabo por procesos de oxidación

principalmente y como se mencionó en las primeras hojas de este escrito, los hongos capaces de realizar este proceso son los llamados hongos de pudrición blanca (Reid, 1995).

Algunas de las enzimas que participan en los procesos de degradación de la lignina son las fenoloxidasas como: citocromo-oxidasa, esterasa, fosfatasa y oxidasa-extracelular; otras enzimas que participan son lacasa, peroxidasa que catalizan la degradación oxidativa de los compuestos lignícolas (Higuchi, 2004) y tirosinasa .

Otro componente importante de los materiales lignocelulolíticos y tejidos vegetales es la celulosa, que es ampliamente degradada por los hongos de la pudrición parda (Reid, 1995). La degradación de esta molécula se lleva a cabo por un complejo enzimático llamado complejo celulasa. Cabe destacar que en algunos casos la molécula de celulosa puede ser utilizada como fuente de carbono y energía en la degradación de la lignina (Gárnica, 1995).

Un elemento que puede ser utilizado como fuente de carbono y energía y que fue determinado en el presente estudio es el almidón, que puede ser degradado por tres vías. La capacidad de los Basidiomycetes de degradar este compuesto es ampliamente conocida (Vinogradova & Kushnir, 2003, Fu *et al.* 2006)

En menor proporción, pero de igual importancia en los tejidos vegetales son los lípidos y las proteínas, estos compuestos pueden ser degradados por una amplia gama de hongos. Las proteínas corresponden a una de las fuentes más importantes de nitrógeno orgánico en los vegetales, junto con la urea que puede ser degradada hasta nitrógeno por medio de la enzima ureasa, llegando a ser utilizable por los microorganismos. Por su parte, los lípidos constituyen una fuente de carbono y energía, su efecto en la producción de enzimas celulolíticas es ampliamente estudiado incluso ha llegado a tomar valor taxonómico.

Los Aphyllorphales son Basidiomycetes muy eficaces degradadores de madera. Distintas especies difieren en su capacidad de degradar la madera, por lo tanto especies funcionalmente diversas, se pueden encontrar degradándolo en un mismo sustrato (Urcelay & Robledo, 2004).

La actividad ligninolítica de *Bjerkandera adusta* como hongo de la pudrición blanca es ampliamente conocida y son muchos los estudios realizados a esta especie, sobre todo para probar su capacidad de degradar tintes de maderas y ácidos húmicos. Esta última capacidad puede ser útil para la fabricación de filtros biológicamente activos para la purificación de agua potable con ácidos húmicos (Belcarz *et al.* 2005, Sato *et al.* 2003). La producción de lacasa por este hongo obtiene valores altos al igual que la peroxidasa. Según estudios de Mtui & Nakamura (2002), puede ocurrir que la secreción de proteasa desestabilice la producción de peroxidasa. En este estudio no se detectó la presencia de proteasa en *B. adusta*, pero tal como Fuentes & Olmos (1973) citados por Gárnica (1995), realizaron un estudio con cuatro cepas miceliales de Agaricales sobre la gelatina y detectaron que todas tienen la capacidad de licuarla, lo que varía es el tiempo para realizar este proceso. No se descarta que en los Aphyllorphales ocurra lo mismo. En estudios de Belcarz *et al.* (2005) se detectó la producción significativa de lacasa y lipasa en sustratos con ácido húmico, Gutierrez *et al.* (2002) detectó la presencia de compuestos lipídicos en estados avanzados de degradación de madera. En las cepas UACH20 y UCH48 no se detectó con el método utilizado actividad lipolítica como en la mayoría de las cepas estudiadas, las razones pueden deberse principalmente a la juventud de los cultivos y el poco tiempo de incubación o la falta de algún compuesto específico en el medio de cultivo que acuse la presencia de la enzima lipasa, encargada de la degradación de lípidos.

Dentro del presente estudio se recolectó *Conchomyces bursiformis*, una especie que no pertenece al Orden Aphyllorphales sino a los Agaricales, pero fue igualmente incluido en la

determinación enzimática y caracterización micelial realizada, que presentó una actividad enzimática distinta al estudio realizado por Gárnica en 1995, se detectó la presencia de las enzimas degradadoras de lignina, celulosa, lípidos, gelatina y urea. En el estudio desarrollado, si bien esta especie fue corroborada como perteneciente a los hongos de pudrición parda, no se determinó la presencia de peroxidasa, en una de las cepas (UACH64) se detectó la presencia de tirosinasa, hubo actividad amilolítica en ambas cepas y la actividad lipolíticas y ureolítica no fue detectada. Gárnica (1995) dice en el párrafo final de su escrito, que no fue posible corroborar ni comparar los grupos de cepas obtenidas con la clave diseñada por lo que se hacen necesarios más estudios al respecto.

*Fistulina hepatica* invade los árboles, rama y tocones causando una pudrición parda, si bien la cepa UACH45 presentó actividad celulolítica y las enzimas relacionadas con la degradación de lignina, lo hizo en forma débil como corresponde al comportamiento típico de un hongo de este tipo, para UACH42 no se detectó la actividad celulolítica, presencia de lacasa ni peroxidasa. Esto puede deberse principalmente a que el hongo pudiera estar contaminado y no pudo desarrollarse en forma normal en el medio de cultivo sembrado.

Según Dill & Kraepelin (1986) *Ganoderma applanatum* es un hongo de la putrefacción blanca que causa una delignificación altamente selectiva y extensa. Por esta causa la presencia de lacasa y peroxidasa es una característica común en las cepas estudiadas. Además *G. applanatum* degrada celulosa y utiliza el nitrógeno para llevar a término la degradación total de este compuesto.

La pudrición parda también es causada por *Gloeophyllum trabeum* y es sabido que este hongo, realiza una degradación de ligninocelulosa bastante eficiente donde la presencia de lacasa y peroxidasa, ha sido detectada en múltiples estudios como los de Kawai *et al.* 1995,

D'Sauzo *et al.* 1996, Kerem *et al.* 1999 y Cohen *et al.* 2005. Las cepas ensayadas en el presente estudio no presentaron dichas enzimas, pero si otras de interés ligninolítico, pero no en forma general, es decir, no en todas las cepas ensayadas se detectaron, es así como en UACH1b hubo presencia de esterasa y fosfatasa, no así en UACH3 donde sólo se detectó esterasa, la tirosinasa por su parte fue determinada en UACH1a y UACH1b. Para los hongos que producen putrefacción parda la actividad mas estudiada es la celulolítica, las tres cepas ensayadas no presentaron actividad, esta prueba fue de difícil interpretación en el presente estudio debido a las características miceliales de las cepas, puesto que el hongo desarrolla un micelio sumergido de difícil detección por la coloración del medio utilizado. Por otra parte, *G. trabeum* posee un mecanismo diferente a los procesos de hidrólisis conducidos por las celulasas, es el factor Gt que ha sido aislado de las cepas de esta especie y provoca una depolimerización de la cadena de celulosa. Este proceso es distinto al que realizan las endo-exocelulasas lo que requiere de un método distinto para su detección (Wang & Gao, 2003).

Una de las cepas de *Grifola gargal* la UACH8b durante todos los repiques estaba contaminada, puesto que sus características microscópicas miceliales y enzimáticas variaban notablemente con respecto a UACH8a. Es así como en la cepa que no presentó contaminación (UACH8a), se detectó la actividad de todas las enzimas ligninolíticas, junto con celulilíticas ensayadas, características de un hongo pudridor blanco. Hay que mencionar que para *G. gargal* no se encontraron estudios anteriores que indiquen la capacidad para degradar lignina o celulosa, por lo que los resultados de este estudio son una base para futuras investigaciones.

Como un fiel representante de los hongos de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* presenta actividad peroxidasa, cuya acción se denota por la coloración del medio de cultivo, como de las hifas (Takano *et al.* 2006). El estudio realizado se enfocó solo a

la detección de la actividad de las enzimas de interés lignocelulolítico por medio del cambio de coloración del micelio al agregar un determinado reactivo. Es así como la cepas UACH15 y UACH18, no denotaron la actividad de peroxidasa lo que según estudios recientes puede ser producto de que la actividad de esta enzima logra su óptimo a pH 3,0 y los medios de cultivo fueron preparados a pH 4,8±2, otra causa es que el reactivo utilizado no contenía el suficiente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puesto que a mayor concentración de este mejor se acusa la presencia de la enzima en cuestión (Ferapontova *et al.* 2006 y Yu *et al.* 2006). Si bien no se detectó la presencia de peroxidasa, otras enzimas ligninolíticas como esterasa, fosfatasa y celulolíticas como celulasa, denotan la actividad de este pudridor blanco, que es ampliamente estudiado junto con otras especies por su potencial para degradar tintes industriales y biodegradación de productos contaminantes tal como lo han hecho este último año Chander & Arora (2007) y Potentini & Rodriguez-Malaver (2006) entre otros.

Para *Phlebia lilascens* no se encontró literatura para describir su actividad enzimática, pero el género *Phlebia* es un hongo de pudrición blanca, lo que hace pensar que las cepas estudiadas podrían diferir genéticamente, pues las cepas UACH34a y UACH34b fueron aisladas de un mismo cuerpo fructífero y presentan patrones enzimáticos distintos. Como se mencionó anteriormente no hay datos para comparar los resultados obtenidos, lo que obliga a la realización de estudios posteriores.

En *Phlebiopsis gigantea* la actividad de fosfatasa y principalmente lacasa y peroxidasa no es desigual en ambas cepas. Como se observa en la Tabla 4 la actividad de tirosinasa en UACH65 fue positiva y no fue detectada en UACH67, según Stalpers (1978) los resultados negativos no necesariamente indican ausencia de tirosinasa. Probablemente debido a que la tirosinasa es una endoenzima por lo que su lectura positiva es difícil (Gárnica, 1995), este

mismo juicio se puede utilizar para otras cepas de las especies ensayadas como *Conchomyces bursiformes*, *Gloeophyllum trabeum* y *Stereum hirsutum*.

*Stereum hirsutum* es un hongo que provoca la pudrición blanca y produce lacasa y peroxidasa como parte de su sistema ligninolítico (Mouso *et al.* 2003). El presente trabajo tiene correspondencia con el estudio anterior, puesto que fue detectada la lacasa en casi todas las cepas estudiadas de este hongo, excepto las cepas UACH50 y UACH79, así como peroxidasa en la mayoría de las cepas, Mouse *et al.* (2003) describen que la enzimas ligninolíticas presentan un pH óptimo 5,5 para ser detectadas, y las pruebas realizadas se hicieron a pH  $4,8 \pm 2$ . Stalpers (1978) en su estudio de Aphyllorphorales señala que cuando la reacción de lacasa es positiva todas las combinaciones de esterasa y fosfatasa son posibles. La respuesta a la fuente de nitrógeno fue positiva para casi el 100% de las cepas ensayadas, esto ya había sido probado por Godio *et al.* (2000), cuyos resultados fueron similares a los de las cepas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, que son especies típicas de la pudrición blanca.

En lo que respecta a las cepas miceliales de *Stereum sanguinolentum* sus principales características son similares a *S. hirsutum*, ya sean miceliales como enzimáticas. Es así como se repiten lo postulado por Stalpers (1978) con respecto a las combinaciones de esterasa y fosfatasa cuando lacasa está presente. Como buenos pudridores blancos, en *Stereum* además se presenta actividad celulolítica.

Un hongo que se estudia para ahorrar energía en la fabricación de la pulpa es el basidiomicete de la pudrición blanca *Trametes hirsuta*, cuya capacidad de depolimerizar la lignina ha sido demostrada sin importar la fuente y el origen de la lignina y la pureza de las enzimas (Rittstieg *et al.* 2003, Shleev *et al.* 2006). Es así como las 13 cepas ensayadas de esta



especie reaccionaron positivamente a la lacasa, esterasa y fosfatasa que fueron detectadas en diferentes combinaciones como menciona Stalpers (1978). La celulasa y amilasa también fueron detectadas en todas las cepas, lo que demuestra la capacidad de este hongo para degradar celulosa y utilizar como fuente de carbono y energía el almidón (Gárnica, 1995).

Una especie muy abundante y muy estudiada es *Trametes versicolor*, por su potencial como degradadores de compuestos industriales, decoloración de telas y tintes de maderas entre otras utilidades (Boehmer *et al.* 2006). Fue utilizada como cepa control para determinar las enzimas, excepto la lipasa, puesto que presenta actividad lignocelulolítica ampliamente probada. Es así como la única enzima de interés ligninolítico que no fue detectada en las cepas ensayadas fue tirosinasa, pero como indica Stalpers (1978) su determinación se hace difícil, puesto que es una endoenzima y es necesario aplicar la prueba no solo la zona marginal sino también al micelio aéreo del centro de la colonia. Para la diferencia en la utilización de la urea como fuente de nitrógeno no se encontraron respuestas, lo que deja planteada la problemática para un posterior estudio.

Con respecto a la determinación enzimática se debe destacar que en el presente estudio los resultados obtenidos corresponden al comportamiento fisiológico micelial de los hongos, y que en condiciones ambientales naturales la presencia o ausencia de una enzima determinada puede depender de muchos factores que no han sido considerados en este escrito.

Si bien por medio de este estudio fue posible realizar una determinación enzimática de varios géneros del Orden Aphyllophorales que se desarrollan en Chile, abre un amplio campo para futuras investigaciones más detalladas sobre las características macro-microscópicas y bioquímicas de los micelios de especies pertenecientes a este Orden, pudiendo aumentar su valor taxonómico.

### 5.3 Conclusiones

- Existe similitud de ciertos caracteres microscópicos y enzimáticos en cepas miceliales de Aphylophorales aisladas de diferentes basidiocarpos de una misma especie.
  
- Es posible identificar los Aphylophorales estudiados en base a sus características macro-microscópicas de cultivo y enzimáticas cualitativas, a partir de la fase micelial de las diferentes especies.
  
- Las cepas de una misma taxa del Orden Aphylophorales presentan cualitativamente diferencias enzimáticas para utilizar compuestos como fuente de carbono, energía y nitrógeno.

Con las conclusiones antes citadas se acepta la hipótesis formulada.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- **Adaskaveg J., Gilbertson R. & Blanchette R. 1991.** *Phenillus ralunensis* (Aphylophorales: Hymenochaetaceae), a new white rot species from Chile. *Mycological Research* 95: 761-775.
- **Alexopoulos, C. 1966.** Introducción a la micología. 2ª Edición, Editorial Universitaria, Buenos Aires. 615 pp.
- **Belcarz, A., Ginalska, G. & Kornilowicz-Kowalska, T. 2005.** Extracellular enzyme activities of *Bjerkandera adusta* R59 soil strain, capable of daunomycin and humic acids degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (5): 686-694.
- **Bennett, J. 1998.** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 66 (2-3): 101-107
- **Boehmer, U., Suhardi, S. & Bley, T. 2006.** Decolorizing reactive textile dyes with white-rot fungi by temporary immersion cultivation. *Engineering in Life Sciences* 6 (4): 417-420.
- **Breitenbach, J. & Kränzlin. 1986.** Fungi of Switzerland: Non pilled Fungi. Verlag Mycologia, CH 6000, Luzern 9, Swiezerland.
- **Brock, T., Martinko, J. & Parker, J. 2000.** Brock biology of microorganisms. 9ª Edición. Upper Sadde River. Prentice Hall, 2000. 991pp.

- **Chander, M. & Arora, D. 2007.** Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments* 72 (2): 192-198.
  
- **Cohen, R., Suzuki, M., & Hammel, K. 2005.** Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5): 2412-2417.
  
- **Dill, I. & Kraepelin, G. 1986.** Palo podrido: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Applied Environmental Microbiology* 52 (6): 1305–1312.
  
- **D'Souza, T., Boominathan, K. & Reddy, C. 1996.** Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62 (10): 3739–3744.
  
- **Ferapontova, E., Castillo, J. & Gorton, L. 2006.** Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin-model. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1760 (9): 1343-1354.
  
- **Fu, M. Kong, M. & Han. Y. 2006.** Determination of several substrate-decomposition enzyme activities of *Agrocybe cylindracea* at different stages of development with spectrophotometer. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 26 (3):532-4

- **Gárnica, S. 1995.** Caracterización Morfológica de cepas miceliales de basidiocarpos de Agaricales *sensu lato* lignocelulolíticos. Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- **Godio, R., Mercuri, O. & Forchiassin, F. 2000.** Influence of culture conditions on ligninolytic activity of *Stereum hirsutum*. Revista Argentina de Microbiología 32 (1):7-14.
- **Gutierrez, A. & Martinez, A. 1996.** Mecanismo de biodegradación de la lignina. Revista Iberoamericana de Micología 13: 18-23.
- **Gutierrez, A., del Rio, J.C., Martinez-Inigo, M.J., Martinez, M.J. & Martinez, A.T. 2002.** Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. Applied and Environmental Microbiology 68 (3): 1344-1350.
- **Hankin, L. & Anagnostakis, S. 1975.** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67 (3): 597-607.
- **Higuchi, T. 2004.** Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences 80 (5): 204-214.
- **Hawksworth, D., Kira, P., Sutton, B. & Pegler, D. 1995.** Dictionary of the fungi. CAB International, Cambridge.

- **Kawai, S., Jensen, K., W Bao, Jr. & Hammel, K. 1995.** New polymeric model substrates for the study of microbial ligninolysis. *Applied Environmental Microbiology* 61 (9): 3407–3414.
  
- **Kendrick, B, 1971.** Taxonomy of fungi imperfectil. University of Toronto Press, Canadá. 309 pp
  
- **Kerem, Z., Jensen, K. & Hammel, K. 1999.** Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *Febs Letters* 446 (1): 49-54
  
- **Larrondo, L., Avila, M., Salas, L., Cullen, D. & Vicuña, R. 2003.** Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology UK* 149: 1177-1182.
  
- **Mac Faddin J. 1976.** Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 312 pp.
  
- **Manzano, A., León, T., Argüelles, J., Ramos-Leal, M., China, R., Guerra, G., Casado, G, Sánchez, M. & Gómez, B. 2004.** Hongos de pudredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Revista de Biología* 18 (2).

- **Martínez, O. & Valenzuela, E. 2004.** Aphyllophorales citados para Chile. Boletín Micológico 19: 103-110
- **Moreno, G., García-Manjon, J. & Zugaza, A. 1986.** La guía de INCAFO de los hongos de la Península Ibérica. INCAFO S.A., Madrid. 650 pp
- **Mouso, N., Papinutti, L. & Forchiassin, F. 2003.** Combined effect of copper and initial pH of the culture on production of laccase and manganese peroxidase by *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. Revista Iberoamericana de Micología 20 (4):176-8.
- **Mtui, G. & Nakamura, Y. 2002.** Continuous production of lignin-degrading enzymes by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam. Biotechnology Letters 24 (21): 1743-1747.
- **Nobles, M. 1948.** Studies in forest pathology. VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. Canadian Journal Research, Sect. C, 26: 281-431.
- **Nobles, M. 1958.** Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Poliporacea. Canadian Journal Botanic 36: 883-926.
- **Nobles, M. 1965.** Identification of cultures of wood-inhibiting hymenomycetes. Canadian Journal Botanic 43: 1097-1139.

- **Papinutti V., Diorio L. & Forchiassin F. 2003.** Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas lignocelulolíticas en aserrín de álamo y cedro. Revista Iberoamericana de Micología 20: 16-20.
  
- **Pochon, J. & Tardieux, P. 1965.** Técnicas de análisis en microbiología del suelo. Editorial T.E.I.(Técnica e Investigación),Burgos.116 pp
  
- **Potentini, M. & Rodriguez-Malaver, A. 2006.** Vinasse biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Environmental Biology 27 (4): 661-665.
  
- **Reid, I. 1995.** Biodegradation of lignin. Canadian Journal Botanic 73 (suppl.1) 1011-1018.
  
- **Rittstiegl, K., Suurnakki, A., Suortti, T., Kruus, K., Guebitz, G. & Buchert, J. 2003.** Polymerization of guaiacol and a phenolic beta-O-4-substructure by *Trametes hirsuta* laccase in the presence of ABTS. Biotechnology Programs 19 (5):1505-9.
  
- **Sato, A., Watanabe, Y., Nugroho, N.B., Chrisnayanti, E., Natusion, U.J., Koesnandar & Nishida, H. 2003.** Screening for dioxin-degrading basidiomycetes from temperate and tropical forests. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19 (7): 763-766.
  
- **Schlegel, H. 1997.** Microbiología General. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 654 pp



- **Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T. & Gorton, L. 2006.** Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (4): 841-847.
  
- **Staplers, J. 1978.** Identification of wood-inhabiting Aphylophorales in pure culture. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
  
- **Takano, M., Abe, H. & Hayashi, N. 2006.** Extracellular peroxidase activity at the hyphal tips of the white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *Journal of Wood Science* 52 (5): 429-435.
  
- **Tello, M., Corsini, G., Larrondo, L., Salas, L., Lobos, S. & Vicuña, R. 2000.** Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochemistry Biophysics Acta* 1490: 137-144.
  
- **Urcelay, C. & Robledo, G. 2004.** Community structure of polypores (Basidiomycota) in Andean alder wood in Argentina: Functional groups among wood-decay fungi? *Austral Ecology* 29 (4): 471-476.
  
- **Valenzuela, E. 2003.** Guía de pasos prácticos MICR 105-112. Instituto Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
  
- **Valenzuela, E. 2003\*.** Hongos comestibles silvestres colectados en la X Región de Chile. *Boletín Micológico* 18:1-14

- **Valenzuela, R, Palacios-Pacheco, M, Raymundo, T. y Bautista-Hernández, S. 2006.** Especies de poliporáceos poco conocidas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 35-49.
  
- **Vinogradova, S. & Kushnir, S. 2003.** Biosynthesis of hydrolytic enzymes during cocultivation of macro and micromycetes. *Prikl Biokhim Mikrobiology* 39 (6):652-5
  
- **Wang, W. & Gao, P. 2003.** Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. *Journal Biotechnology* 101 (2):119-30.
  
- **Xiao, Y., Chen, Q., Hang, J. & Shi, Y. 2004.** Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes sp.* AH28-2. *Mycologia* 96 (1): 26-35.
  
- **Yu, G., Wen, X., Li, R. & Qian, Y. 2006.** In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 41 (9): 1987-1993.

**ANEXOS**

**ANEXO 1****1.1- Constitución de soluciones para medir enzimas directamente sobre el micelio.**

a) Solución A para medir citocromo-oxidasa:

|  |        |
|--|--------|
| -Tetrametil-p-fenildiamina dihidrógeno clorhídrico | 0,02g. |
| -Acido ascórbico (15ppm)                           | 10mL.  |

b) Solución B para medir esterasa:

Partes iguales de:

- Naftíl acetato acuoso al 1%
- Solución acetona Fast red I.T.R. al 1%

c) Solución C para medir fosfatasa:

Partes iguales de:

- Sal ácida de naftíl fosfato monosódica acuosa al 1%
- Solución Fast red I.T.R. al 1%

d) Solución D para medir lacasa:

- 1-naftol 0.1M
- Etanol 96%

e) Solución E para medir lacasa:

-Guaiacol 0.1M

-Etanol 96%

f) Solución F para medir peroxidasa:

Partes iguales de:

-Peroxido de hidrógeno al 0.4%

-Pirogalol al 1%

g) Solución G para medir tirosinasa:

-p-cresol 0.1M

-Etanol 96%

## 1.2- Constitución de medios de cultivo.

a) Medio Agar Extracto Malta al 2% (AEM al 2%).

Agar-agar 20 g

Extracto de Malta 20 g

Agua destilada 1000 mL

Se ajustará el pH a 4.8 antes de esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

**b) Medio Celulosa.**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Agar-agar                       | 20 g    |
| Celulosa                        | 20 g    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 0.1 g   |
| Agua destilada                  | 1000 mL |

El medio se esterilizará en autoclave a 121°C por 20 minutos.

**c) Medio Almidón.**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Agar-agar                       | 20 g    |
| Almidón                         | 20 g    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 0.1 g   |
| Agua destilada                  | 1000 mL |

El medio se esterilizará en autoclave a 121°C por 20 minutos.

**d) Medio para detectar enzima lipasa.**

|  |        |
|--|--------|
| Agar-agar                              | 20 g   |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 0.01 g |

NaCl 5 g

Peptona 10 g

Se ajustará el pH a 6 antes de esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

El Tween 80 se esteriliza por separado en autoclave a 100 °C por 15 minutos y se agregan asepticamente 0.25mL de Tween 80 por 100 mL de medio a 45°C antes de distribuir en las placas Petri.

e) Medio Gelatina.

Extracto de carne 3 g

Gelatina 120 g

Peptona 5 g

Agua destilada 1000 mL

Se agrega la gelatina al agua destilada y se deja reposar por un periodo de 15 a 30 minutos, luego se calienta a 50°C hasta que se licue la gelatina, adicionando la peptona y el extracto de carne. Se vuelve a calentar a 50°C para disolver completamente. Se ajusta el pH a 6.8-7.9. Posteriormente se reparte en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave a 121°C por 20 minutos.

f) Medio Urea

Solución A:

Agar-agar 20 g

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2 g                             |
| NaCl                            | 5 g                             |
| Peptona                         | 1 g                             |
| Agua destilada                  | 900 mL                          |
| Rojo fenol (1:500)              | 6 mL (0.02 g más 10 mL de agua) |

Solución B:

|                |         |
|----------------|---------|
| Glucosa        | 1 g     |
| Urea           | 20 g    |
| Agua destilada | 1000 mL |

Se filtra por filtro Seitz. Posteriormente se mezclan asépticamente las soluciones y la mezcla obtenida se reparte en los tubos de ensayo y se dejan inclinados hasta que solidifique el medio de cultivo.

**g)** Medio Agar Extracto de Malta adicionado de Acido Tánico.

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Acido Tánico      | 5 g     |
| Agar- agar        | 20 g    |
| Extracto de malta | 15 g    |
| Agua destilada    | 1000 mL |



El extracto de malta y el agar se disuelven en 850 mL de agua destilada y se procede a esterilizar en el autoclave a 121°C por 20 minutos. Los 150 mL de agua destilada que restan son esterilizados en forma separada en las mismas condiciones físicas señaladas anteriormente. Estando el agua esterilizada aun caliente se añade el ácido tánico agitando para que se disuelva completamente. Esta solución se adiciona al extracto y el agar a 45° C, se homogeniza agitando en forma vigorosa y posteriormente se dispensa tubos de ensayo.

### **1.3 Constitución líquido de montaje.**

#### **a) Lactofenol.**

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Fenol (cristales puros) | 20 g  |
| Acido Lactico           | 20 g  |
| Glicerol                | 40 g  |
| H <sub>2</sub> O        | 20 mL |

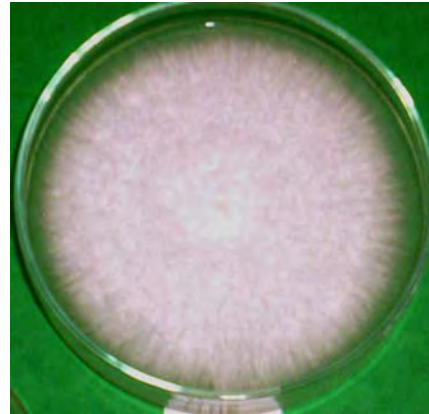
Solución al 1% de azul de algodón.

## ANEXO 2

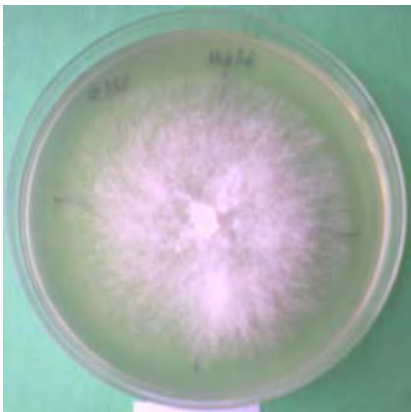
## 2.1 Masificación de micelio en placas con AEM al 2%



**Figura 2** *Bjerkandera adusta*  
(UACH20)



**Figura 4** *Fistulina hepatica*  
(UACH45)



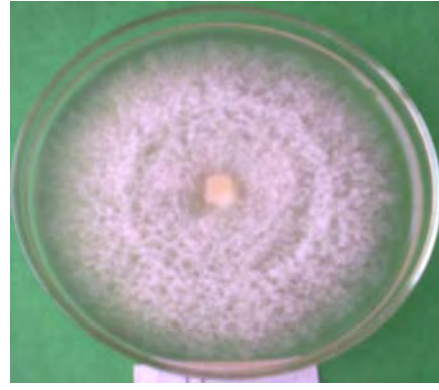
**Figura 3** *Conchomyces bursiformes*  
(UACH64)



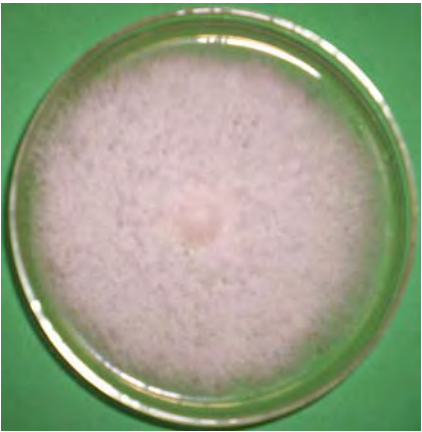
**Figura 5** *Ganoderma applanatum*  
(UACH83d)



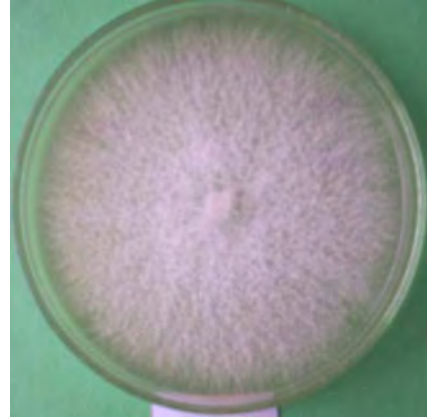
**Figura 6** *Gloeophyllum trabeum*  
(UACH3)



**Figura 9** *Stereum hirsutum* (UACH72)



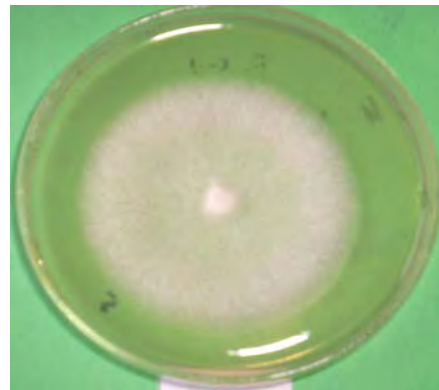
**Figura 7** *Grifola gargar* (UACH8a)



**Figura 10** *Trametes hirsuta*  
(UACH54)



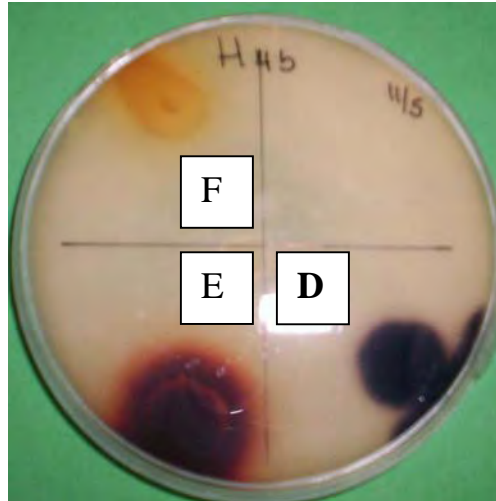
**Figura 8** *Phlebiopsis gigantea*  
(UACH65)



**Figura 11** *Trametes versicolor*  
(UACH4a)

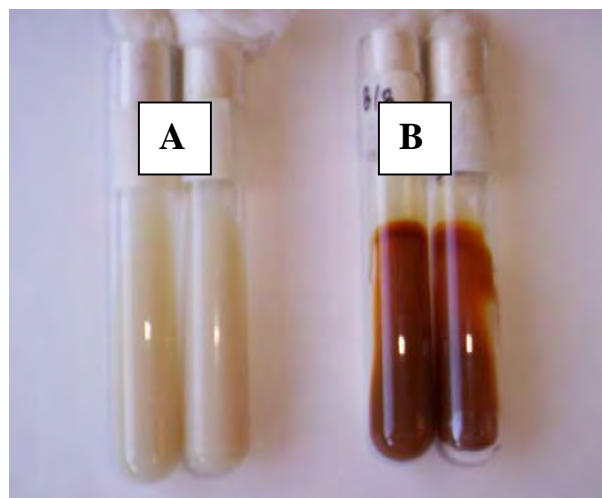
## 2.2 Reacciones enzimáticas

### 2.2.1 Detección cualitativa directa sobre el micelio

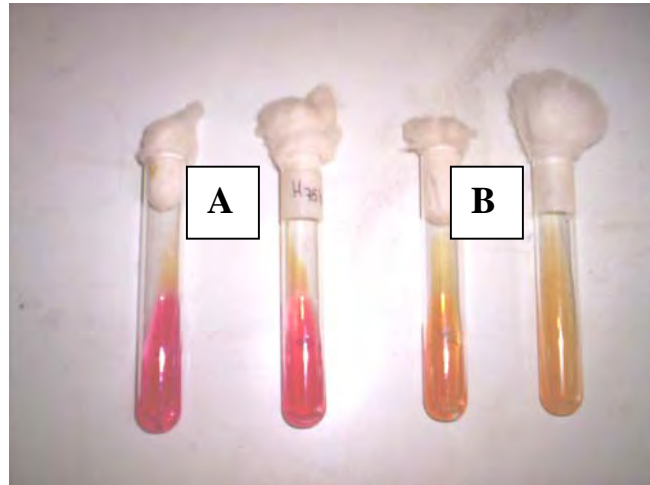


**Figura 12** Detección de algunas enzimas de interés lignocelulolítico. *Trametes versicolor* (UACH4b), **D**: Lacasa-naftol (+), **E**: Lacasa-guaiacol(+), **F**: Peroxidasa (+)

### 2.2.2 Detección Cualitativa de enzimas en medios selectivos.



**Figura 13** Detección actividad enzima oxidasa-extracelular; **A**: reacción (-), **B**: reacción (+)



**Foto 13:** Detección de enzima ureasa en medio de cultivo selectivo. A: reacción (+), B: reacción (-)

**Tabla 6:** Distribución porcentual y numérica de cepas miceliales de Aphylophorales según presencia de las enzimas detectadas.

| <b>Enzimas</b>       | <b>Cepas positivas (%)</b> | <b>Cepas positivas (n°)</b> |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Citocromo-oxidasa    | 84,85                      | 56                          |
| Esterasa             | 84,85                      | 56                          |
| Fosfatasa            | 75,76                      | 50                          |
| Lacasa (naftol)      | 83,33                      | 55                          |
| Lacasa (guaiacol)    | 78,79                      | 52                          |
| Peroxidasa           | 68,18                      | 45                          |
| Tirosinasa           | 10,61                      | 7                           |
| Amilasa              | 90,91                      | 60                          |
| Celulasa             | 92,42                      | 61                          |
| Lipasa               | 4,55                       | 3                           |
| Oxidasa-extracelular | 84,85                      | 56                          |
| Proteasa             | 68,18                      | 45                          |
| Ureasa               | 65,15                      | 43                          |