

57
220



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE MUTANTES ACELULOLOITICAS DE Pleurotus ostreatus

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

ASESOR: DR. HERMILO LEAL LARA

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Páginas
RESUMEN.	
1 INTRODUCCION.	1
2 MATERIALES Y METODOS.	7
2.1 LAS CEPAS Y SU CONSERVACION.	7
2.2 METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACION DE CAPACIDAD CELULOLITICA.	8
2.2.1 PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA POR EL METODO DE WALSETH Y SU TINCION.	8
2.2.2 CONSUMO DE CELULOSA TERIDA EN MEDIO LIQUIDO.	9
2.2.3 CONSUMO DE PAPEL FILTRO EN MEDIO SOLIDO.	11
3 RESULTADOS.	13
3.1 CORRELACION ENTRE LA CELULOLISIS Y LA LIBERACION DE COLOR EN MEDIO LIQUIDO CON CELULOSA TERIDA.	13
3.2 EVALUACION DE LA CAPACIDAD CELULOLITICA DE MUTANTES ACELULOLITICAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> EN MEDIO LIQUIDO CON CELULOSA COMO FUENTE DE CARBONO.	13
3.2.1 EVALUACION EN MEDIO DE SALES.	13
3.2.2 EVALUACION EN MEDIO DE SALES MINERALES SUPLEMENTADO CON PEPTONA.	16
3.3 EVALUACION DE LA CAPACIDAD CELULOLITICA DE MUTANTES DE <i>Pleurotus ostreatus</i> EN MEDIO SOLIDO SUPLEMENTADO CON PEPTONA Y PAPEL FILTRO COMO FUENTE DE CARBONO.	17
4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.	23
5 BLIBLIOGRAFIA CITADA.	28
6 ANEXOS.	29

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto fue desarrollar métodos alternativos para evaluar el consumo de celulosa por mutantes de *P. ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. Se modificó la metodología de Ander y Eriksson (1978) para emplearla en un medio líquido, tificando la celulosa con azul brillante de remazol y se suspendió en un medio mínimo de sales minerales con el fin de disminuir eventuales interferencias. Al ser consumida la celulosa este colorante es liberado al medio y al cuantificar la cantidad de color liberado es posible conocer el consumo de celulosa por cada cepa. Con esta metodología se logró clasificar las mutantes de acuerdo a su capacidad para desdoblar la celulosa. De las 32 cepas evaluadas (Tabla 3.1, Exp. v Res.), 11 cepas no liberaron colorante al medio, por ello se clasificaron como acelulolíticas totales, 5 cepas presentaron poco crecimiento y degradaron menos del 10% de celulosa, 8 cepas degradaron de 30 a 50% y el resto crecieron muy bien y degradaron por arriba del 50% de celulosa.

Otra alternativa consistió en evaluar las cepas en un medio de agar-peptona y papel filtro como fuente de carbono. 6 cepas presentaron menor crecimiento sobre papel que en agar peptona, clasificándose como acelulolíticas; el resto de las cepas presentó un comportamiento variable. Esta técnica permite evaluar más rápidamente, pero únicamente en forma cualitativa.

El comportamiento fue distinto en ambas metodologías, sin embargo, es indispensable utilizar la metodología en medio líquido para evaluaciones cuantitativas.

1 INTRODUCCION

Las industrias agrícolas y forestales producen anualmente considerables cantidades de residuos lignocelulósicos. Dichos materiales están constituidos principalmente de celulosa (33-38%), hemicelulosa (27-32%) y lignina (17-19%). Algunos de estos desechos se utilizan como alimento para ruminantes, pero su aprovechamiento nutricional se ve limitado por la presencia de lignina, la cual impide el acceso de enzimas hidrolíticas a la celulosa y hemicelulosa (Ellis B. and T. Kent, 1976).

La lignina es un componente estructural de la planta que le confiere rigidez y resistencia a la tensión mecánica, así como, al ataque microbiano. Es un polímero aromático constituido de unidades de fenil-propano, de naturaleza amorfa e insoluble en agua y difícil de ser atacado por vía microbiana (Conferencia sobre Microbiología Pecuaria, 1989).

Existen diversos procesos de delignificación para obtener una mejora en la disponibilidad de nutrientes. Por medio de estos procesos se pretende tratar los residuos lignocelulósicos forestales y agrícolas para mejorar su digestibilidad y usarlos en la alimentación de ruminantes o bien en la obtención de materias primas para uso industrial, como por ejemplo para la producción de alcohol, solventes orgánicos o la fabricación de papel (Simposium Latinoamericano de Biotecnología, 1987).

Los procesos disponibles de delignificación son de tres tipos, físicos, químicos y biológicos. Dentro de los de tipo

físico se encuentran los tratamientos térmicos, las moliendas y la exposición a rayos X, entre otros. Los métodos químicos son los más usados, la mayoría de ellos emplean soluciones alcalinas como amoníaco, NaOH, NH_4OH y urea (Han Y. W. and Callihan, C. D., 1974). También existen tratamientos con ácidos como el H_2SO_4 y HCl principalmente. Últimamente se han probado otros compuestos, en particular los de naturaleza altamente oxidante, como el ozono (O_3) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Desafortunadamente los procesos químicos resultan ser muy costosos debido a la infraestructura requerida y a la gran cantidad de agua necesaria para el lavado del material tratado, con el objeto de eliminar al máximo los residuos tóxicos que dejan estos tratamientos (Simposium Latinoamericano de Biotecnología, 1987).

Otro tipo de procesos de delignificación que se han estudiado es por medio de la acción microbiana. Estos procesos hacen uso de los mecanismos enzimáticos utilizados por los microorganismos que degradan la lignocelulosa (Crawford R., 1981). Desafortunadamente existen muy pocos organismos con esta capacidad. Dentro de las bacterias, la acción delignificante es incierta, aunque en estudios de Odier y Monties, (1978) se aislaron bacterias de género *Pseudomona* que pueden degradar hasta el 50% de lignina. Por otro lado, a pesar de que la acción delignificante dentro de las levaduras no se ha demostrado, Iwahara, (1981) ha aislado levaduras capaces de crecer sobre dímeros de fenil-propano.

En la naturaleza, existen mecanismos eficientes para la

modificación y degradación de la lignina. A pesar de que la degradación de la lignina es el resultado de la acción de una mezcla de microorganismos, sin lugar a dudas los hongos han sido los más estudiados en este contexto. De acuerdo a su capacidad para atacar a la lignocelulosa, éstos se han clasificado en "hongos de la pudrición blanda", "hongos de la pudrición oscura" y "hongos de la pudrición blanca" (T. Kent Kirk, T. Higuchi and H. Chang, 1981).

Los "hongos de la pudrición blanda" como ciertas especies de *Chaetomium* son capaces de degradar la lignina, causando una pequeña alteración en su molécula. Los hongos imperfectos como algunos *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* pueden crecer sobre dimeros de fenil-propano, pero no está comprobada su capacidad para degradar lignina, habiéndose observado que sólo deshidrogenan polímeros produciendo erosiones en la madera (T. Kent Kirk, T. Higuchi and H. Chang, 1981).

Dentro de los "hongos de la pudrición oscura" se encuentran varios Basidiomicetos como *Lentinus lepideus*, *Lenzites sepiaria* entre otros, pero este tipos de hongos en general sólo causan ligeras alteraciones en la molécula de la lignina.

Los hongos capaces de degradar lignina dejan la celulosa visible (que es blanca) al consumir la lignina, por lo que se les conoce como "hongos de la pudrición blanca". Dentro de este tipo de hongos, los Basidiomicetos son sin lugar a dudas los más eficientes en relación a su capacidad delignificante. Especies del género *Pleurotus* ofrecen muchas posibilidades para

delignificar los desechos agrícolas y producir un alimento con alto contenido proteico. La especie más conocida de este género es *Pleurotus ostreatus*, el cual crece sobre árboles muertos y es capaz de degradar tanto lignina como celulosa. Sus esporóforos son comestibles y de gran importancia económica. Por ello este hongo ha sido estudiado desde varios aspectos, como su ciclo de vida, los mecanismos que sigue en la degradación de lignina, así como la obtención de mutantes selectivas para degradar lignina (Crawfort, 1981).

En el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química UNAM el hongo *Pleurotus ostreatus* ha sido utilizado para la obtención de mutantes acelulolíticas mejoradas (Ramírez 1989). En estas investigaciones se han observado dificultades en los métodos de detección de cepas acelulolíticas (C-), así como en la evaluación del consumo de la celulosa.

El presente trabajo está enmarcado dentro de un proyecto en donde se pretenden obtener cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Cepas con tales características podrán ser utilizadas para el aprovechamiento integral de los desperdicios agrícolas. Es decir permitirán producir hongos comestibles para el consumo humano y sustrato delignificado para la alimentación de rumiantes.

Con el objeto de producir una degradación selectiva de la lignina se han desarrollado mutantes acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. La falta de un método confiable y sencillo para evaluar la capacidad celulolítica es uno de los obstáculos

encontrados en el manejo de este tipo de cepas.

La metodología seguida hasta la fecha, para identificar a las cepas acelulolíticas, ha consistido en propagar vegetativamente el micelio en un medio sólido de agar celulosa (Ander y Eriksson, 1978). Las cepas celulolíticas aclaran este medio conforme se presenta crecimiento vegetativo, el cual permanece opaco con las cepas acelulolíticas debido a la falta de degradación de la celulosa que causa esta opacidad. Desafortunadamente este método es de carácter cualitativo y no permite realizar una prueba cuantitativa del carácter celulolítico.

Por lo anterior en el presente trabajo se planteó como objetivo, desarrollar una metodología que permitiera evaluar el consumo de celulosa de una manera rápida y eficiente. Se presentaban varias alternativas para lograr éste objetivo, una consistía en medir el consumo de celulosa por medio de una cuantificación directa en este caso de los polisacáridos presentes (David Sternberg, 1976).

Se pensó que el carácter acelulolítico (C-) podría ser evaluado cuantitativamente cambiando el método de identificación de la celulólisis por una posible correlación entre la liberación de un color fijado a la molécula de celulosa y el consumo de la misma.

Al utilizar celulosa teñida con un colorante es posible suponer que cuando ésta es consumida por el hongo, el color

fijado en la celulosa es liberado. En la literatura se encuentra reportado que es posible teñir la celulosa del papel utilizando azul brillante de remazo (Poincelot y Day, 1972).

La estructura química y física de la celulosa se caracteriza por ser altamente insoluble en agua, esta propiedad disminuye la escasa accesibilidad que presenta esta molécula al ataque microbiano y que eventualmente puede dificultar su tinción. Walseth (1952) desarrolló una metodología para el tratamiento de celulosa microcristalina y con ello obtener celulosa soluble.

II MATERIALES Y METODOS

2.1 LAS CEPAS Y SU CONSERVACION.

Las cepas H1 y H4 corresponden a los componentes monocarióticos de la cepa 8 x 3 de *Pleurotus ostreatus*, (es decir al ser apareados ambos monocariotes se obtiene la cepa dicariótica 8 x 3), seleccionada como una cepa degradadora de lignina. De las cepas H1 y H4 se produjeron las mutantes acelulolíticas (C-) que se encuentran enlistadas a continuación. La clave asignada esta compuesta por el número de colonia aislada como posible mutante, la letra y número siguientes corresponden al monocariote utilizado en cada experimento (H1 o H4) y la letra y número final corresponden al número de experimento de mutación. Todas estas cepas fueron producidas por el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química y fueron facilitadas para este trabajo (Ramírez C., 1989).

H1	18H1N5	13H1N11	70H1N13	H4
1H1	80H1N1	14H1N11	78H1N13	9H4N2
8H1N1	6H1N9	18H1N11	79H1N13	2H4N8
23H1N1	14H1N9	14H1N13	80H1N13	2H4N16
56H1N1	20H1N9	30H1N13		33H4N10
61H1N1	22H1N9	36H1N13		37H4N10
64H1N1	26H1N9	37H1N13		40H4N10

Las cepas fueron conservadas por resiembras periódicas en un medio de agar extracto de malta deproteinado (DPMA). Para la preparación del medio, se pesaron 20 g de extracto de malta, disolviéndose en 250 ml de agua destilada. El pH de esta solución fue elevado 1.5 unidades con NaOH y se añadió 1.4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Finalmente la solución fue esterilizada durante

20 minutos a 121°C para después filtrarla y eliminar así las proteínas, con lo cual se obtiene un medio con baja concentración de nitrógeno.

Para preparar 500 ml de medio se mezclaron 75 ml de filtrado en 425 ml de agua destilada y 7.6 g de agar, el medio se dejó reposar durante 15 minutos y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

El medio fue inoculado tomando un fragmento de agar con micelio del perímetro de una colonia en crecimiento. En condiciones estériles el fragmento fue colocado en el centro de la caja con medio recién preparado. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 25°C hasta que el micelio cubrió la superficie. Después de esto las cepas fueron empacadas dentro de bolsas de polietileno, selladas perfectamente y almacenadas en refrigeración para los experimentos posteriores.

2.2 METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACION DE CAPACIDAD CELULOLITICA.

2.2.1 PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA POR EL METODO DE WALSETH Y SU TINCION.

Para preparar celulosa por el método de Walseth (1952), 4 g de celulosa microcristalina (Baker No. 1529) fueron colocados en el congelador durante 1 h, enfriándose al mismo tiempo 51 ml de ácido fosfórico. En baño de hielo se mezclaron gradualmente cantidades pequeñas de celulosa y ácido fosfórico de tal forma que se obtuviera una masa homogénea libre de grumos. La mezcla se

colocó en el refrigerador durante 2 h para después licuarla con 300 ml de agua destilada y filtrarla al vacío. La celulosa fue desprendida con una espátula, repitiendo dos veces más la homogeneización con 300 ml de agua y posterior filtración. Después del último lavado, la celulosa se colocó en 500 ml de una solución de carbonato de sodio al 1% y se dejó durante 12 h. A continuación se lavó nuevamente de la misma forma (homogeneizando y filtrando) hasta que el pH del agua fuera neutro.

La técnica seguida para la tinción de la celulosa fue una modificación de la utilizada por Poincelot y Day (1972) para determinar actividades enzimáticas utilizando papel filtro como sustrato. Para teñir la celulosa, 0.5 g de azul brillante de remazol se disolvieron en 83 ml de agua destilada a temperatura de ebullición. Esta mezcla se adicionó a la celulosa tratada por el método de Walseth, se licuó durante 2 minutos y se vació en un vaso de precipitados de 500 ml que se mantuvo en ebullición y con agitación. Cada 2 minutos se adicionaron 6 ml de una solución de Na_2SO_4 (10 g en 33 ml de agua a 92°C) hasta agotar el volumen. Inmediatamente después se adicionaron 5 ml de una solución de Na_3PO_4 al 10%. La celulosa junto con el colorante y los fijadores se dejó en agitación durante 10 minutos. Finalmente la celulosa teñida se lavó hasta que el agua de lavado fuera incolora.

2.2.2 CONSUMO DE CELULOSA TEÑIDA EN MEDIO LIQUIDO.

Para evaluar la celulólisis en medio líquido con celulosa teñida se debe correlacionar el color liberado con el consumo de

celulosa. Por ello para efectuar una evaluación cuantitativa es indispensable conocer la cantidad de color retenido por gramo de celulosa seca.

Para explorar esta posibilidad se requería como primer paso encontrar un rango de medición con una correlación lineal entre la concentración del colorante y la densidad óptica (D.O) de la solución de colorante. Haciendo una serie de diluciones de colorante desde 0.01 hasta 0.1 mg/ml. La cantidad de color retenido por unidad de peso de celulosa se calculó determinando el color no fijado en las aguas de lavado.

Para esta prueba el medio consistió de una mezcla de sales minerales y celulosa teñida con azul brillante de remazol. Este medio se utilizó sólo o bien suplementado con peptona al 1%. Por cada litro de medio se utilizaron las siguientes sales en las cantidades indicadas.

SALES	CANTIDAD
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
KH_2PO_4	0.8 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
Citrato ferrico amoniacal	5.0 mg
CaCl_2	20.0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.89 g

De acuerdo al volumen de medio a preparar, se pesaron las cantidades necesarias de sales, disolviéndose una a una en el orden en que están enlistadas. Las dos últimas se disolvieron por separado e integraron a la primera solución. Finalmente se ajusta

el volumen total del medio con agua destilada.

El medio de celulosa teñida se preparó añadiendo 10 g de celulosa teñida por cada litro de solución de sales. Esta solución se licuó durante 5 minutos y se vaciaron alicuotas de 50 ml en matraces de 250 ml. Los matraces fueron esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

Para la inoculación del medio se empleó el micelio proveniente de colonias de 5-6 días de crecimiento. De su periferia se cortaron 30 cilindros de 5 mm de diámetro y se homogeneizaron con 100 ml de agua destilada estéril durante 1 minuto en un homogeneizador (Waring blender de 250 ml). Cada matraz con medio de celulosa fue inoculado con 5 ml de esta suspensión e incubados en una estufa con agitación a 25°C y 250 rpm durante 20 días.

A partir del quinto día de incubación se tomaron muestras de 5 ml en condiciones estériles. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga Solbat a 3000 rpm durante 15 minutos para precipitar el micelio, midiendo al sobrenadante su absorbancia a 595 nm. Las mediciones se realizaron utilizando un Fotocolorímetro Spectronic 20 con una resolución de 0.01 frente a un blanco de agua o de peptona dependiendo del medio utilizado.

2.2.3 CONSUMO DE PAPEL FILTRO EN MEDIO SOLIDO.

El carácter (C-) pudo haber sido influenciado por el contenido de nutrientes en el medio como son el nitrógeno algún tipo de vitaminas o bien de precursores de crecimiento, que pudieron impedir el ataque a la celulosa. Se consideró entonces necesario corroborar el comportamiento encontrado usando un medio con mayor disponibilidad de nutrientes.

Para esta prueba se utilizó un medio de agar-peptona sobre el cual se colocaron cuadros de papel filtro 595 para comparar el crecimiento sobre el medio de agar-peptona con y sin papel filtro.

Para preparar el medio de agar-peptona se pesaron 14 g de agar y 1 g de peptona por cada 1000 ml de agua destilada, el cual fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos, vaciándose en cajas de Petri estériles. Sobre la mitad del área de la caja con medio ya solidificado, se colocaron equidistantemente dos cuadros de papel filtro No. 595 de 5 mm de lado. Para inocular las cajas se cortaron 4 cilindros de 5 mm de diámetro de la periferia de colonias de 5-6 días de crecimiento. Dos de ellos se colocaron sobre cada cuadro de papel filtro, los dos restantes se colocaron paralelamente a los anteriores sobre la otra mitad del medio de agar-peptona que no contenía los cuadros de papel. Las cajas se incubaron a 25°C durante 20 días.

La evaluación se realizó a los 7, 10, 14 y 20 días de incubación. Se comparó el crecimiento miceliar en ambos lados

del medio, sobre el papel y sobre el medio directamente, observándose la abundancia del crecimiento. Cuando las cepas presentaron mejor crecimiento sobre el papel que sobre el medio de agar-peptona se consideraron como cepas celulolíticas.

3 RESULTADOS

3.1 CORRELACION ENTRE LA CELULOLISIS Y LA LIBERACION DE COLOR EN UN MEDIO LIQUIDO CON CELULOSA TERIDA.

Haciendo una serie de diluciones de colorante desde 0.01 hasta 0.1 mg/ml, se obtuvo una curva patrón con un coeficiente de correlación de 0.98 y una D.O. máxima de 1.2 de absorbancia, concentraciones más altas fueron imposibles de leer (Fig. 3.1).

La cantidad de color retenido por unidad de peso de celulosa se obtuvo a partir de la diferencia entre la cantidad de color adicionado al inicio de la tinción y el colorante no fijado en las aguas de lavado. Se determinó así que cada gramo de celulosa retiene 80 mg de azul brillante de remazol.

3.2 EVALUACION DE CAPACIDAD CELULOLITICA DE MUTANTES ACELULOLITICAS DE *Pleurotus ostreatus* EN MEDIO LIQUIDO CON CELULOSA TERIDA COMO FUENTE DE CARBONO.

3.2.1. EVALUACION CON MEDIO DE SALES.

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 3.1. El comportamiento de las cepas permitió definir cuatro grandes grupos respecto al consumo de celulosa. El primero de ellos lo conforman 11 cepas que al final del tiempo de incubación se comportaron como acelulolíticas totales (incapacidad para degradar celulosa). Estas cepas son: 56H1N1 (Anexo 5), 80H1N3 (Anexo 9), 18H1N5 (Anexo 10), 20H1N9 (Anexo 13), 14H1N11 (Anexo 17), 37H1N13 (Anexo 22), 79H1N13 (Anexo 16), 9H4N2 (Anexo 29),

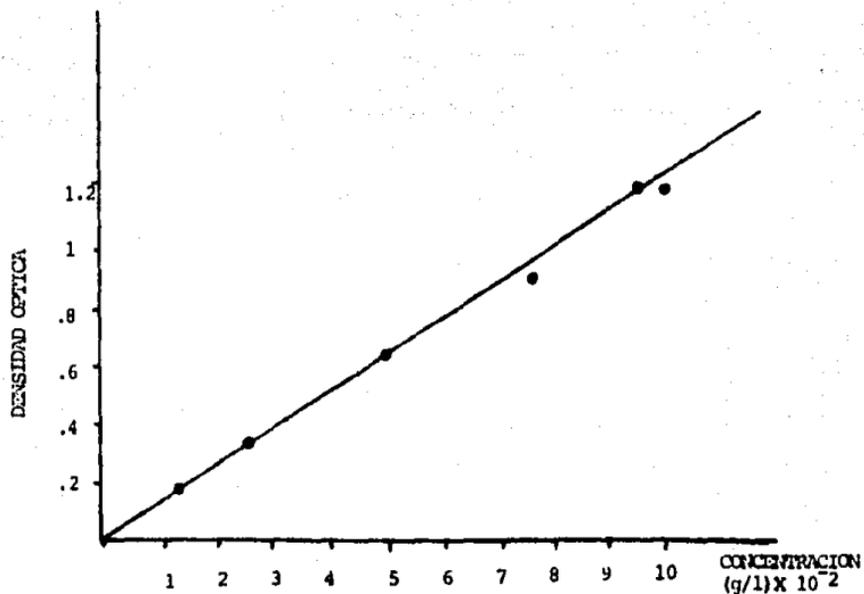


Fig. 3.1. Correlación entre la densidad óptica a 595 nm y la concentración de azul brillante de remazol

TABLA 3.1: CONSUMO DE CELULOSA POR CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*.

C E P A S	CONSUMO DE CELULOSA (%)		
	TIEMPO DE INCUBACION (días)		
	5	10	20
56 H1N1	0.0	0.0	0.0
80 H1N3	0.0	0.0	0.0
18 H1N5	0.0	0.0	0.0
20 H1N9	0.0	0.0	0.0
14 H1N11	0.0	0.0	0.0
37 H1N13	0.6	0.0	0.0
79 H1N13	0.0	0.0	0.0
9 H4N2	0.0	0.0	0.0
33 H4N10	0.0	0.0	0.0
40 H4N10	0.0	0.0	0.0
2 H4N16	0.0	0.0	0.0
1 H1	0.6	0.6	1.8
6 H1N3	0.9	1.25	0.6
6 H1N9	0.0	0.6	0.6
22 H1N9	0.0	0.6	0.6
37 H4N10	0.0	0.0	6.2
H1	0.0	38.1	20.0
23 H1N1	0.0	0.0	43.7
61 H1N1	N.D.	3.7	45.0
64 H1N1	0.6	28.7	42.5
26 H1N9	N.D.	18.7	36.2
13 H1N11	6.2	11.2	42.5
45 H1N13	N.D.	0.0	30.0
78 H1N13	N.D.	0.6	41.2
H4	21.2	42.5	43.7
8 H1N1	0.0	14.4	63.7
14 H1N9	38.7	53.7	60.0
18 H1N11	19.4	67.4	70.0
14 H1N13	0.0	36.2	61.7
30 H1N13	0.0	0.0	63.7
36 H1N13	0.0	27.7	51.2
70 H1N13	1.3	26.2	53.7
81 H1N13	1.3	56.2	96.2
2 H4N8	26.2	32.5	61.2

33H4N10 (Anexo 31), 40H4N10 (Anexo 32) y 2H4N16 (Anexo 34). El segundo grupo está representado por 5 cepas que degradaron menos del 10% de celulosa por lo que también fueron consideradas como 6H1N3 (Anexo 8), 6H1N9 (Anexo 11), 22H1N9 (Anexo 14) y 37H4N10 (Anexo 32).

Las cepas H1 (Anexo 1), 23H1N1 (Anexo 4), 61H1N1 (Anexo 6), 64H1N1 (Anexo 7), 26H1N9 (Anexo 15), 13H1N11 (Anexo 16), 45H1N13 (Anexo 23), 78H1N13 (Anexo 25) y la cepa H4 conforman el tercer grupo (Anexo 28) degradaron entre el 30% y 50% de la celulosa, clasificándose como celulolíticas.

El cuarto grupo esta representado por 8 cepas que degradaron por arriba del 50% de celulosa y estas son 8H1N1 (Anexo 3), 14H1N9 (Anexo 12), 18H1N11 (Anexo 18), 14H1N13 (Anexo 19), 30H1N13 (Anexo 20), 36H1N13 (Anexo 21), 70 H1N13 (Anexo 24), 2H4N8 (Anexo 30) Dentro de estas la única que degradó casi la totalidad de la celulosa (96.2%) fue la cepa 81H1N13 (Anexo 27).

3.2.2 EVALUACION EN MEDIO DE SALES MINERALES SUPLEMENTADO CON PEPTONA.

En el experimento anterior se encontraron cepas acelulolíticas y ligeramente celulolíticas. Se decidió hacer la siguiente prueba en medio suplementado para corroborar el carácter de algunas de las cepas que se comportaron como acelulolíticas totales en el experimento anterior.

Para este experimento se utilizarón las cepas: 56H1N1 (Anexo 35), 80H1N3 (Anexo 36), 18H1N5 (Anexo 37), 37H1N13 (Anexo 38),

2H4N16 (Anexo 39). La metodología empleada fue idéntica al experimento anterior, utilizando un medio de sales con celulosa teñida y peptona al 1% como suplemento (Secc 2.2.2).

Bajo estas condiciones se observó que las cepas en el experimento anterior como acelulolíticas totales fueron ahora capaces de consumir celulosa (Tab. 3.2). A excepción de la cepa 2H4N16 que mostró una degradación reducida (28.7%), el resto mejoró sensiblemente su capacidad degradadora (por arriba del 60%).

Esta mejora en la capacidad celulolítica sugiere que el comportamiento observado en el experimento inicial con medio líquido estuvo influenciado posiblemente por una deficiencia de nutrientes en el medio.

3.3 EVALUACION DE LA CAPACIDAD CELULOLITICA DE MUTANTES DE *Pleurotus ostreatus* EN MEDIO SOLIDO SUPLEMENTADO CON PEPTONA Y PAPEL FILTRO COMO FUENTE DE CARBONO.

Se evaluaron todas las cepas utilizadas en el experimento inicial. Se comparó el crecimiento miceliar observandose directamente sobre el medio de agar-peptona con respecto a la sección del medio con los fragmentos de papel, formandose los 5 grupos siguientes de acuerdo al crecimiento sobre el papel (Tab. 3.3).

crecimiento muy débil	=1
crecimiento débil	=2
crecimiento moderado	=3
buen crecimiento	=4
crecimiento abundante	=5

TABLA 3.2: CONSUMO DE CELULOSA EN MEDIO LIQUIDO SUPLEMENTADO CON PEPTONA (0.1%) POR CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* A LOS 20 DIAS DE INCUBACION.

C E P A S	CONSUMO DE CELULOSA	
	mg	(%)
56 H1N1	110.6	73.7
80 H1N3	148.1	98.7
18 H1N5	110.6	73.7
37 H1N13	95.6	63.7
2 H4N16	43.1	28.7

TABLA 3.3: CRECIMIENTO COMPARATIVO EN MEDIO DE AGAR PEPTONA (Pe) Y PAPEL FILTRO (Pa) COMO FUENTE DE CARBONO POR MUTANTES DE *Pleurotus ostreatus*.

CEPAS	TIEMPO DE INCUBACION (días)							
	7		10		14		20	
	Pe	Pa	Pe	Pa	Pe	Pa	Pe	Pa
H1	2	2	2	2	2	2	2	2
1 H1	2	2	2	2	2	2	2	2
8 H1N1	2	2	2	2	2	2	3	2
56 H1N1	2	3	2	3	2	3	2	3
61 H1N1	2	2	2	2	2	2	2	2
64 H1N1	2	3	2	3	2	3	2	3
6 H1N3	2	2	2	2	3	2	3	2
80 H1N3	1	1	2	2	2	2	2	2
18 H1N5	3	3	3	3	3	3	4	3
14 H1N9	1	2	1	2	1	2	1	2
20 H1N9	2	2	2	2	2	2	2	2
22 H1N9	2	2	2	2	2	2	2	2
26 H1N9	3	2	3	2	3	2	3	2
13 H1N11	2	2	2	3	2	3	2	3
14 H1N11	2	2	2	2	2	2	2	2
18 H1N11	3	4	3	4	3	4	3	4
14 H1N13	2	2	2	3	2	3	2	3
30 H1N13	2	2	2	3	2	3	2	3
36 H1N13	2	2	2	3	2	3	2	3
37 H1N13	2	2	2	2	2	3	2	3
45 H1N13	2	2	2	3	2	3	2	3
70 H1N13	2	2	3	2	3	2	3	2
78 H1N13	2	2	2	3	2	3	2	3
79 H1N13	2	2	2	2	2	4	2	4
81 H1N13	2	2	2	2	2	2	2	2

H4	3	4	4	5	4	5	4	5
9 H4N2	1	1	1	1	1	1	1	1
2 H4N8	2	2	2	2	2	2	2	2
33 H4N10	3	2	3	2	3	2	3	2
37 H4N10	3	4	3	4	3	4	3	4
40 H4N10	2	2	2	2	2	2	2	2

Nota: Pe = crecimiento en medio de peptonas
Pa = crecimiento en papel

El crecimiento muy débil (1) se observó en la cepa 9H4N2 cuyas hifas se desarrollaron muy tenues tanto en la sección con papel como en el medio de peptona. Un crecimiento débil (2) presentaron las cepas H1, 1H1, 8H1N1, 61H1N1, 6H1N3, 14H1N9, 20H1N9, 22H1N9, 26H1N9, 14H1N11, 30H1N13, 70H1N13, 2H4N8, 33H4N10, y 40H4N10. En estas cepas el crecimiento sobre el papel se apreció a simple vista aunque las hifas no cubrían por completo el papel. El crecimiento moderado (3) se caracterizó por un micelio que crecía con apariencia algodonosa sobre el papel que era cubierto por completo: las cepas 23H1N1, 56H1N1, 64H1N1, 80H1N13, 18H1N5, 13H1N11, 14H1N13, 36H1N13, 37H1N13, 45H1N13, 78H1N13 y 81H1N13 presentaron estas características. Buen crecimiento (4) presentaron las cepas 18H1N11, 37H4N10 y 79H1N13 caracterizado por un micelio aglomerado sobre el papel pero que no revasó los perímetros de éste, formando así una colonia algodonosa bien definida. Sólo la cepa H4 presentó un crecimiento abundante (5) sobre el papel, formando una colonia algodonosa que llegó hacer contacto con la tapa de la caja aunque sin revasar el perímetro del papel. Las cepas que presentaron un mejor crecimiento sobre el papel que sobre el medio de agar-peptona, fueron clasificadas como celulolíticas.

Con los resultados obtenidos se observó que las mutantes procedentes de H4 fueron por lo general más débiles en su crecimiento que el control, tanto en peptona-papel como en peptona (Tab. 3.4), a excepción de la cepa 33H4N10 que presentó mejor crecimiento en peptona papel (Tab. 3.4).

De las mutantes procedentes de H1 se observó que el control tuvo un crecimiento débil tanto en peptona-papel así como en peptona, las cepas 8H1N1, 18H1N5, 14H1N9, 20H1N9, y 30H1N13 presentaron un mejor crecimiento sobre peptona-papel y en términos generales un buen desarrollo miceliar. Las demás cepas tuvieron un comportamiento muy variado; aunque algunas presentaron crecimiento débil sobre peptona-papel, el crecimiento en peptona fue generalmente mucho mejor (Tab. 3.4).

TABLA 3.4: CLASIFICACION DE MUTANTES ACELULOLITICAS DE *P. ostreatus* DE ACUERDO A SU CRECIMIENTO SOBRE PAPEL Y PEPTONA A LOS 20 DIAS DE INCUBACION.

CRECIMIENTO VEGETATIVO				
1	2	3	4	5
9 H4N2	H1	23 H1N1	18 H1N11	H4
	1 H1	56 H1N1	79 H1N13	
	8 H1N1*	64 H1N1	37 H4N10	
	61 H1N1	80 H1N3		
	6 H1N3	18 H1N5*		
	14 H1N9*	13 H1N11		
	20 H1N9*	14 H1N13		
	22 H1N9	36 H1N13		
	26 H1N9	37 H1N13		
	14 H1N11	45 H1N13		
	30 H1N13*	78 H1N13		
	70 H1N13	81 H1N13		
	2 H4N8			
	33 H4N10*			
	40 H4N10			

* Cepas con menor crecimiento sobre papel que en el medio de agar peptona (cepas aceluloliticas).

4 DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Con el presente trabajo se pretendia obtener un método para evaluar de manera cuantitativa el consumo de celulosa. De esta forma seria posible caracterizar diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, obtenidas previamente por mutación para seleccionar aquellas capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Hasta la fecha dicha caracterización únicamente se habia realizado con métodos cualitativos como el desarrollado por Eriksson, (1978). Sin embargo el nuevo método desarrollado no pretende descartar la selección cualitativa ya que ésta puede ser útil para una primera evaluación que será confirmada posteriormente en forma cuantitativa. Una metodologia de este tipo nos permitiría caracterizar cepas que pudieran ser utilizadas para un aprovechamiento integral de los desperdicios agrícolas. Es decir además de contar con la producción de hongos comestibles para el consumo humano y el sustrato delignificado serviría para la alimentación de rumiantes.

En el primer experimento el porcentaje de cepas que degradaron menos del 10% incluyendo aquellas que no crecieron fue del 50% aproximadamente. Se consideró entonces conveniente descartar la posibilidad de que estos resultados fueran provocados por la ausencia de nutrientes en el medio de sales. Por ello en el siguiente experimento el medio de sales minerales fue suplementado con peptona al 1% para disponer de una fuente de nitrógeno en el medio. Se observó que la mayoría de las cepas que previamente se habian clasificado como acelulolíticas, su

comportamiento en el medio suplementado se torno celulolítico. Así la baja degradación de celulosa y el escaso crecimiento posiblemente fue ocasionado por el bajo nivel de nutrientes o bien por la ausencia de algún precursor de crecimiento.

Al comparar el crecimiento en medio sólido a los 7 días con los 10 y 14 días de incubación no se observaron cambios en su comportamiento. Es recomendable por lo tanto que las lecturas se efectuen a los 14 días de incubación, a pesar de que a los 7 días el comportamiento de la mayoría de las cepas ya esta establecido, pero conviene dar un margen de tiempo para definir el comportamiento de la mayoría de las cepas. Al observar el comportamiento de las cepas testigo H1 y H4 se observó que la cepa H4 presentó mayor crecimiento sobre papel, mientras que el crecimiento de la cepa H1 fue igual en ambos lados de la caja (Tab. 3.3, Exp. y Res). Este resultado permitió clasificar a la cepa H4 como celulolítica (C+) y a la H1 con carácter acelulolítico débil (C-). De las 25 mutantes de tipo H1, 13 cepas se caracterizaron como (C-) y 12 como (C+). De las cepas acelulolíticas 5 inclusive presentaron menor crecimiento miceliar sobre papel. De las 5 mutantes de tipo H4, 4 se comportaron como (C-) y únicamente la cepa 33H4N10 presentó menor crecimiento en papel.

Al comparar los resultados obtenidos en medio líquido con respecto al medio sólido se observó que las cepas controles se comportaron igual en ambos experimentos. La cepa H1 presentó menor crecimiento sobre el medio de agar peptona y papel como fuente de carbono, así como una baja capacidad para consumir

celulosa en medio líquido. En tanto que la cepa H4 presentó mejor crecimiento en medio sólido y al mismo tiempo una buena capacidad para degradar la celulosa del medio líquido.

Cabe mencionar que una buena degradación de celulosa en medio líquido no necesariamente debe estar relacionada con un buen crecimiento vegetativo en el medio de papel filtro, ya que la celulosa empleada en los dos métodos de evaluación es diferente, el papel filtro consiste de α -celulosa y medio líquido contiene celulosa microcristalina. Es posible por ello que no se presente una correlación en el consumo de celulosa entre ambos experimentos. Sin embargo, es de esperarse que las cepas que presenten acelulólisis total en medio líquido y un crecimiento muy débil en medio de papel, sean aquellas con carácter acelulolítico más marcado. Dentro de las cepas evaluadas, la cepa 9H4N2 fue la única que presentó este comportamiento.

De las cepas que degradaron menos del 10% de celulosa en medio líquido, solamente la cepa 37H4N10 presentó buen crecimiento en medio sólido, el resto de las cepas presentaron crecimiento de débil a moderado.

Del grupo de cepas que en medio líquido degradaron entre 30-50% de celulosa, las cepas 61H1N1 y 26H1N9 presentaron un crecimiento débil en medio sólido.

Dentro de las cepas que degradaron por arriba del 50% de celulosa en medio líquido, 4 cepas presentaron crecimiento débil en medio sólido (8H1N1, 14H1N9, 30H1N13 y 2H4N8). Dichas cepas

con excepción de la 2H4N8 presentaron menor crecimiento en papel. Cabe señalar que la cepa 81H1N13 en medio líquido consumió casi la totalidad de la celulosa (96.2%), mientras que en medio sólido se clasificó como (C-).

Dado estos resultados, es difícil establecer una correlación entre ambas evaluaciones, debido principalmente a las diferentes fuentes de celulosa. Para hidrolizar la α -celulosa y la celulosa microcristalina se requieren probablemente de complejos enzimáticos diferentes. Por ello es posible que dichos complejos enzimáticos hayan sido alterados de diferente forma debido a la acción del agente mutagénico utilizado para la obtención de las cepas, originando como resultado diferentes capacidades para consumir las dos fuentes de carbono utilizadas para la evaluación del carácter (C-).

Para estudios posteriores de determinación del carácter acelulolítico, se recomienda utilizar las dos pruebas de manera secuencial. Es decir es conveniente utilizar primero la prueba en medio sólido con papel. Para descartar al grueso de las cepas de tipo (C+). A continuación, se utiliza el medio líquido con celulosa teñida y suplementada con alguna fuente de nitrógeno para determinar diferencias cuantitativas entre las cepas. Es recomendable evaluar el patrón de consumo de los componentes de la lignocelulosa natural por las cepas seleccionadas después de estas dos pruebas. Para ello deberían utilizarse sustratos preparados con algún desperdicio lignocelulósico.

Las cepas que presentaron acelulólisis en ambos métodos de

evaluación corresponden a la 20 H1N9. 33 H4N10, 18 H1N5 y 9 H4N2 por ello se pueden considerar como las cepas con mayor capacidad (C-). Sin embargo se considera conveniente conservar el resto de las cepas que presentaron cierta incapacidad para consumir algún tipo de celulosa para realizar estudios posteriores de mejoramiento genético.

El método desarrollado para evaluar el consumo de celulosa representa para el proyecto una alternativa que servirá para caracterizar las cepas disponibles obtenidas por mutación así como para evaluaciones posteriores de cepas obtenidas a través de un mejoramiento genético.

4 BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ander, P. and K. Eriksson. 1978. Lignin Degradation and Utilization by Microorganisms. Progress in Industrial Microbiology. 14. 1- 58. M.J. Bull (Ed) Elsevier, Nueva York.
- Crawford, R.. 1981. Lignin biodegradation and transformation. Wiley Interscience Publication New York Chichester, Toronto.
- Ellis, B. and T. Kent. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates enzymatic conversion processes. Biotechnol & Bioeng Symp. No.6. 95-123.
- Han Y. W. and Callihan C. D.. 1974. Cellulose fermentation. Effect of substrate pretreatment on microbial growth. Appl. Microbiol. 27(1). 159 - 165.
- Iwahara, S.. 1981 Microbial Degradation DHP. In: LIGNIN; BIODEGRADATION, CHEMISTRY, AND POTENTIAL APPLICATIONS. Vol I. 152 -169. CRC PRESS, Florida.
- T. Kent Kirk, Takayoshi Higuchi, and Hou-min Chang. 1981. Lignin Biodegradation: summary and perspectives. In: LIGNIN BIODEGRADATION; MICROBIOLOGY, CHEMISTRY, AND POTENTIAL APPLICATIONS. Vol II pp.235-243 CRC PRESS. Florida.
- de Biomasa y Tratamiento de Desperdicios. 1987. Antigua Guatemala 18 - 20 de Febrero.
- Odiar E. and Monties B.. 1978 Biodegradation of Wheat Lignin for Xantomonas. Ann Microbiol. (Institut Pasteur) 129 A. 361 - 377.
- Poicelot R. and P. Day. 1972. Simple Dye Release assay for determining cellulolytic activity of fungus. Appl. Microbiol. 25 (5). 875 - 879.
- Primer Ciclo de Conferencias sobre Microbiología Pecuaria. 1989. Universidad Autonoma de Chapingo. 22 al 24 de febrero.
- Ramirez C. R.. 1989 Producción y Caracterización de Cepas de Pleurotus ostreatus Capaces de Producir una Degradación Selectiva de la Lignocelulosa. Tesis de Maestria en Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomedicas UNAM.
- Sternberg D.. 1976. B-Glucosidase of Trichoderma. Its Biosynthesis and Role in Saccharification of cellulose. Appl. Enviro. Microbiol. 31(5). 648 - 654.
- Walseth C. 1952. Occurrence of cellulases in enzyme preparation from microorganisms. TAPPI 35 (5). 228-233.

5 ANEXOS

ANEXO 1: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA H1 EN MEDIO LIQUIDO
CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
6	6.7	4.4
7	50.0	33.1
10	57.2	38.1
11	61.9	41.2
12	62.8	41.8
17	62.8	41.8
20	62.8	41.8

ANEXO 2: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 1H1 EN MEDIO LIQUIDO
CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	1.0	0.6
11	1.0	0.6
12	1.0	0.6
14	2.8	1.8
17	2.8	1.8
18	2.8	1.8
20	2.8	1.8

ANEXO 3: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 8H1N1 EN MEDIO LIQUIDO
CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	1.8	1.3
10	29.0	19.4
11	52.5	35.0
13	84.4	56.2
17	93.8	62.4
19	95.6	63.7
20	95.6	63.7

ANEXO 4: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 23H1N1 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TIENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	CONSUMO DE CELULOSA (%)
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0
13	0.0	0.0
14	1.9	1.2
17	31.9	21.3
20	65.6	43.7

ANEXO 5: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 56H1N1 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
5 a 20	0.0	0.0

ANEXO 6: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 61H1N1 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TEÑIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
11	5.6	3.7
13	15.0	10.0
14	15.0	10.0
19	39.4	26.2
20	67.5	45.0

ANEXO 7: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 54H1N1 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	(%)
5	1.0	0.6
6	30.0	20.0
7	56.3	37.5
10	43.1	28.7
11	41.3	27.5
13	54.4	36.2
17	56.3	37.5
19	61.9	41.2
20	63.8	42.5

ANEXO 8: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 6H1N3 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	0.0	0.0
11	2.0	1.2
13	0.0	0.0
14	0.0	0.0
17	1.0	0.6
18	1.0	0.6
19	1.0	0.6
20	1.0	0.6

ANEXO 9: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA BOH1N3 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TEÑIDA.

TIEMPO DE INCUBACION
(días)

CONSUMO DE CELULOSA
(mg) (%)

5 a 20

0.0

0.0

ANEXO 10: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 18H1N5 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TEÑIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
5 a 20	0.0	0.0

ANEXO 11: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 6H1N9 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
10	1.0	0.6
11	1.0	0.6
12	0.0	0.0
17	0.0	0.0
20	1.0	0.6

ANEXO 12: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 14H1N9 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	58.1	38.7
7	69.4	46.2
11	80.6	53.7
13	78.8	52.5
14	78.8	52.5
19	88.3	58.7
20	90.0	60.0

ANEXO 13: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 20H1N9 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
5 a 20	0.0	0.0

ANEXO 14: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 22H1N9 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TEÑIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
10	1.0	0.6
11	1.0	0.6
12	1.0	0.6
17	1.0	0.6
20	1.0	0.6

ANEXO 15: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 26H1N9 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	CONSUMO DE CELULOSA (%)
10	28.3	18.7
11	39.4	26.2
12	46.0	31.2
17	52.5	35.0
18	54.4	36.2
19	54.4	36.2
20	54.4	36.2

ANEXO 16: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 13H1N11 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	9.4	6.2
7	1.9	1.3
10	16.9	11.2
11	18.8	12.5
12	24.4	16.2
17	56.4	36.2
20	63.8	42.5

ANEXO 17: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 14H1N11 EN MEDIO LÍQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	0.0	0.0
7	1.0	0.6
10	0.0	0.0
11	1.0	0.6
13	0.0	0.0
14	0.0	0.0
17	0.0	0.0
18	0.0	0.0
19	1.0	0.6
20	0.0	0.0

ANEXO 18: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 18H1N11 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	30.0	19.4
11	101.3	67.4
12	103.1	68.7
14	110.7	73.7
17	105.0	70.0
18	112.5	75.0
19	112.5	75.0
20	105.0	70.0

ANEXO 19: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEP4 14H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
6	18.8	12.5
7	31.9	21.2
8	43.1	28.7
9	54.4	36.2
13	88.1	58.7
14	88.1	58.7
17	91.9	61.2
20	91.9	61.2

ANEXO 20: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 30H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0
13	3.8	2.5
14	11.3	7.5
17	26.3	17.5
20	95.6	63.7

ANEXO 21: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 36H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TEÑIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
6	1.0	0.6
7	5.6	3.7
8	15.0	10.0
9	35.6	27.7
13	73.1	48.7
14	73.1	48.7
17	76.9	51.2
20	76.9	51.2

ANEXO 22: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 37H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	(%)
6	1.0	0.6
7	0.0	0.0
10	0.0	0.0
11	1.0	0.6
13	0.0	0.0
19	0.0	0.0
20	0.0	0.0

ANEXO 23: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 45H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
10	0.0	0.0
11	1.0	0.6
12	2.0	1.2
17	37.5	25.0
18	41.3	28.7
19	43.1	28.7
20	45.0	30.0

ANEXO 24: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 70H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	2.0	1.3
11	38.4	26.2
12	48.8	32.5
14	61.9	41.2
17	69.4	46.2
18	75.0	50.0
19	76.9	51.2
20	80.6	53.7

ANEXO 25: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 78H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
10	1.0	0.6
11	5.6	3.7
12	17.0	11.2
17	54.4	36.2
18	62.0	42.2
19	62.0	42.2
20	62.0	42.2

ANEXO 26: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 79H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
6 a 20	0.0	0.0

ANEXO 27: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 81H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	1.9	1.3
7	5.6	3.7
8	11.3	7.5
11	84.4	56.2
13	135.0	90.0
14	133.1	88.6
19	140.6	93.7
20	144.4	96.2

ANEXO 28: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA H4 EN MEDIO LIQUIDO
CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	CONSUMO DE CELULOSA (%)
6	32.0	21.2
7	45.0	30.0
10	63.8	42.5
11	65.6	43.7
12	65.6	43.7
17	65.6	43.7
20	65.6	43.7

ANEXO 29: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 9H4N2 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5 a 20	0.0	0.0

ANEXO 30: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 2H4N6 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
6	39.4	26.2
7	48.8	32.5
8	48.8	32.5
9	48.8	32.5
10	90.0	60.0
14	62.0	61.2
17	62.0	61.2
20	62.0	61.2

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 31: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 33H4N10 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION
(días)

CONSUMO DE CELULOSA
(mg) (%)

6 a 20

0.0

0.0

ANEXO 32: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 37H4N10 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg)	CONSUMO DE CELULOSA (%)
6	0.0	0.0
7	1.0	0.6
10	0.0	0.0
11	1.0	0.6
13	1.0	0.6
14	2.0	1.3
17	5.6	3.7
18	7.5	5.0
19	7.5	5.0
20	9.4	6.2

ANEXO 33: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 40H4N10 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
6 a 20	0.0	0.0

ANEXO 34: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 2H4NB EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA (mg) (%)	
6 a 20	0.0	0.0

ANEXO 35: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 56H1N1 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES SUPLEMENTADAS CON PEPTONA Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	41.2	27.5
9	95.6	63.7
19	110.6	73.7
20	110.6	73.7

ANEXO 36: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 18H1NS EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES SUPLEMENTADAS CON PEPTONA Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	41.2	27.5
9	95.6	63.7
19	110.6	73.7
20	110.6	73.7

ANEXO 37: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 80H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES SUPLEMENTADAS CON PEPTONA Y 150 g DE CELULOSA TENIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (días)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	0.0	0.0
9	148.1	98.7
19	148.1	98.7
20	148.1	98.7

ANEXO 38: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 37H1N13 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES SUPLEMENTADAS CON PEPTONA Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	106.0	70.5
9	118.1	78.6
19	100.3	66.8
20	95.6	63.7

ANEXO 39: CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA 2H4N16 EN MEDIO LIQUIDO CON SALES MINERALES SUPLEMENTADAS CON PEPTONA Y 150 g DE CELULOSA TERIDA.

TIEMPO DE INCUBACION (dias)	CONSUMO DE CELULOSA	
	(mg)	(%)
5	8.4	5.6
9	20.6	13.7
19	45.0	30.0
20	43.1	28.7