

14  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

DESARROLLO DE UN METODO PARA  
CUANTIFICAR EL CONSUMO DE CELULOSA POR  
CEPAS (C-) DE Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.)  
Kummer.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
MARIA GUADALUPE CAMACHO SANCHEZ



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO PARA LA REVISIÓN DEL TRABAJO DE TESIS**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>M en C. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO</b>
<b>VOCAL</b>	<b>M en B. REBECA RAMÍREZ CARRILLO</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>BIÓL. IRENE FRUTIS MOLINA</b>
<b>1o. SUPLENTE</b>	<b>BIÓL. J. GERARDO ORTÍZ MONTIEL</b>
<b>2o. SUPLENTE</b>	<b>BIÓL. ROCÍO VARGAS MARTÍNEZ</b>

**DIRECTORES DE TESIS: M en B. REBECA RAMÍREZ CARRILLO  
Y Dr. HERMILO LEAL LARA.**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.**

**SUSTENTANTE:  
MARÍA GUADALUPE CAMACHO SÁNCHEZ**

**AGRADECIMIENTOS.**

A LA M. en B. REBECA RAMÍREZ CARRILLO  
Y AL DOCTOR HERMILO LEAL LARA  
POR TODO EL APOYO QUE ME  
BRINDARON DURANTE LA REALIZACIÓN  
DE ESTE TRABAJO.

ASIMISMO AGRADEZCO A LOS MIEMBROS  
DEL JURADO POR LA REVISIÓN CRÍTICA  
QUE HICIERON DE ESTE TRABAJO.

**DEDICATORIA**

A REBE RAMÍREZ C.  
GRACIAS.

A JUANITA PASTRANA GUZMAN, TANIA JIMÉNEZ  
NAJÉRA Y MINERVA MORA CABRERA.

DEDICATORIA

A MIS PAPAS

M. GUADALUPE Y REYES

A MIS HERMANOS

SALVADOR, MIGUEL Y DEYES

A FRANCISCO SÁNCHEZ BERNAL

A LA MEMORIA DE MAMATO

PORQUE SIEMPRE ESTARÁN EN MIS PENSAMIENTOS Y MI CORAZÓN,  
A TODOS USTEDES.  
LOS QUIERE.

**RÍO DE LOBOS.**

## ÍNDICE

RESUMEN	Pág.
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 ALTERNATIVAS DE APROVECHAMIENTO PARA LOS DESPERDICIOS	2
1.1.1 DESECHOS ANIMALES	3
1.1.2 DESECHOS VEGETALES	3
1.2 ESTRUCTURA FÍSICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS DESPERDICIOS VEGETALES	4
1.3 MÉTODOS PARA LA DELIGNIFICACIÓN DE LOS DESPERDICIOS LIGNOCELULÓSICOS.	9
1.4 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE <i>Pleurotus ostreatus</i> .	10
1.5 ESTUDIOS REALIZADOS CON <i>Pleurotus ostreatus</i> .	14
1.6 SISTEMA CELULOLÍTICO FUNGI.	14
1.7 OBJETIVO	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 CEPAS FUNGICAS	17
2.2 MEDIOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.	18
2.2.1 MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA AGAR	18
2.2.1.1 INOCULACIÓN DEL MEDIO	18
2.2.2 MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA DEPROTEINADO (DPMA)	18
2.2.3 MEDIO DE SALES MINERALES (PRIMERA CAPA)	19
2.2.4 PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA POR EL MÉTODO WALSETH (CELULOSA MICROCRISTALINA Y CARBOXIMETIL CELULOSA)	20
2.2.4.1 CELULOSA SUSPENDIDA EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE SODIO	20
2.2.4.2 CELULOSA SUSPENDIDA EN PEPTONA AL 0.05 Y 0.1% Y AGUA DESTILADA.	20
2.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> . EN PLACAS DE CRISTAL.	21
2.3.1 PREPARACIÓN DE PLACAS DE 5X5 cm CON CELULOSA TRATADA POR EL MÉTODO WALSETH	21
2.3.1.1 TINCIÓN DE LA CELULOSA	21
2.3.1.2 EVALUACIÓN DE HALOS CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <i>Trichoderma sp</i>	21

2.3.2	PREPARACIÓN DE PLACAS Y SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AGAR Y CELULOSA	22
2.3.2.1	EVALUACIÓN DE HALOS CON 3 CONCENTRACIONES DE LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <i>Trichoderma</i> sp. Y SELECCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN	22
2.3.3	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> , EN UNIDADES DE ENZIMA, EN LA PLACA DE 17X17 cm.	22
2.3.4	EVALUACIÓN DE 5 CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, UNA DE DPMA Y UNA DE TIAMINA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> , EN CAJAS PETRI.	23
2.3.4.1	EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> , EN UN MEDIO DE 2 CAPAS, EN CAJAS PETRI	23
2.3.5	EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA 8X3	23
2.3.5.1	SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL	25
2.3.5.2	RESIEMBRA DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> EN EL MEDIO SELECCIONADO	26
2.3.5.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/l) DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> , EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL	26
2.3.5.3.1	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/l) DE LAS CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i> , EN CAJAS PETRI CON CELOFÁN	27
2.3.6	MONTAJE DE LA CURVA PATRÓN CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <i>Aspergillus niger</i>	27

<b>III. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>		
3.1	EVALUACIÓN DE HALOS CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <b>Trichoderma sp.</b> PARA LA SELECCIÓN DEL COLORANTE Y LA CELULOSA	28
3.2	EVALUACIÓN DE HALOS CON 3 CONCENTRACIONES DE LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <b>Trichoderma sp.</b> PARA LA SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AGAR, CELULOSA MICROCRISTALINA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN	28
3.3	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> . EN UNIDADES DE ENZIMA, EN LA PLACA	28
3.4	EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> Y SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, DPMA, Y TIAMINA	29
3.4.1	EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> . EN UN MEDIO DE 2 CAPAS	29
3.5	EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA Bx3	29
3.5.1	SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL	30
3.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/I) DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> . EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL	30
3.6.1	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/I) DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> . EN CAJAS PETRI CON CELOFÁN	31
3.7	MONTAJE DE LA CURVA PATRÓN CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE <b>Aspergillus niger</b>	31
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
4.1	SELECCIÓN DEL COLORANTE Y LA CELULOSA	32
4.2	SELECCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DE LAS CONCENTRACIONES DE CELULOSA Y AGAR BACTERIOLÓGICO	34
4.3	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA, EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b>	38



---

4.4	EVALUACIÓN DE 5 CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, UNA DE DPMA Y UNA DE TIAMINA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b>	39
4.4.1	EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> , EN UN MEDIO DE 2 CAPAS, EN CAJAS PETRI	39
4.5	EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA	39
4.5.1	SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL	44
4.6.1	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL	48
4.6.2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE <b>Pleurotus ostreatus</b> , EN CAJAS PETRI CON PAPEL CELOFÁN	49
V.	CONCLUSIONES	50
	RECOMENDACIONES	52
VI.	REFERENCIAS	53

## RESUMEN

**Pleurotus ostreatus** (Jacq. ex Fr.) Kummer, es un hongo comestible con el cual se puede lograr una delignificación selectiva de los desperdicios lignocelulósicos, obteniendo cepas capaces de crecer en estos subproductos utilizando primordialmente la lignina y dejando como material remanente un sustrato celulósico apto para la alimentación de rumiantes. Para ello se han producido mutantes aceluolíticas, las cuales ya han sido mejoradas genéticamente. Las cepas seleccionadas deben presentar una baja degradación de celulosa (aceluolíticas) y uno de los principales problemas ha sido encontrar un método cuantitativo que permita evaluar en forma precisa y rápida el consumo de este polisacárido. Para evaluar la capacidad celuloítica de las cepas de **Pleurotus ostreatus**, en forma cuantitativa se modificó la metodología de Aguilar G. (1991); donde la medición de la actividad celuloítica se realizó por medio de la formación de un halo en cajas petri y placas de cristal, con 0.12 cm de espesor de celulosa - agar. Para esto fue necesario probar 85 medios diferentes, que permitieron encontrar las condiciones óptimas. De los 85 medios evaluados, 50 favorecieron el desarrollo vegetativo y en los 35 restantes no se observó. El medio quedó constituido con agar bacteriológico al 1.5%, celulosa microcristalina disuelta en agua destilada al 0.3%, DPMA al 1% y deoxicolato de sodio al 0.04%, con un tiempo de incubación de 11 días. El medio elaborado en placas de cristal es una buena alternativa para evaluar distintas cepas, pero presenta la desventaja de contaminación por mohos y bacterias. El halo fue observado solamente en cajas petri. La curva patrón se realizó con diferentes concentraciones de la enzima **Aspergillus niger**, con un coeficiente de correlación de 0.996. Las 23 cepas evaluadas en el medio seleccionado desarrollaron micelio. Ninguna de las cepas previamente clasificada como celuloítica, así como las 2 cepas control (Mo. 24 y Mo. 36) formó halo, probablemente porque el desarrollo del micelio no permitió que se observará. La técnica montada permitió evaluar la capacidad celuloítica de las cepas en unidades de enzima.

## **I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

## 1.1 ALTERNATIVAS DE APROVECHAMIENTO PARA LOS DESPERDICIOS.

Uno de los principales problemas que México presenta, es el incremento de desechos sólidos orgánicos e inorgánicos: que se originan tanto en los núcleos domésticos (residuos urbanos) como en zonas agroindustriales y forestales (Madinaveitia et al., 1980, Cruz et al., 1980, Fernández y Valenzuela, 1980, Martínez et al., 1984 y Mata y Martínez, 1988).

Entre los usos técnicamente factibles que se han destinado a este tipo de residuos tenemos

- **Incineración** Este proceso es rápido permite reducir en forma muy considerable el volumen de los desechos, genera energía calorífica, desprende gases de la combustión y existe una destrucción total de la molécula polimérica
- **Relleno sanitario** Los desechos son vertidos en terrenos baldíos donde luego son cubiertos con tierra  
Tanto la incineración como el relleno sanitario, causan a la larga efectos nocivos al medio
- **Pirólisis** Es un proceso endotérmico que se lleva a cabo calentando a altas temperaturas (350 a 1100 °C) y en ausencia o con poco oxígeno, materiales orgánicos como: madera, papel, plástico, desechos celulósicos, los cuales experimentan rompimiento en su estructura química, resultando gases como CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, aceites y líquidos orgánicos como acetona y metanol, así como carbón (Escobar y Muramatsu, 1992 y Cisneros, 1984)

Un gran porcentaje de los desechos colectados, es materia orgánica principalmente y en mayor proporción de origen vegetal y en menor animal. Existen ya propuestas para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos

- **Proceso de composteo** (regenerador de suelos y fertilizantes) (Cruz et al., 1980)
- **Formulación de complementos alimenticios o como forrajes para animales** (Madinaveitia et al. 1980)
- **En la fabricación de materiales de construcción, mezclándose plástico con fibras, dando firmeza a los ladrillos** (Escobar y Muramatsu, 1992)
- **En la elaboración de papel de baja calidad, fabricación de textiles, muebles, combustibles, productos químicos y producción de proteína unicelular** (Cruz et al., 1980, De la Torre, 1981; Madinaveitia et al., 1980; Fernández y Valenzuela, 1980; Bello y Ramos, 1993 y Philippidis et al., 1993)

---

Otra alternativa para los desperdicios animales y vegetales son utilizarlos como composta y sustrato en el cultivo de hongos comestibles (Martínez et al., 1984; Martínez et al., 1993; Guzmán, 1985; Guzmán et al., 1993 y Mata y Martínez, 1988).

### 1.1.1 DESECHOS ANIMALES

En el cultivo de ciertos hongos como es el caso del champiñón (*Agaricus bisporus*) se utiliza estiércol de caballo, vaca, gallina, pollo, cerdo (conocidos los tres últimos como gallinaza, polinaza y cerdaza respectivamente) combinados con sustratos lignocelulolíticos como son pajas de trigo cebada etc (Levanon, et al 1984, Shandilya, 1976 y 1978 y Border, 1993) y además se están haciendo pruebas con huesos molidos principalmente de vacas agregandoseles a la cobertura (Comunicación personal)

### 1.1.2 DESECHOS VEGETALES

*Volvariella volvacea*, *Pleurotus ostreatus*, *Auricularia fuscosuccinea*, *Lentinus edodes*, *Calvatia* spp. y *Licoperdon* spp. entre otros, son hongos comestibles que poseen una excelente capacidad para degradar sustratos lignocelulósicos como son residuos agrícolas, industriales y maderables. A los cuerpos fructíferos de estos hongos, se les considera un alimento de buena calidad para consumo humano y animal, además de producir sustancias como hormonas y enzimas, y algunos de estos hongos poseen atributos medicinales. El material remanente, después del cultivo de los hongos puede usarse, para ello se compostea y se le adicionan materiales con alto contenido de nitrógeno, como son los desechos de animales. Una vez degradado dicho material se convierte en un excelente abono orgánico que puede aplicarse directamente a los campos de cultivo, mejorando la estructura, la capacidad de retención de agua y el intercambio catiónico del suelo y disminuyendo su erosión. De esta forma el suelo aumenta su potencial para la producción de otros cultivos agrícolas. Otra alternativa para el sustrato de desecho, es usarlo como fuente de alimentación animal principalmente como forrajes para ganado (Chang, 1980; Lu, 1988; Martínez, et al 1984, Martínez y Larqué, 1990, Martínez, et al 1993; Mata y Martínez, 1988; Guzmán, et al 1993; Salmones, 1994; Sánchez y Calvo, 1994 y Peña y Barba, 1994).

## 1.2 ESTRUCTURA FÍSICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS DESPERDICIOS VEGETALES.

Los tejidos vegetales presentan una organización celular bastante uniforme. Generalmente, las membranas celulares de los vegetales poseen una pared celular típica constituida por tres partes fundamentales: la sustancia intercelular o lámina media, la membrana primaria y la secundaria; esta última compuesta por tres capas: S1 (capa externa), S2 (capa central) y S3 (capa interna) (Figuras 1.1 y 1.2).

La sustancia intercelular se halla entre las membranas primarias de células contiguas, y mantiene unidas las distintas células que forman los tejidos; es amorfa y ópticamente inactiva (isótropa). Se compone principalmente de un compuesto péctico que posiblemente está combinado con calcio. En los tejidos leñosos se halla lignificado. En los tejidos adultos la sustancia intercelular es difícil de identificar. En la laminilla media se encuentran casi toda la lignina, cuya proporción disminuye conforme se acerca al lúmen.

La membrana primaria o pared primaria es la primera pared celular verdadera que se desarrolla en una célula joven. En muchas células es la única pared que se desarrolla, ya que la laminilla media se considera sustancia intercelular y no una pared propiamente dicha. Contiene celulosa, hemicelulosa y alguna pectina, puede lignificarse. Debido a la presencia de celulosa la membrana es anisótropa; puesto que dicha membrana se forma antes de que la célula haya dejado de crecer.

Como su nombre lo indica la membrana secundaria sigue a la primaria en orden de aparición. Consta principalmente de celulosa o de mezclas variables de celulosa y hemicelulosas, pero puede ser modificada por acumulación de lignina y otras sustancias diversas. Debido a la elevada proporción de celulosa, la membrana secundaria es fuertemente anisótropa; destaca su complejidad estructural y su ausencia de homogeneidad. Por lo general la capa S2 (capa central) es la de mayor espesor comparada con la pared primaria, la laminilla media y las otras dos capas (S1 [capa externa] y S3 [capa interna]). La pared secundaria contiene muy poca lignina. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes formando estructuras longitudinales llamadas microfibrillas, dentro de cada una de las cuales se encuentran las moléculas lineares de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. El espesor de las membranas celulares varía según la edad y tipo de la célula.

---

Los desperdicios vegetales están compuestos principalmente de 3 tipos de biopolímeros: lignina (4-25%), hemicelulosa (10-30%) y celulosa (35-60%) conocidos como complejos lignocelulósicos. Éstos son los constituyentes más importantes de los tejidos vegetales.

La lignina se encuentra asociada con la celulosa formando una barrera de difícil degradación. Los desechos agrícolas contienen altas proporciones de estos complejos, por ello al utilizarlos de manera directa en la alimentación animal no presentan un aumento significativo en la ganancia en peso por su baja digestibilidad, ya que la lignina actúa como barrera infranqueable para la utilización de la celulosa, compuesto de importancia en la dieta de los animales (Guzmán 1985); a la vez, se considera a la lignina como una gran fuente de energía de baja disponibilidad.

La lignina es una molécula polifenólica con estructura tridimensional, es un material amorfo, formado por monómeros aromáticos y altamente ramificado, esta formada a base de la polimerización de alcoholes polihidroxinámicos. Se le encuentra depositada alrededor de la celulosa dándole una gran resistencia a los tejidos vegetales. Por ello actúa como barrera física y química para evitar el ataque microbiano y la acción de las enzimas celolíticas (De la Torre, 1981).

La lignina puede estar presente en las 3 capas de la membrana: la lámina media, la pared primaria (membrana primaria) y la pared secundaria (membrana secundaria). La lignificación se inicia en la membrana primaria, en la porción adyacente a los engrosamientos angulares de la lámina media, y luego se extiende a la capa intercelular y a la membrana primaria en general. En la membrana secundaria la lignificación queda muy por debajo con respecto a la síntesis de celulosa y otros polisacáridos. En los tejidos leñosos la lámina media y la membrana primaria son más lignificadas que la membrana secundaria.

La hemicelulosa es una mezcla compleja de polisacáridos conteniendo básicamente xilosa, galactosa, manosa, arabinosa y ácidos urónicos de glucosa y galactosa. A los enlaces entre ellos, se le considera menos resistente tanto a los tratamientos químicos como físicos.

La celulosa es la macromolécula orgánica más abundante de la Tierra. Se encuentra abundantemente en los vegetales como parte de su estructura básica y constituye la pared celular de éstos. La molécula de celulosa es un homopolímero lineal formado por unidades de anhidro D- glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) glucosídicos, es un material cristalino, rígido. La celulosa está formada por cadenas lineales hasta de 3000 unidades de glucosa (Figura 1.2), estas cadenas se disponen ya sea al azar en la pared celular de la planta, constituyendo la

celulosa amorfa, o bien agrupadas en microfibrillas, formando la celulosa cristalina, en esta las cadenas se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, estas uniones impiden el acceso de la enzima celulasa a la región central de las cadenas de celulosa (Deacon, 1988 y Coughlan, 1990). La celulosa además de ser el componente principal de los vegetales forma parte de algunos invertebrados como material extracelular.

La hidrólisis completa de la celulosa con ácidos concentrados produce únicamente D- glucosa, pero la hidrólisis parcial produce el disacárido reductor celobiosa, cuyo enlace entre las unidades de D- glucosa es  $\beta$  (1-4) (Lenninger, 1985)

Las celulosas nativas presentan diferentes grados de cristalinidad. La hidrólisis enzimática de este polisacárido requiere de un complejo enzimático integrado por 3 clases de enzimas, capaces de romper los enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4), conocidas como endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa (De la Torre, 1981). Los rumiantes (vacas, ovejas, cebras, jirafas, etc.) pueden utilizar la celulosa como alimento, ya que las bacterias presentes en su rumen producen la enzima celulasa, que hidroliza la celulosa a D-glucosa, sin embargo como ya se menciona su digestibilidad es baja.

Aunque la celulosa posee elevada afinidad por el agua, es completamente insoluble en ella. Los derivados sustituidos de la celulosa se forman por reemplazo del hidrógeno de los grupos hidroxilos primarios y secundarios de la celulosa con los grupos reactivos tales como metil, etil, hidroxietil, y carboximetil. La adición de estos grupos hace a la celulosa menos cristalina y más soluble en agua, en proporción al grado de sustitución y a la capacidad de solvatación de los grupos sustituyentes. La celulosa microcristalina, seca y blanca, conocida con el nombre de Avicel es soluble en bases diluidas e insoluble en ácidos diluidos.



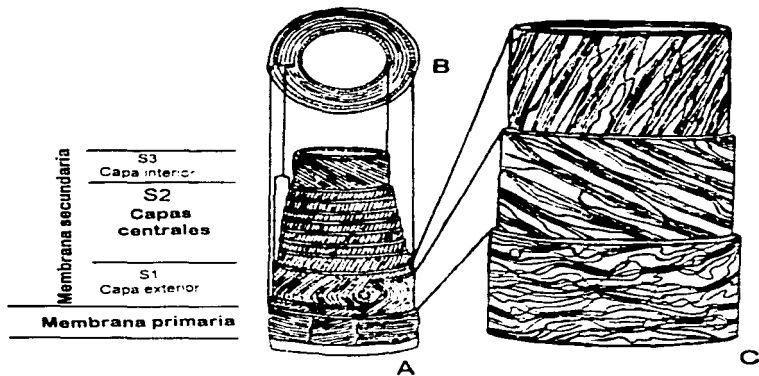


FIGURA 11 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA EN LA FIBRA DEL ALGODÓN (A) SEGMENTO TELESCOPIZADO Y (B) SECCIÓN TRANSVERSAL DE LA FIBRA MOSTRANDO LA RELACION ESPACIAL DE LAS DISTINTAS CAPAS Y LA ORIENTACION DE LAS MICROFIBRILLAS EN LAS MISMAS (C) LA MEMBRANA PRIMARIA TIENE UNA ESTRUCTURA MICROPILAR RETICULADA LA CAPA EXTERIOR DE LA MEMBRANA SECUNDARIA COMBINA LA ORIENTACION RETICULADA CON LA PARALELA DE LAS MICROFIBRILLAS Y LA PRIMERA CAPA CENTRAL DE LA MEMBRANA SECUNDARIA TIENEN UNA ESTRUCTURA MICROPILAR PREDOMINANTEMENTE PARALELA (ESAU, 1985)

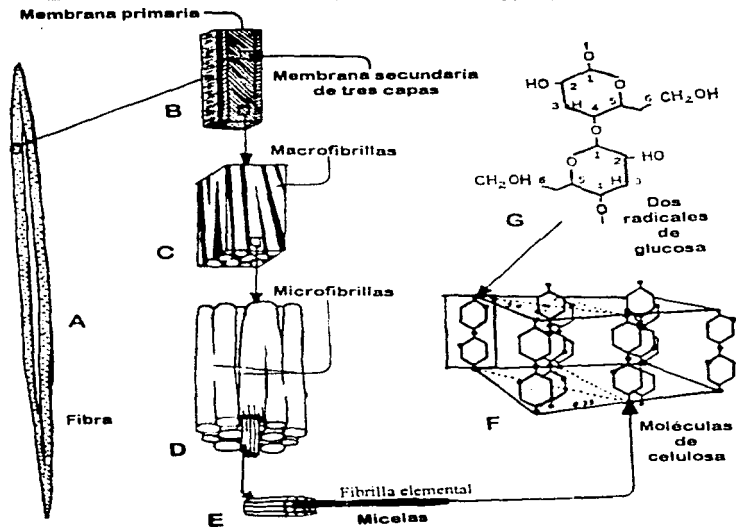


FIGURA 12. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA CELULOSA. LA FIBRA (A) TIENE UNA MEMBRANA SECUNDARIA DE TRES CAPAS (B). EN UN FRAGMENTO DE LA CAPA CENTRAL DE ESTA MEMBRANA (C) LAS MACROFIBRILLAS (EN BLANCO) CONSTAN DE NUMEROSAS MICROFIBRILLAS (EN BLANCO) (D) DE CELULOSA ENTREMEZCLADAS CON MICROPOROSIDADES (EN NEGRO) QUE CONTIENEN COMPUESTOS NO CELULÓSICOS. LAS MICROFIBRILLAS COMPUESTAS DE FIBRILLAS ELEMENTALES (MICELAS) (E) ESTÁN FORMADAS POR HACES DE MOLECULAS DE CELULOSA PARCIALMENTE DISPUESTAS EN RETÍCULOS TRIDIMENSIONALES ORDENADOS. LAS MICELAS (E) SON CRISTALINAS DEBIDO AL ESPACIADO REGULAR DE LOS RESTOS DE GLUCOSA (DOS UNIDADES DE CELULOSA) (F) ESTOS RESTOS ESTÁN CONECTADOS POR ENLACES β-1,4-GLUCOSÍDICOS (DOS RADICALES DE GLUCOSA) (G). (ESAU, 1965)

---

### 1.3 MÉTODOS PARA LA DELIGNIFICACIÓN DE LOS DESPERDICIOS LIGNOCELULÓSICOS.

La utilización de los desperdicios vegetales reviste gran importancia debido al papel que juegan las plantas como principales productores de biomasa en el planeta (Leal, 1980b). Existen 3 métodos para delignificar los desperdicios vegetales: tratamientos físicos como son molienadas, radiaciones, tratamientos químicos con sustancias alcalinas ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_4$ , entre otros) o con ácidos fuertes o diluidos ( $\text{HF}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Han y Callihan, 1974 y Blazej y Kosik, 1993), solos o en combinaciones, es posible disminuir el contenido de lignina de los desperdicios lignocelulósicos causando aumento en la digestibilidad, pero presentando las siguientes desventajas: no son económicos porque gastan mucha agua para sus lavados, alto consumo de energía, además de problemas de contaminación (Blazej y Kosik, 1993). Otra alternativa para degradar a estos polisacáridos ocurre de forma natural por descomposición enzimática por ciertos microorganismo, entre ellos se incluyen bacterias aerobias (*Cellulomonas* sp, *Cellvibrio* sp, *Microbispora bispora*, etc.) y anaerobias (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, etc.) y los hongos que ocupan una gran variedad de hábitats (Coughlan, 1990 y Ahmedova, 1991). Estos hongos se han clasificado dentro de 3 categorías: Hongos de la pudrición blanda, hongos de la pudrición oscura y hongos de la pudrición blanca de acuerdo a su capacidad de degradación (Eriksson, 1988 y Ahmedova, 1991).

Los hongos de la pudrición blanda pertenecen primordialmente a las clases de los **Ascomycetes** y **Deuteromycetes**. Son hongos celulolíticos poco especializados de los Géneros *Chaetomium*, *Ceratocystis*, *Phialophora*, etc., son activos sólo en la madera con un alto contenido de agua, degradan celulosa y hemicelulosa pero no lignina, y penetran en la capa S2 de las paredes donde producen cavidades romboides típicas. La pudrición es limitada y está estrechamente relacionada con las hifas, ya que las celulasas no se difunden libremente en la madera, quedando como resultado un desecho blando (madera), de ahí que se les llame hongos de la pudrición blanda.

Dentro de los hongos de la pudrición oscura o café pertenecen a la clase de los **Basidiomycetes**: por ejemplo: *Piptoporus betulinus*, *Contiophora puteana*, *Lenzites sepiaria*, entre otros, pero al igual que los hongos de la pudrición blanda, degradan celulosa y hemicelulosa, y sólo causan ligeras alteraciones en la molécula de la lignina dejando una capa de color café (de ahí el nombre de pudrición café). Sin embargo, probablemente modifican la estructura de la lignina, al menos al grado de que ya no forma complejos químicos con la celulosa. Estos hongos ocasionan una pudrición difusa y generalizada al crecer

principalmente en el lumen celular próximo a la capa S2. Estudios recientes han demostrado que degradan la celulosa por procesos oxidativos no enzimáticos que implican la acción de iones  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$ .

Los hongos de la pudrición blanca o lignícola, utilizan celulosa, hemicelulosa y lignina más o menos en forma simultánea, la madera adquiere una coloración clara durante la descomposición. Tienen varios patrones de coloración de la madera, pero cuando están presentes en el lumen de la célula ocasionan una descomposición progresiva de las capas de la pared que comienzan en la capa S3 y luego se extienden hacia el exterior. Dentro de este tipo de hongos; los Basidiomicetos son sin lugar a dudas los más eficientes en relación a su capacidad delignificante son capaces de degradarla parcialmente (Kirk y Shinada, 1985; Deacon, 1988 y Coughlan, 1990). Especies del género **Pleurotus** ofrecen muchas posibilidades para delignificar los desechos agrícolas y forestales y producir un alimento con alto contenido proteico (Guzmán, 1985).

La especie más conocida de este género es **Pleurotus ostreatus**, es un hongo saprobita que crece naturalmente sobre troncos de árboles muertos y muy raramente sobre árboles vivos (Guzmán, 1977). Es capaz de degradar simultáneamente lignina, celulosa y hemicelulosa (Zacrazil, 1984). Posee una amplia gama de enzimas celulasa (endoglucanasa, celobiosas), hemicelulasa (xilanasas) y ligninasas (lacasas, peroxidasas, ligninasas), las cuales toman parte activa en la degradación de los materiales lignocelulósicos (Ahmedova, 1991). **Pleurotus ostreatus** es uno de los 4 hongos más importantes cultivados comercialmente a nivel mundial (Chang y Miles, 1989). En nuestro país representa una alternativa para satisfacer la demanda de necesidades nutricionales dado su alto contenido proteico y además utilizando los residuos agroindustriales que representan en algunos sitios serios problemas de contaminación. Sus esporóforos son comestibles de olor y sabor agradable. En México **Pleurotus ostreatus** se conoce con los siguientes nombres comunes: seta, oreja de palo, oreja de izote, oreja blanca, hongo de cazahuate y hongo de bagazo (Guzmán, 1985; Martínez et al., 1985).

#### 1.4 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE **Pleurotus ostreatus**.

El cuerpo fructífero con forma irregular está formado por el estípite (pie) pileo (sombrero) y por el himenio (láminas).

El estípite mide 20-30 X 10-20 mm, puede ser corto, oblicuo, excéntrico, lateral o en algunos casos ausente y su base puede ser pilosa, lisa, húmeda o ligeramente viscosa de color blanco o amarillento, por lo general es concretescente, todos nacen

---

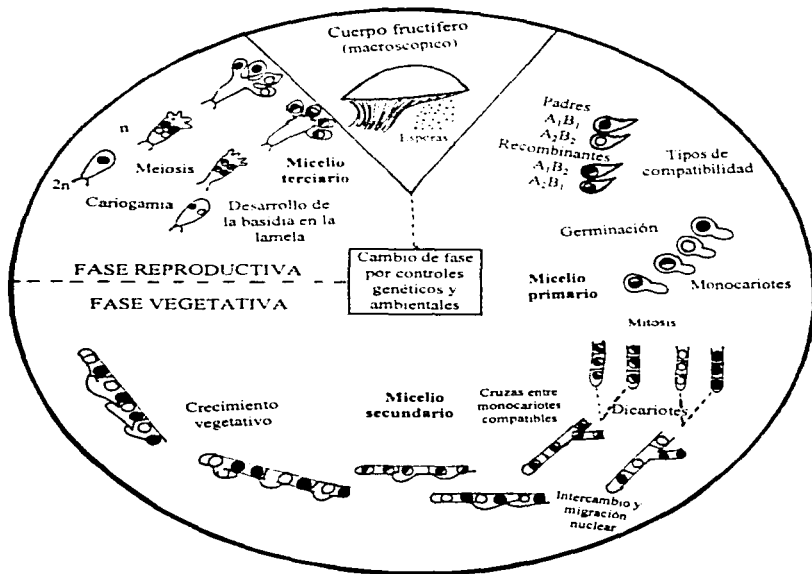
de una base común) El pileo mide de 5 a 15 cm de diámetro, su forma puede ser espatulada, de concha (en forma de ostra), de abanico, convexa al principio, después lana, liso, o ligeramente deprimido, frecuentemente ondulada con el margen lobulado o agrietado, su color es variable (dependiendo de las condiciones del cultivo) negro violáceo, pardo ceniciento ahumado, gris, gris-azuloso, gris oscuro, café, café oscuro, café-grisáceo pero palidece al secarse, su textura puede ser lisa, a veces algo escamosa hacia el centro o base. El himenio (parte fértil del hongo) se localiza debajo del pileo y está formado por láminas estrechas delgadas, decurrentes, blancas o grisáceas con un ligero reflejo rosado. En ellas se producen los basidios, los cuales son estructuras especializadas que producen esporas (basidiosporas). Las esporas son lisas, subcilíndricas de forma elipsoidal de 7.5 - 11 X 3-4  $\mu$ , de color lila en masa (Krieger, 1957; Zadrzil, 1974; Egor, 1978; Chang y Miles, 1989).

**Pleurotus ostreatus** pertenece a la clase de los Basidiomicetos definida generalmente por formar 4 esporas sexuales, la esporulación de **Pleurotus ostreatus** produce esporas haploides con 4 tipos de compatibilidad, las cuales germinan para formar el micelio monocariótico por medio de divisiones mitóticas. Este micelio puede permanecer en la fase vegetativa por tiempo indefinido, si se dan las condiciones apropiadas de luz, temperatura o humedad relativa del medio. Para cambiar a la fase reproductiva debe de haber apareamiento entre monocariotes compatibles para formar micelio dicariótico. Este bajo condiciones adecuadas, se aglutina para dar origen a los primordios, los cuales al desarrollarse forman el cuerpo fructífero (Alexopoulos, 1979; Chang y Miles, 1989).

El micelio de la mayoría de los basidiomicetos pasa por 3 estados distintos de desarrollo: primario, secundario y terciario, para que el hongo complete su ciclo de vida. El micelio primario generalmente se desarrolla a partir de la basidiospora. Al principio puede ser multinucleada ya que el núcleo o los núcleos de la basidiospora se dividen muchas veces a medida que el tubo germinativo emerge de la espora y comienza a crecer sin producir septas. La fase multinucleada es corta porque se forman tabiques que dividen al micelio en células uninucleadas. El micelio secundario se origina del micelio primario. Las células son típicamente binucleadas. El estado binucleado comienza cuando se fusionan los protoplastos de 2 células uninucleadas, sin que haya meiosis después de la mitosis. La célula binucleada que así se forma produce una ramificación a la cual emigra el par nuclear, los 2 núcleos se dividen conjugadamente, y los núcleos hermanos se distribuyen en 2 células hijas para iniciar el micelio binuclear. El micelio terciario está representado por los tejidos especializados que se originan para formar los esporóforos de los basidiomicetos. Los basidiomicetos producen basidios en cuerpos fructíferos altamente organizados de varios tipos. El basidio se origina

como célula terminal de una hifa binucleada y se encuentra separado de la misma por un tabique a cuyo lado generalmente se encuentra una fibula. Al principio el basidio es angosto y corto, pronto se agranda y se hace más ancho. En tanto tienen lugar estos cambios externos, dentro del basidio joven se fusionan los núcleos (Cariogamia) y el núcleo cigótico pronto sufre meiosis, dando lugar a 4 núcleos haploides. Entre tanto emergen 4 esterigmas en el extremo del basidio y sus extremos se agrandan para formar los esbozos de las basidiosporas, los 4 núcleos pasan a los jóvenes basidiosporas, que van a completar su desarrollo como células uninucleadas haploides (Figura 1.3) (Eugenio y Anderson, 1968; Alexopoulos, 1979, Martínez, et al. 1993 y Herrera y Ulloa, 1990).

FIGURA. 1.3: CICLO DE VIDA DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus* (RAMÍREZ, 1989).



## 1.5 ESTUDIOS REALIZADOS CON *Pleurotus ostreatus*.

Este hongo ha sido estudiado desde varios aspectos; como su ciclo de vida, patrones de sexualidad (Herrera, 1990) composición química, aislamiento de sustancias importantes como es el ergosterol (Trigos y Martínez, 1992), Mejoramiento genético: Hibridación o entrecruzamiento de cepas; (Martínez, 1988b; Sobal y Martínez, 1988; Alcántara, 1990; Fajardo, 1990; Padilla, 1990) fusión de protoplastos y dedecaricortización (obtención de neohaplontes), (Leal, 1980a), además de la obtención de mutantes selectivas para degradar la lignina (Ramírez, 1989), así como el cultivo de este hongo en diversos sustratos, en donde la mayor parte de estas investigaciones se han basado solo exclusivamente en la producción de esporóforos (Guzmán, 1985; Morales, 1987; Martínez, et al., 1985 y 1988a Soto, et al 1989, Rinker, 1991; Bis'ko y Bilay, 1992; Ginterová, et al. 1992; Guzmán, et al 1993, Pérez y Alfaro, 1994 y Villaseñor, et al. 1994), éstos sustratos se pueden clasificar en 6 categorías:

- 1) Pajas de: cártamo, cebada, sorgo, trigo, avena, centeno, amaranto, arroz y zacate en general.
- 2) Rastrojos de: maíz, mijo, garbanzo, frijol.
- 3) Pulpas de: café, cardamomo, cacao
- 4) Bagazos de: caña de azúcar, citronela, maguey tequilero, mezcal, henequén, zanahoria.
- 5) Forestales como: aserrín, viruta (pino, encino) madera de caahuate, troncos, ramas, polcote (maleza) y hojarasca de parques y jardines.
- 6) Otros: papel, olote y tamo de maíz, fibra de coco, lirio acuático, hojas y tallos (cañones) de plátano, residuo de girasol, orégano, pencas de nopal, cáscara de cacahuete, desechos de la industria textil, lino y algodón y de la industria de extracción de aceites esenciales: (hojas) zacate limón, canela y pimienta negra.

## 1.6 SISTEMA CELULOLÍTICO FUNGI.

Los hongos celulolíticos (pudrición blanda, blanca y oscura) tiene la capacidad de biodegradar la celulosa presente en los materiales vegetales

Esta biodegradación requiere de un sistema de enzimas extracelulares denominadas celulasas o más precisamente como complejo celulasa.

El complejo celulolítico extracelular esta compuesto por 3 grupos de enzimas conocidas como 1,4- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasa (endoglucanasa), 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas (exoglucanasa) y  $\beta$ -D-glucoside glucohidrolasa (  $\beta$ -glucosidasa) (Figura 1.4).



La endoglucanasa rompe las cadenas de celulosa para formar varias moléculas como el dímero celobiosa y el trímero celotriosa. Luego la  $\beta$ -glucosidasa rompe a la celobiosa para formar glucosa, la cual es asimilada por la célula. Sin embargo la celulosa cristalina natural requiere una tercera enzima, la  $\text{exo-}\beta$ -glucanasa, que separa unidades sucesivas de 2 azúcares (celobiosa) de los extremos de las cadenas de celulosa. es una enzima con frecuencia mucho más restringida, ya que muchos hongos producen la endoenzima y la  $\beta$ -glucosidasa, pero muy pocos producen las exoenzimas y por lo tanto son incapaces de degradar la celulosa cristalina. Tales hongos incluyen los generos **Trichoderma spp.**, **Chaetomium**, y los **Basidiomycotina** y **Ascomycotina** (Deacon, 1988, Eriksson, 1978, Coughlan, 1988 y 1990; Philipidis, 1993).

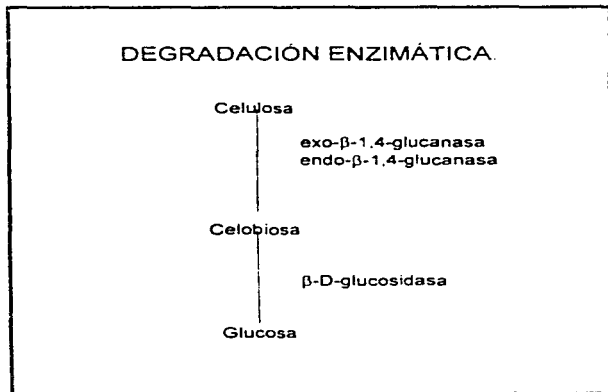


FIGURA 1.4: COMPLEJO CELULASA (DEACON, 1988).

## 1.7 OBJETIVO.

Este trabajo esta enmarcado dentro de un proyecto global, donde se han producido mutantes acelulolíticas del hongo comestible **Pleurotus ostreatus**, con la finalidad de lograr una delignificación selectiva de los desperdicios lignocelulósicos, obteniendo cepas capaces de crecer en estos subproductos utilizando primordialmente la lignina y dejando como material remanente un sustrato celulósico apto para la alimentación de rumiantes. Para esto las mutantes acelulolíticas, han sido mejoradas genéticamente (Ramírez, 1989; Alcantará, 1990 y Padilla, 1990). Las cepas seleccionadas deben presentar un consumo muy bajo de celulosa (acelulolíticas). Uno de los principales problemas ha sido encontrar un método cuantitativo que permita evaluar en forma precisa y rápida el consumo de este polisacárido (Fajardo, 1990). Por lo anterior en el objetivo de este trabajo se planteo el montaje de una técnica que permita evaluar la capacidad celulolítica de diferentes cepas híbridas de **Pleurotus ostreatus** de manera cuantitativa.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 CEPAS FUNGICAS.

Las cepas evaluadas de **Pleurotus ostreatus** son híbridos, que se encuentran depositadas en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Las cepas fueron conservadas por resiembra periódica en un medio de extracto de malta agar (Cuadro 2.1).

CUADRO 2.1: ORIGEN Y CAPACIDAD PARA CONSUMIR CELULOSA DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**.

Cepas	Consumo de celulosa	Origen
P 214	C-	Cepas dicarióticas de <b>Pleurotus ostreatus</b> provenientes de la cruce entre la mutante (C-) 56 H1N1 y el monocariote silvestre Mo.24.
P 215	C-	
P 216	C-	
P 217	C-	
P 218	C-	
P 219	C-	
P 220	C-	
P 221	C-	
P 222	C-	
P 223	C-	
P 813	C-	Cepas dicarióticas de <b>Pleurotus ostreatus</b> provenientes de la cruce entre la mutante (C-) 9 H4N2 y el monocariote silvestre Mo.36
P 816	C-	
P 404	C+	Cepas monocarióticas silvestres (C+) de <b>Pleurotus ostreatus</b> .
P 406	C+	
P 409	C+	
P 411	C+	
P 412	C+	
P 417	C+	
P 407* (Mo. 24)	C+	Monocariote silvestre
P 408* (Mo. 36)	C+	Monocariote silvestre
P 14* (8x3)	C+	Híbrido dicariote obtenido por el Dr. Leal.
IAP*	C+	Cepa comercial
PI8*	C+	Cepa comercial

C- acelulolítica

C+ celulolítica

\* cepas control

---

## 2.2 MEDIOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.

### 2.2.1 MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA AGAR.

Para preparar 500 ml de medio de extracto de malta agar, se pesó 10 g (2%) de agar bacteriológico y 7.5 g (1.5%) de extracto de malta y se colocó en un matraz Erlenmeyer de un litro de capacidad. Se adiciono 500 ml de agua destilada gradualmente procurando disolver los reactivos, se tapo con hule espuma y papel aluminio, y se dejo reposar durante 20 minutos. Posteriormente, se esterilizo en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 30 minutos. A continuación se vacio 20 ml del medio estéril en cajas petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se guardaron las cajas petri en bolsas de polietileno, con el medio invertido, para evitar contaminaciones, así como, condensación de agua y deshidratación del medio. En esta posición el medio se incubo a 28°C y después de 3 días se revisaron y desecharon aquellas que presentaron crecimiento alguno de bacterias y/o mohos.

#### 2.2.1.1 INOCULACIÓN DEL MEDIO.

En el medio libre de cualquier contaminación se procedió a su inoculación con las cepas (Tabla 2.1). Para ello con la ayuda de un asa de siembra previamente esterilizada al mechero, se cortaron fragmentos aproximadamente de 0.5 X 0.5 cm de lado de agar con micelio del perímetro de una colonia en crecimiento. En condiciones estériles se transfirieron 4 inoculos de la misma cepa a una caja petri con medio de extracto de malta, y se incubo a 28°C. Después de 3 días se revisaron y eliminaron aquellas que presentaron contaminación. Todas las cajas que presentaron crecimiento normal se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones, hasta que el desarrollo vegetativo invadió totalmente la caja (7 a 10 días).

### 2.2.2 MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA DEPROTEINADO (DPMA).

Para preparar una solución concentrada de extracto de malta deproteinado. Se pesaron 10 g de extracto de malta y se disolvieron en 1000 ml de agua destilada, se midió el pH de la solución y se elevó 1.5 unidades con una solución de NaOH 1N, ajustándose a un pH de  $7.3 \pm 0.1$ . Después se adiciono 0.7 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se esterilizo en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Una vez frío se filtro para eliminar las proteínas, con lo cual se obtuvo un medio de

baja concentración de nitrógeno. Finalmente se esterilizó nuevamente durante 10 minutos para evitar que se contaminara hasta su uso.

### 2.2.3 MEDIO DE SALES MINERALES (PRIMERA CAPA).

Para preparar un litro de la solución de sales minerales se disolvieron en 500 ml de agua destilada, las siguientes sales en el orden indicado (Cuadro 2 2).

CUADRO 2.2: ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SALES MINERALES.

Sales minerales	Cantidad (g)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4.0000
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.2000
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.8000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0044
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0050
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0010
$\text{FeNH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0.0050
$\text{CaCl}_2$	0.0200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8900

Las últimas 2 sales se disolvieron por separado e integraron al volumen total de 1 litro.

Para preparar el medio se ajustó el pH de la solución de sales a 4.5 y se adicionaron 20 g de agar bacteriológico por cada litro de medio. Después de disolver el medio, se dejó reposar durante 20 minutos y esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. A continuación se vació 10 ml del medio en cada caja petri desechable. Cuando solidificaron se guardaron en bolsas e incubaron como se menciona anteriormente.

---

## 2.2.4 PRETRATAMIENTO DE LA CELULOSA POR EL MÉTODO WALSETH (CELULOSA MICROCRISTALINA Y CARBOXIMETIL CELULOSA).

Con este método la celulosa se somete a un tratamiento ácido para que ésta se pueda hidratar y obtener una suspensión homogénea

Para preparar celulosa por el método Walseth (1952): 4 g de celulosa microcristalina o carboximetil celulosa y 51 ml de ácido fosfórico se dejaron enfriar en el congelador durante 30 minutos. Posteriormente se mezclaron gradualmente, con la ayuda de un agitador pequeñas cantidades de celulosa y ácido fosfórico en un vaso de precipitados colocado en un baño de hielo para obtener una mezcla homogénea libre de grumos. Esta operación se continuó hasta que toda la celulosa se incorporó en una mezcla homogénea con el ácido. La mezcla se dejó enfriar por 2 horas y después se licó con 500 ml de agua destilada y se filtró al vacío para eliminar el exceso de ácido. El precipitado obtenido de la celulosa se desprendió con una espátula y se lavó 2 veces más de la misma manera. Después del último lavado, se colocó en 500 ml de solución de carbonato de sodio al 1% y se dejó reposar por 12 horas, para neutralizar el exceso de acidez. A continuación se lavó 3 veces más con agua destilada de igual forma

### 2.2.4.1 CELULOSA SUSPENDIDA EN AMORTIGUADOR DE ACETATO DE SODIO.

A la celulosa tratada por el método Walseth se le determinó la humedad y se suspendió en 100 ml de amortiguador de acetatos de sodio 0.1 M pH 5. Una vez que se conoció la humedad se le adicionó la cantidad necesaria de amortiguador para obtener una solución de celulosa al 1 %

### 2.2.4.2 CELULOSA SUSPENDIDA EN PEPTONA AL 0.05 Y 0.1% Y AGUA DESTILADA.

Para obtener una solución homogénea la celulosa se disolvió en 100 ml de peptona al 0.05, 0.1%, o agua destilada, para esto se le determinó la humedad al precipitado y se le adicionó la cantidad necesaria para obtener la solución al 1% de celulosa.

## 2.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN PLACAS DE CRISTAL.

Para evaluar la capacidad celulolítica en forma cuantitativa de las diferentes cepas por medio de halos fue necesario probar diferentes variables que permitieran encontrar las condiciones óptimas para el objetivo principal.

### 2.3.1 PREPARACIÓN DE PLACAS DE 5X5 cm CON CELULOSA TRATADA POR EL MÉTODO WALSETH.

Para preparar la placa, se pesó 0.35 g de agar bacteriológico y se disolvió en 33 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.0. Esta mezcla se calentó hasta la completa disolución del agar. Una vez disuelto el agar se adicionó 2 ml de la solución de celulosa (tratada por el método Walseth) al 1%, se agitó y vertió 2 ml de esta solución en una placa de cristal de 5X5 cm de lado y se dejó solidificar.

#### 2.3.1.1 TINCIÓN DE LA CELULOSA.

Para teñir la celulosa se utilizaron los siguientes colorantes:

- Comerciales marca Mariposa
  - Café
  - Negro
  - Violeta.
- Químicamente puros
  - Azul brillante de remazol
  - Rojo de rutenio

Las placas con la celulosa solidificada, se tiñeron con una solución al 0.05% de cada uno de los colorantes durante 30 minutos, dejándose sumergidas en un recipiente con suficiente solución del colorante, posteriormente se lavaron hasta que el agua del lavado se observó incolora.

#### 2.3.1.2 EVALUACIÓN DE HALOS CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE **Trichoderma sp.**

A cada placa se le realizó un pozo con una punta Gilson de 0.9 cm de diámetro, y se inoculó con 40 µl de una enzima concentrada de **Trichoderma sp.** Se



---

evaluaron 3 diferentes tiempos de incubación (1, 3 y 5 horas), a 28°C, con sus respectivos triplicados.

### 2.3.2 PREPARACIÓN DE PLACAS Y SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AGAR Y CELULOSA.

Una vez elegida la mejor celulosa y el colorante, se procedieron a preparar placas de cristal de 17X17 cm de lado

Se probaron 3 concentraciones de agar (0.25, 0.375 y 0.5 g) y cada una se disolvieron por calentamiento en 5 concentraciones de celulosa, tratada por el método Walseth (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 %). Para completar el volumen total se adicionaron 31.5, 28, 24.5, 21, y 17.5 ml de amortiguador de acetatos respectivamente. Una vez que solidificaron se tiñeron durante 30 minutos y se enjuagaron con agua. El espesor de cada placa fue de 0.12 cm con un volumen de 35 ml.

#### 2.3.2.1 EVALUACIÓN DE HALOS CON 3 CONCENTRACIONES DE LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE *Trichoderma sp.* Y SELECCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN.

A cada placa se le dividió imaginariamente en 3 secciones horizontales y 2 verticales igualmente espaciadas y en el centro de cada cuadrante se le realizó un pozo con una punta Gilson de 0.9 cm de diámetro. Cada concentración de la enzima de *Trichoderma sp.* ( $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$ ), se inoculó en 2 pozos con 40  $\mu$ l haciéndose 2 réplicas para cada tiempos de incubación (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13 y 14 días). Las placas fueron incubadas a 28°C dentro de bandejas selladas para evitar su deshidratación y propiciar un ambiente húmedo.

#### 2.3.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN UNIDADES DE ENZIMA, EN LA PLACA DE 17X17 cm.

Con las variables anteriores, una vez que se encontraron las mejores condiciones para detectar la formación de halo, se procedió a evaluar las cepas de *Pleurotus ostreatus* sobre el medio elegido. Para esto la placa se dividió imaginariamente en 3 secciones horizontales y 2 verticales igualmente espaciadas y cada cuadrante se inoculó con círculos cortados con una punta Gilson estéril de 0.9 cm de diámetro de agar con micelio proveniente del perímetro de una colonia en

crecimiento en agar extracto de malta. Se incubo el tiempo elegido a 28°C, realizándose 5 repeticiones por cepa (8X3, P813, P221, P222, P223, Mo 24).

### 2.3.4 EVALUACIÓN DE 5 CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, UNA DE DPMA Y UNA DE TIAMINA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN CAJAS PETRI.

Se sustituyo la placa de cristal de 17X17 cm, por cajas petri de 9 cm de diámetro. Para esto el volumen total de la caja petri fue de 7 ml, para igualar el espesor de la placa. El medio se preparó en tubos de ensaye, con 0.075 g de agar bacteriológico disuelto en 3.15 ml del amortiguador de acetatos al doble de su concentración normal, 3.15 ml de DPMA al 1% y 0.7 ml de la celulosa seleccionada. Se probó 5 concentraciones de glucosa (0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0%) para cada medio con y sin tiamina, con 5 repeticiones. Posteriormente los tubos se esterizaron por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión, vaciándose solo una parte de tubos (50%) en cajas petri. Cuando se probó la tiamina, el otro 50% de los tubos preparados, se dejaron enfriar después de esterilizar y antes de que solidificaran se les agrego 10 µl de solución de tiamina al 0.01 mg % a cada tubo, en condiciones asépticas. Finalmente se agitaron los tubos para homogeneizar el medio con un vortex y se vaciaron cada tubo sobre cajas petri. El medio fue inoculado con las cepas control, Mo. 36, 8X3 y Mo 24 y se incubaron a 28°C, el tiempo elegido.

#### 2.3.4.1 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN UN MEDIO DE 2 CAPAS, EN CAJAS PETRI.

El medio se elaboró como se menciona en la sección anterior (2.3.4), solo que cada tubo se vació sobre las cajas petri que contenían el medio de sales minerales (primera capa). El medio fue inoculado e incubado de igual forma.

### 2.3.5 EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA 8X3.

La celulosa microcristalina se disolvió en peptona al 0.05 y 0.1% y agua destilada. Los medios que a continuación se presentan se elaboraron en tubos de ensaye y se vaciaron en cajas petri (con un espesor de 0.12 cm y un volumen de 7 ml).

Cada medio se inoculó con la cepa control 8X3, e incubo por 4, 7 y 11 días a 28 °C, haciéndose 3 repeticiones por cada tiempo (Cuadro 2.3 y 2.4). La concentración de agar bacteriológico para todos los casos fue de 1.5% (0.075g).

Los medios con celulosa disuelta en peptona al 0.1% se prepararon de igual forma que la peptona al 0.05% (Cuadro 2.3).

**CUADRO 2.3: PREPARACIÓN DE MEDIOS CON CELULOSA DISUELTA EN PEPTONA AL 0.05%.**

Concentraciones de celulosa disuelta en peptona al 0.05%	No. de tratamiento	Peptona al 0.05% (ml)	DPMA al 1% (ml)	Glucosa al 0.05%
0.05 % (0.35 ml)	1/A	3.32	3.32	✓
	2/B	6.65		✓
	3/C	3.32	3.32	
	4/D	6.65		
0.1 % (0.7 ml)	5/A	3.15	3.15	✓
	6/B	6.30		✓
	7/C	3.15	3.15	
	8/D	6.30		
0.3 % (2.1 ml)	9/A	2.45	2.45	✓
	10/B	4.90		✓
	11/C	2.45	2.45	
	12/D	4.90		
0.5 % (3.5 ml)	13/A	1.75	1.75	✓
	14/B	3.5		✓
	15/C	1.75	1.75	
	16/D	3.5		
0.7 % (4.9 ml)	17/A	1.05	1.05	✓
	18/B	2.10		✓
	19/C	1.05	1.05	
	20/D	2.10		

✓ = PRESENCIA

✗ = AUSENCIA

**CUADRO 2.4: PREPARACIÓN DE MEDIOS CON CELULOSA DISUÉLTA EN AGUA DESTILADA.**

Variables evaluadas	Celulosa disuelta en agua destilada (%)									
	0.05 0.35 ml		0.1 0.7 ml		0.3 2.1 ml		0.5 3.5 ml		0.7 4.9 ml	
DPMA al 1% (ml)	6.64	6.64	6.3	6.3	4.9	4.9	3.5	3.5	2.1	2.1
Glucosa al 0.05%	✓		✓		✓		✓		✓	
No. de tratamiento	1/A	2/C	3/A	4/C	5/A	6/C	7/A	8/C	9/A	10/C

✓ = PRESENCIA

× = AUSENCIA

### 2.3.5.1 SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL.

Después de haber observado el desarrollo vegetativo de la cepa 8X3, en los diferentes medios probados, se escogió al azar 3 medios para cada tipo de desarrollo; rápido, intermedio y lento. Antes de evaluar los medios elegidos, las cepas control PIB, IAP, 8X3, Mo. 24 y Mo. 36, fueron inoculadas en cada uno de los medios (Cuadro 2.5), incubándose a 28 °C, hasta que llenaron la caja, para ser inoculados en los medios con deoxicolato de sodio.

Los medios (Cuadro 2.5) se prepararon en tubos de ensaye, se esterizaron por 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión, posteriormente se dejaron enfriar sin dejar que solidificara el medio y se le agregó 50 µl de solución de deoxicolato de sodio al 0.04% a cada medio, en condiciones asépticas. Finalmente se agitaron los tubos para homogeneizar el medio con un vortex y se vació cada tubo sobre una caja petri. Los medios fueron inoculados con las cepas previamente crecidas en el mismo medio sin deoxicolato y se incubaron a 28°C durante 7 días, haciéndose 5 repeticiones.

CUADRO 2.5: EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE HALO DE LAS CEPAS CONTROL DE *Pleurotus ostreatus* EN LOS 9 MEDIOS SELECCIONADOS.

Variables evaluadas	Tipo de desarrollo								
	rápido			intermedio			lento		
	Celulosa microcristalina (%)								
	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.3	0.5	0.7
Medio de suspensión de la celulosa									
	P2	P2	A	P2	A	A	P1	P1	P1
DPMA 1%	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glucosa 0.05%	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

P1 = CELULOSA DISUELTA EN PEPTONA AL 0.05%

P2 = CELULOSA DISUELTA EN PEPTONA AL 0.1%

A = CELULOSA DISUELTA EN AGUA DESTILADA.

✓ = PRESENCIA

∅ = AUSENCIA

### 2.3.5.2 RESIEMBRA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* EN EL MEDIO SELECCIONADO.

Para preparar 100 ml del medio seleccionado, se peso 1.1 g de agar bacteriológico (1.5%) , y se disolvió por calentamiento en 70 ml de DPMA al 1%, posteriormente se le agrego 30 ml de celulosa microcristalina al 0.3% disuelta en agua destilada y se esterilizo, durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Después se vacio 7 ml del medio en cajas petri. Cuando las cajas solidificaron se inocularon con las cepas a evaluar su capacidad celulolítica (Cuadro 2.1), haciéndose 3 repeticiones por cepa. Se incubaron a 28°C hasta que llenaron la caja, (7 a 10 días).

### 2.3.5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/l) DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL.

El medio se preparo de la forma anteriormente mencionada (2.3.5.2), solo que en tubos de ensaye (7 ml) y matraces Erlenmeyer (35 ml). Con la finalidad que después de esterilizar y dejar enfriar los medios agregarles 50 y 250 µl de

deoxicolato de sodio al 0.04% para ser vaciados en cajas petri y placas de cristal de 17X17 cm respectivamente. Cuando las cajas petri solidificaron se inocularon con todas las cepas anteriormente mencionadas (2.3.9.1) y las placas fueron inoculadas con 3 cepas control 8X3, IAP, P18 y 4 (C-) P 214, P 217, P 220 y P 221, haciéndose 5 repeticiones por cepa e incubándose por 11 días, después se tiñeron con el colorante violeta.

#### 2.3.5.3.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/l) DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN CAJAS PETRI CON CELOFÁN.

El medio se preparo como en la sección (2.3.5.2) en caja petri, y después que solidifico el medio se le colocó un círculo de celofán estéril de 9 cm de diámetro, posteriormente se inoculo con 3 cepas control IAP, P18, 8X3 y 5 (C-) P 813, P 217, P 218, P 220 y P 221, haciéndose 5 repeticiones por cepa. Se incubaron como en el caso anterior. Después del tiempo de incubación se quito el celofán con el micelio de cada cepa.

#### 2.3.6 MONTAJE DE LA CURVA PATRÓN CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE **Aspergillus niger**.

Se elaboró el medio( sección 2.3.5.2) y se vació en cajas petri y placas de cristal de 17X17 cm, se les hicieron pozos con una punta Gilson estéril, y se inocularon con 40 µl de las siguientes concentraciones de **Aspergillus niger** (20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1170 U/l), haciéndose 5 repeticiones e incubándose por 11 días a 28 °C. Después del tiempo de incubación se hicieron mediciones del diámetro de los halos.

### III. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.1 EVALUACIÓN DE HALOS CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE *Trichoderma sp.* PARA LA SELECCIÓN DEL COLORANTE Y LA CELULOSA .

Para evaluar la actividad de la celulasa en unidad de enzima, se midieron los halos formados en las placas después de cada tiempo de incubación. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza y de tendencias y se probó que se cumpliera la homogeneidad de la varianza por medio de las pruebas de Hartley y Bartlett.

El criterio que se tomó para seleccionar el colorante, fue que la placa una vez teñida presentara una coloración homogénea, que permitiera percibir con facilidad y en forma nítida el diámetro del halo formado. Para la celulosa fue que se formara un mayor halo al incrementarse el tiempo de incubación.

### 3.2 EVALUACIÓN DE HALOS CON 3 CONCENTRACIONES DE LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE *Trichoderma sp.* PARA LA SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE AGAR, CELULOSA MICROCRISTALINA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN.

Para evaluar la actividad de la celulasa en unidades de enzima, se midieron los halos formados en las placas después de cada tiempo de incubación. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza en bloques y se probó que se cumpliera la homogeneidad de la varianza por medio de la prueba de Hartley y de Bartlett. Cuando el análisis de varianza indica diferencia significativa o altamente significativa entre las variables estudiadas se realizaron pruebas de rango múltiple (Prueba de Duncan, LSD, Scheffe, Tukey, Tukey-modificado), para seleccionar las mejores condiciones.

### 3.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN UNIDADES DE ENZIMA, EN LA PLACA.

Para evaluar la actividad celulolítica para cada cepa, se midieron los halos formados en las placas después del tiempo de incubación. Los halos obtenidos se



---

extrapolaron en la curva patrón, para determinar las unidades de enzima que produce cada cepa.

### 3.4 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus** Y SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, DPMA Y TIAMINA.

Para evaluar el desarrollo vegetativo en cada cepa, se midieron los diámetros de los micelios formados en las cajas petri después del tiempo de incubación. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza para un diseño factorial en bloques y se probó que se cumpliera la homogeneidad de la varianza por medio de las pruebas de Hartley y Bartley. Cuando el análisis indica diferencias significativas entre las variables estudiadas se realizaron pruebas de rango múltiple (Prueba de Duncan, LSD, Scheffe, Tukey, Tukey-modificado), para seleccionar las mejores condiciones.

#### 3.4.1 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN UN MEDIO DE 2 CAPAS.

Para evaluar el desarrollo vegetativo en cada cepa, se midieron los diámetros de los micelios formados en las cajas petri después del tiempo de incubación. A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza para un diseño factorial en bloques y se probó que se cumpliera la homogeneidad de la varianza por medio de las pruebas de Hartley y Bartley. Cuando el análisis indica diferencias significativas entre las variables estudiadas se realizaron pruebas de rango múltiple (Prueba de Duncan, LSD, Scheffe, Tukey, Tukey-modificado), para seleccionar las mejores condiciones.

### 3.5 EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPAS 8X3.

El número de parámetros evaluados son 20 para cada celulosa disuelta en peptona al 0.05 y 0.1% y 10 para la celulosa disuelta en agua. Para evaluar el desarrollo vegetativo de la cepa 8X3 en los 50 medios probados, se midieron los diámetros de los micelios después de cada tiempo de incubación.

Las variables que se analizaron fueron los medios de suspensión de la celulosa (agua destilada, peptona al 0.05 y 0.1%), las diferentes concentraciones de la celulosa (0.05, 0.1, 0.3, 0.5 y 0.7%) y los tratamientos (A, B, C y D). Los

tratamientos con la misma letra se consideraron en un mismo grupo. Es decir los tratamientos **1A, 5A, 9A, 13A Y 17A** (para celulosa disuelta en peptona al 0.05 y 0.1% ) y **1A, 3A, 5A, 7A Y 9A** (para celulosa disuelta en agua); se consideraron dentro del mismo grupo porque todos tenían en su formulación la presencia de DPMA y glucosa, en el grupo **B** se evalúa la presencia de glucosa, en el **C** la presencia de DPMA y en el **D** la ausencia de ambos (glucosa y DPMA)

A los resultados obtenidos se les realizó una análisis de varianza para un diseño factorial en bloques, para ver si existía el efecto de interacción entre las variables y cuando el análisis indicó diferencia significativa o altamente significativa entre las variables estudiadas se realizaron pruebas de rango múltiple (Prueba de Duncan, LSD, Scheffe, Tukey, Tukey-modificado), para seleccionar las mejores condiciones. Posteriormente con este análisis se realizó una clasificación de los medios (lento, intermedio y rápido) de acuerdo a su velocidad de desarrollo vegetativo.

### 3.5.1 SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL.

Los medios fueron clasificados y posteriormente se escogió al azar 3 medios para cada tipo de desarrollo. Para evaluar el desarrollo vegetativo en cada cepa, se midieron los diámetros de los micelios formados en las cajas petri después del tiempo de incubación.

El criterio que se tomo para seleccionar el medio fue que no solo la cepa desarrollara micelio, si no que además formara halo.

### 3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/l) DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL.

Para evaluar la actividad de la celulasa, se midieron los halos formados en las cajas petri y las placas después del tiempo de incubación. A los resultados obtenidos se extrapolaron en la curva patrón, para conocer las unidades de enzima que produce cada cepa.

### 3.6.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA (U/I) DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN CAJAS PETRI CON CELOFÁN.

A los resultados obtenidos se les midió el diámetro de los halos formados y éstos fueron extrapolados en la curva patrón, para conocer las unidades de enzima, que produce cada cepa.

### 3.7 MONTAJE DE LA CURVA PATRÓN CON LA ENZIMA CELULOLÍTICA DE **Aspergillus niger**.

Se midieron los halos formados por cada concentración de la celulasa, con los resultados obtenidos se elaboro una curva patrón y se extrapolo el diámetro de las cepas para cuantificar las unidades de enzima que produce cada cepa.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un método para cuantificar el consumo de celulosa por cepas de *Pleurotus ostreatus*. Las celulosas que se eligieron fueron a partir de trabajos previos donde evaluaron la celulosa proveniente de varias fuentes como: algodón, pañal desechable, además de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa. El criterio para seleccionar la celulosa fue la formación de halo en el medio de prueba. Los resultados indicaron que las 2 últimas celulosas fueron las únicas que formaron halo (Ramírez, comunicación personal). Por ello para alcanzar el objetivo inicial de la presente investigación se evaluó el efecto de formación del halo en celulosa microcristalina y carboximetil celulosa.

#### 4.1 SELECCIÓN DEL COLORANTE Y LA CELULOSA.

Para montar un método que permita cuantificar el consumo de celulosa por diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, se tomo en cuenta una referencia donde se evaluó la degradación de pectinas, con enzimas pectinólíticas (Aguilar, 1991). Dicho método se modificó para ver si se podía adaptar para evaluar la actividad celulolítica de las cepas acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*.

Al evaluar la actividad de la enzima de *Trichoderma sp.* en las placas de cristal, éstas presentaron un halo difuso el cual no es fácil distinguir. Por ello se probaron diferentes colorantes para teñir la celulosa, con la finalidad de percibir en forma nítida el diámetro del halo formado. Se probaron 3 diferentes colorantes comerciales considerando que la mayoría de los materiales teñidos en las industrias textiles (algodón y lino, entre otros), están compuestos principalmente de celulosa, alcanzando en algunos casos hasta el 90 % de este polisacárido. De manera simultánea se probaron 2 colorantes químicamente puros, ocupados en trabajos similares, tal es el caso del azul brillante de remazol, el cual ha sido utilizado para teñir celulosa en medio líquido con el fin de evaluar el consumo de celulosa en forma cualitativa (Fajardo, 1990) (cuadro 4.1).

De los cinco colorantes probados: café, violeta, negro, azul brillante de remazol y rojo de rutenio, el colorante violeta fue el que presentó una tinción más homogénea y estable, permitiendo detectar con mayor facilidad el halo formado por el consumo de celulosa de la enzima.

**CUADRO 4.1: SELECCIÓN DEL COLORANTE PARA LA DETECCIÓN DEL HALO FORMADO POR LA CELULASA DE *Trichoderma* sp**

Colorante	Celulosa microcristalina			Carboximetil celulosa		
	Tinción	Halo		Tinción	Halo	
		Forma	Detección		Forma	Detección
Azul brillante de remazol	T	I	No	T	I	No
Café	T	I	No	T	I	No
Negro	T	I	No	T	I	No
Rojos de rutenio	O	D	Si	O	D	Si
Violeta	O	D	Si	O	D	Si

T: Traslúcida

O: Opaca

I: Irregular

D: Definido

A los resultados obtenidos para las 2 celulosas, se les realizó un análisis de varianza con la finalidad de observar si existía diferencia significativa entre ellas y sus tiempos de incubación (Cuadro 4.2).

Comparando las dos celulosas no existe diferencias significativas; por lo que se decidió analizarlas en sus tiempos de incubación. Para el primer tiempo de incubación no hubo diferencias significativas, es decir el diámetro de los halos fue igual en ambas celulosas. En el segundo tiempo si existió diferencia significativa entre los halos, siendo mayor para la celulosa microcristalina. Finalmente para el tercer tiempo, la diferencia fue altamente significativa, siendo nuevamente mayor el halo para la celulosa microcristalina. Además como se tomaron tiempos igualmente espaciados se aplicó un análisis de tendencias para conocer si existía un efecto lineal o cuadrático en la formación del halo a medida que se incrementa el tiempo de incubación. Los resultados del análisis de tendencia nos predice un efecto lineal (altamente significativo). Es decir a medida que se aumenta el tiempo de incubación se incrementa el diámetro del halo en el medio de celulosa, independientemente del tipo de celulosa (Celulosa microcristalina y carboximetil celulosa). Las repeticiones no presentaron diferencias significativas, lo que indica que el número de repeticiones realizadas fue suficiente. Por lo anterior expuesto se decidió utilizar la celulosa microcristalina para las siguientes pruebas

CUADRO 4.2: HALOS FORMADOS POR LA CELULASA DE *Trichoderma sp.* EN AGAR SOBRE DOS TIPO DE CELULOSA, A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN.

Tiempo de incubación ( horas )	Diámetro de halos (mm) $\bar{x} \pm \sigma$	
	Celulosa microcristalina	Carboximetil celulosa
1	3.5 ± 0.9	3.2 ± 0.4
3	5.6 ± 0.6	5.0 ± 0.6
5	6.4 ± 0.5	5.8 ± 0.4

#### 4.2 SELECCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DE LAS CONCENTRACIONES DE CELULOSA Y AGAR BACTERIOLÓGICO.

Los resultados anteriores indicaron que la mejor celulosa fue la microcristalina y el colorante violeta, por lo cual se procedió a probar en éstos, diferentes concentraciones de: celulosa y agar, así como diferentes tiempos de incubación para encontrar las condiciones óptimas para detectar el mayor halo en las placas de cristal.

Se probaron 10 tiempos de incubación, debido a que no se conocía el diámetro máximo de la enzima en los medios probados y además considerándose que el medio sobre la placa sufre deshidratación a tiempos de incubación largos.

Por otra parte la concentración de agar es importante, ya que la falta de consistencia en las placas no permite obtener un registro de los halos. En placas con baja concentración de agar, generalmente durante su tinción éstas se rompan, por lo tanto se probaron 3 concentraciones de agar bacteriológico.

---

También se evaluaron 5 concentraciones de celulosa (tratada por el método Walseth), para encontrar la concentración óptima en donde la celulosa estuviera presente de una forma más disponible, y desarrollara el mayor halo debido al consumo de este polisacárido por la enzima.

Para evaluar el efecto de dichas variables se aplicó un diseño factorial en bloques encontrándose diferencias significativas para cada una de las variables.

Posteriormente se les aplicaron las pruebas de rango múltiple, para determinar las concentraciones de celulosa, agar y tiempo de incubación óptimos.

Con los resultados obtenidos se observó que al ir incrementándose el tiempo de incubación en días, el diámetro del halo fue aumentando, excepto para los días 3, 4 y 7 donde no hubo incremento significativo; siendo el diámetro del halo igual para estos 3 tiempos. Posteriormente para el día 14 el diámetro fue menor que para los días 8, 11 y 13; esto es debido a que la placa se deshidrató antes de que el halo alcanzara su máximo diámetro.

Los tiempos de incubación de 11 y 13 días son considerados iguales, ya que no hubo diferencias significativas entre los diámetro de sus halos (Cuadro 4.3). Por ello, se decidió dejar incubar por 11 días las siguientes pruebas experimentales.



CUADRO 4.3: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE EL HALO PRODUCIDO POR LA CELULASA DE *Trichoderma sp.*

Tiempos de incubación (días)	Diámetro de halos (mm) $\bar{x} \pm \sigma$	Clasificación de acuerdo a la Prueba de Duncan				
1	3.1 $\pm$ 2.3	a				
2	4.4 $\pm$ 2.8		b			
3	5.8 $\pm$ 3.7			c		
4	5.9 $\pm$ 4.0			c		
7	5.9 $\pm$ 4.6			c		
14	7.0 $\pm$ 4.3				d	
10	7.1 $\pm$ 4.6				d	
8	7.6 $\pm$ 5.1					e
11	7.8 $\pm$ 5.3					e f
13	8.0 $\pm$ 4.8					f

\* Letras diferentes indican que existe diferencias significativas entre los tiempos de incubación para un nivel de significancia del 0.05%. La DMSH fue de 0.366

A pesar de que el análisis estadístico indicó que el mayor halo se obtenía a una concentración del 1% de agar, se decidió elegir el 1.5%, ya que el diámetro del halo es igual al del 2%. Además al elaborar las placas éstas resisten la manipulación durante el lavado y tinción, permitiendo su fijación sobre acetatos (Cuadro 4.4)

CUADRO 4.4: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGAR SOBRE LA FORMACIÓN DE HALO POR LA CELULASA DE *Trichoderma sp.*

Concentración de agar bacteriológico (%)	Diámetro de halos (mm) $\bar{x} \pm \sigma$	Clasificación de acuerdo a la Prueba de Duncan
2.0	6.2 $\pm$ 4.4	a
1.5	6.1 $\pm$ 4.5	a
1.0	6.5 $\pm$ 4.6	b

\* Letras diferentes indican que existe diferencias significativas entre las concentraciones de agar bacteriológico para un nivel de significancia del 0.05%. La DMSH fue de 0.148

Los resultados indican que a medida que va disminuyendo la concentración de celulosa microcristalina en el medio, se incrementa el diámetro del halo; esto es debido a que es más fácil para la celulasa degradar la celulosa mientras su concentración es baja. Por lo tanto se eligió la concentración de 0.1% de celulosa microcristalina, para las siguientes pruebas (Cuadro 4.5).

Las repeticiones no presentaron diferencias significativas, lo que indica que el número de repeticiones realizadas fue suficiente.

CUADRO 4.5: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CELULOSA MICROCRISTALINA SOBRE LA FORMACIÓN DE HALO POR LA CELULASA DE *Trichoderma sp.*

Concentración de celulosa microcristalina (%)	Diámetro de halos (mm) $\bar{x} \pm \sigma$	Clasificación de acuerdo a la Prueba de Duncan			
0.5	5.2 $\pm$ 4.2	a			
0.4	5.3 $\pm$ 4.1	a			
0.3	6.4 $\pm$ 4.8		b		
0.2	6.8 $\pm$ 4.4			c	
0.1	7.7 $\pm$ 4.5				d

\* Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las concentraciones de celulosa para un nivel de significancia del 0.05%. La DMSH fue de 0.233

#### 4.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA, EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*.

En resumen los resultados experimentales indicaron que el mejor tiempo de incubación fue 11 días, las mejores concentraciones de agar y de celulosa microcristalina (disuelta en amortiguador de acetatos) fueron 1.5 y 0.1% respectivamente. Con estas variables, se procedió a elaborar placas de 17X17 cm de lado, donde se evaluó las unidades de enzima producidas por las cepas de *Pleurotus ostreatus*, no obteniéndose resultado alguno. El inoculo de cada cepa no presentó desarrollo vegetativo.

---

#### 4.4. EVALUACIÓN DE 5 CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, UNA DE DPMA Y UNA DE TIAMINA, SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**.

Al utilizar el medio de celulosa microcristalina disuelta en amortiguador de acetatos, éste no permitió el desarrollo vegetativo de las cepas. Posiblemente la falta de desarrollo en el medio fue ocasionado por una deficiencia de nutrientes, por lo anterior se decidió utilizar como complemento 5 concentraciones de glucosa como fuente alterna de carbono además de extracto de malta deproteínado (DPMA), el cual proporciona nitrógeno, carbohidratos solubles y vitaminas, y la ausencia y presencia de tiamina, como precursor de crecimiento. Sin embargo, de nuevo las cepas no presentaron desarrollo vegetativo.

##### 4.4.1 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS CEPAS DE **Pleurotus ostreatus**, EN UN MEDIO DE 2 CAPAS, EN CAJAS PETRI.

Ramírez (1989), utilizó un medio compuesto de 2 capas para evaluar el consumo de celulosa de manera cualitativa. En este medio formado por dos capas se aprecia la formación del halo. Considerando este hecho, se evaluaron nuevamente los medios anteriores. Pruebas posteriores indicaron que el incremento de nutrientes nuevamente no permitía el desarrollo micelial y la formación de halo, por lo que se decidió sustituir el amortiguador de acetatos ya que posiblemente no solo servía para amortiguar el pH del medio, sino que estaba inhibiendo el desarrollo vegetativo de las cepas de **Pleurotus ostreatus**.

#### 4.5 EVALUACIÓN DE LA CELULOSA DISUELTA EN 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA.

Se decidió sustituir el amortiguador de acetatos por agua destilada, considerando que ésta no proporciona nutrientes al medio sino con la finalidad de suspender la celulosa microcristalina. Además se evaluaron 2 concentraciones de peptona 0.05 y 0.1% como fuente de nitrógeno orgánico para observar si se propiciaba el desarrollo vegetativo (Fajardo, 1990). De manera simultánea se probaron nuevamente 5 concentraciones de celulosa para cada una de las variables indicadas previamente, así como la adición y ausencia de DPMA y glucosa (Cuadros 2.3 y 2.4).

---

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para las primeras evaluaciones sólo se probó la cepa control o dicariote 8X3, ya que se conoce que es una cepa con crecimiento vigoroso, gran capacidad para formar primordios, permite una degradación selectiva de la lignina y además a partir de sus 2 componentes neohaplontes se obtuvieron las mutantes acelulolíticas que dieron origen a una serie de dicariotes (C-) (Leal, 1974 ).

Los resultados experimentales obtenidos de las variables se interpretaron por medio de un análisis de varianza factorial en bloques. Dicho análisis indico que existían diferencias significativas para las interacciones dobles entre las variables y no hubo diferencia significativa para la triple interacción. Posteriormente, se aplicaron las pruebas de rango múltiple para seleccionar las mejores condiciones (Cuadros 3.6, 3.7 y 3.8).

La prueba de Duncan indica que el desarrollo vegetativa más rápido se obtienen utilizando tanto celulosa disuelta en agua como en peptona al 0.1%, con las concentraciones mas bajas de celulosa (0.05 y 0.1%), así como para la celulosa al 0.3% disuelta en agua destilada. Los medios que dieron un desarrollo vegetativo intermedio fueron utilizando peptona al 0.1% con celulosa al 0.7, 0.5 y 0.3 %; la peptona al 0.05% con celulosa al 0.05% y celulosa al 0.5% en agua. El desarrollo más lento se presento con las máximas concentraciones de celulosa 0.5 y 0.7% disueltas en peptona al 0.05% y celulosa al 0.7% en agua destilada.

**CUADRO 4.6: EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS 5 CONCENTRACIONES DE CELULOSA MICROCRISTALINA Y LAS 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA 8x3.**

Medio de suspensión de la celulosa	Concentraciones de la celulosa microcristalina (%) $\bar{x} \pm \sigma$									
	0.05		0.1		0.3		0.5		0.7	
Peptona 0.05%	54±15	c	49±15	b	46±12	b	33±9.6	a	32±6.6	a
Peptona 0.1%	65±6.8	d	65±9.4	d	54±3.9	c	55±11	c	52±7.5	c
Agua destilada	66±9.1	d	70±4.2	d	67±3.5	d	53±11	c	29±33	a

\* Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de los halos (mm) para las interacciones de celulosa microcristalina por los medios de suspensión de la celulosa para un nivel de significancia del 0.05%.

De los cuatro tratamientos los que dieron un desarrollo vegetativo rápido fueron con celulosa disuelta en peptona al 0.1% con los tratamientos A, C, y D, así como para celulosa disuelta en agua destilada con el tratamiento A. Un desarrollo intermedio se presentó con celulosa disuelta en peptona al 0.1% con los tratamientos B y D, celulosa en peptona al 0.05% o en agua con el tratamiento C. El desarrollo más lento se obtuvo con celulosa disuelta en peptona al 0.05% con el tratamiento B.

**CUADRO 4.6: EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS 5 CONCENTRACIONES DE CELULOSA MICROCRISTALINA Y LAS 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA Y AGUA DESTILADA SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA 8x3.**

Medio de suspensión de la celulosa	Concentraciones de la celulosa microcristalina (%)									
	$\bar{x} \pm \sigma$									
	0.05		0.1		0.3		0.5		0.7	
Peptona 0.05%	54±15	c	49±15	b	46±12	b	33±9.6	a	32±6.6	a
Peptona 0.1%	65±6.8	d	65±9.4	d	54±3.9	c	55±11	c	52±7.5	c
Agua destilada	66±9.1	d	70±4.2	d	67±3.5	d	53±11	c	29±33	a

\* Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de los halos (mm) para las interacciones de celulosa microcristalina por los medios de suspensión de la celulosa para un nivel de significancia del 0.05%.

De los cuatro tratamientos los que dieron un desarrollo vegetativo rápido fueron con celulosa disuelta en peptona al 0.1% con los tratamientos A, C, y D, así como para celulosa disuelta en agua destilada con el tratamiento A. Un desarrollo intermedio se presentó con celulosa disuelta en peptona al 0.1% con los tratamientos B y D, celulosa en peptona al 0.05% o en agua con el tratamiento C. El desarrollo más lento se obtuvo con celulosa disuelta en peptona al 0.05% con el tratamiento B.

**CUADRO 4.7: EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS 4 TRATAMIENTOS Y LAS 2 CONCENTRACIONES DE PEPTONA AGUA DESTILADA SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO DE LA CEPA 8X3.**

Medio de suspensión de la celulosa	Tratamientos							
	A		B		C		D	
	$\bar{x} \pm \sigma$							
Peptona 0.05%	44±2.0	b	31±3.1	a	49±8.8	c	45±1.4	b
Peptona 0.1 %	60±9.8	e	50±6.2	c	64±5.5	e	57±1.0	d
Agua destilada	61±7.6	e	-	-	51±28	c	-	-

\* Letras minúsculas diferentes indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de los halos (mm) para las interacciones de tratamientos por los medios de suspensión de la celulosa para un nivel de significancia del 0.05%.

Al estudiar el efecto de los cuatro tratamientos y 5 concentraciones de celulosa microcristalina el mayor desarrollo vegetativo se obtuvo utilizando celulosa al 0.05 con los tratamientos A, C y D; celulosa al 0.1 con los tratamientos A y C y 0.3% con el tratamiento C. Un desarrollo intermedio fue con celulosa al 0.05% con el tratamiento B; celulosa al 0.1% con el tratamiento B y D; celulosa al 0.3% con los tratamientos A, B y D; celulosa al 0.5% con los tratamientos A, C y D y celulosa al 0.7% con los tratamientos A y B. Un desarrollo lento se obtiene utilizando celulosa al 0.5 con los tratamientos B y C y celulosa al 0.7% con el tratamiento D.



CUADRO 4.8: EFECTO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS 4 TRATAMIENTOS Y LAS 5 CONCENTRACIONES DE CELULOSA MICROCRISTALINA

Tratamientos	Concentraciones de celulosa microcristalina (%)									
	0.05		0.1		0.3		0.5		0.7	
	$\bar{x} \pm \sigma$									
A	62±5	h	68±8	h	57±7	f	45±22	c	43±18	b
B	43±16	b	39±18	b	42±14	b	37±2	a	42±14	b
C	67±7	h	65±7	h	60±9	h	51±12	e	33±36	a
D	66±2	h	58±7	g	47±11	d	44±19	c	38±4	a

\* Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de los halos (mm) para las interacciones de celulosa microcristalina por tratamientos para un nivel de significancia del 0.05%.

Por otra parte se probaron 3 tiempos de incubación (4, 7 y 11 días) ya que se desconocía la velocidad de crecimiento de la cepa 8X3 en estos medios evaluados. Los resultados obtenidos se analizaron considerando solo los diámetros del micelio a 7 días de incubación, ya que a 4 días el micelio empezaba a desarrollarse y a 11 días la mayoría de los medios ya habían llenado la caja petri.

El tiempo de incubación para las siguientes pruebas fue el que anteriormente se había elegido (11 días ya que a mayor tiempo el medio se deshidrata en las placas).

Al comparar estos resultados con los experimentos anteriores donde se evaluaron concentraciones de celulosa inoculadas con la enzima se observa que, tanto el mayor halo, como el mayor desarrollo micelial se obtienen en concentraciones bajas de celulosa.

#### 4.5.1 SELECCIÓN DE LOS MEDIOS CONSIDERANDO LA VELOCIDAD DE DESARROLLO MICELIAL.

Una vez que la cepa 8x3 presentó desarrollo micelial se procedió a elegir aleatoriamente 3 medios en donde su desarrollo fuera rápido, intermedio y lento, con el objeto de no solo elegir aquel donde haya desarrollo, sino además se observe la formación de halo en el medio. Para ello se adicionó deoxicolato de sodio, para inhibir el crecimiento micelial y forzar a la cepa a que secrete las enzimas al medio para conocer su actividad enzimática en unidades de enzima.

En esta prueba se evaluaron todas las cepas control 8X3, Mo. 24, Mo. 36, IAP y P18 porque se deseaba encontrar aclaramiento del medio de celulosa en la periferia del inoculo después de los 11 días de incubación y así descartar la posibilidad de que las cepas control hayan perdido esta característica con el transcurso del tiempo o por las numerosas resiembras que han tenido.

En los medios que contenían celulosa suspendida en peptona al 0.05 y 0.1 % donde hubo desarrollo lento y rápido respectivamente, no se observó formación de halo, posiblemente porque las cepas se encontraban en un medio con suficientes nutrientes para seguir creciendo y por ello no atacaron a la celulosa. Por otro lado las cepas al haberse inoculado en los medios donde la celulosa se hallaba suspendida en agua y con menos nutrientes disponibles, formaron halo.

CUADRO 4.9: EVALUACIÓN DE LAS CEPAS CONTROL EN LOS 3 MEDIOS SELECCIONADOS, EN LA FORMACIÓN DE HALO Y DESARROLLO MICELIAL.

Medios	Cepas control				
	Diámetro del halo / micelio				
	$\bar{x} \pm \sigma$				
	IAP	P18	8X3	Mo. 24	Mo. 36
1	0.0 4.0±0.9	9.5±1.3 2.3±0.7	0.0 3.0±2.8	0.0 2.0±1.1	0.0 3.0±1.0
2	7.4±0.6 1.0±3.3	9.6±0.8 2.4±2.5	0.0 3.5±1.3	0.0 2.0±1.6	0.0 2.0±2.3
3	6.8±1.9 1.6±0.5	10.3±1.9 2.3±0.5	2.6±2.0 9.7±2.6	0.0 4.0±1.8	0.0 3.0±2.1

En los 3 medios probados con celulosa disuelta en agua destilada solo algunas cepas formaron halo Para el medio 1 que contenia 1.5% agar bacteriológico, 0.1% de celulosa microcristalina suspendida en agua destilada, 1% de DPMA y 0.05% de glucosa, de las 5 cepas control que se probaron solo la cepa P18 presento formación de halo Para el medio 2 que contenia 1.5% agar bacteriológico, 0.1% de celulosa suspendida en agua destilada y 1% de DPMA las cepas IAP y P18 presentaron halo Por último el medio 3 que contenia 1.5% agar bacteriológico, 0.3% de celulosa microcristalina suspendida en agua destilada y DPMA al 1%, permito detectar con mayor facilidad el halo formado y correlacionar con las unidades de enzima producida para las cepas 8X3, IAP y P18. Por tal motivo se eligio el medio en donde la mayoría de las cepas formaron halo. Este medio quedo constituido de la siguiente manera para caja petri y placa de cristal (Cuadro 4.10)

**CUADRO 4.10: COMPONENTES DEL MEDIO SELECCIONADO.**

Componentes	Cajas petri de 9 cm de diámetro	Placas de cristal de 17X17 cm
Celulosa microcristalina suspendida en agua destilada al 0.3% (ml)	2.1	10.5
Agar bacteriológico al 1.5% (g)	0.075	0.375
DPMA al 1% (ml)	4.9	24.5
Deoxicolato de sodio al 0.05% (g)	0.0035	0.0175
Volumen total (ml)	7	35
Espesor (cm)	0.12	

Con el medio seleccionado se realizó la curva patrón, para extrapolar el diámetro del halo de las cepas evaluadas y así obtener la cantidad de enzima secretada por cada cepa (Cuadro 4.11).

La curva patrón se elaboró a partir de los resultados obtenidos en cajas petri de los diámetros de los halos formados por las diferentes concentraciones de la enzima. En placas de cristal no hubo formación de halos debido a problemas de contaminación.

CUADRO 4.11: ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN CON LA ENZIMA CELULASA DE *Aspergillus niger*.

Concentración de la enzima (U/l)	Diámetro del halo (cm)
700	0.00
800	1.00
900	1.20
1000	2.03
1170	2.98
Coeficiente de correlación 0.978	
Pendiente 0.006	
Intercepto - 4.146	

Con las concentraciones de la enzima (20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 ) no se observó formación de halo. El coeficiente de correlación fue significativo.

#### 4.6.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* EN CAJAS PETRI Y PLACAS DE CRISTAL.

Se evaluaron las cepas de *Pleurotus ostreatus* sobre el medio seleccionado, tanto en placas de cristal como en cajas petri, de las cepas inoculadas en placas algunas desarrollaron micelio, pero no halo y otras sufrieron contaminación. Algunas de las cepas inoculadas en cajas petri formaron halo y sus diámetros obtenidos de los halos se extrapolaron con la curva patrón obteniéndose los siguientes resultados (Cuadro 4.12).

Las cepas de la P214 a la P223 son clasificadas como acelulolíticas (C-). Las cepas P 215, P216, P 218 y P 221 en todas sus repeticiones hubo formación de halo después de su micelio, en cambio en las cepas P 214, P217, P219, P 220 y P222 solo en algunas repeticiones se apreció la formación de un halo muy pequeño. En todas estas cepas el crecimiento del micelio fue rápido y en algunas ocasiones este ocultó el halo como probablemente paso con la cepa P 223, en el cual no se apreció halo alguno en ninguna de sus repeticiones.

---

Los monocariotes silvestres P 404, P 406, P 409, P 411, P 412 y P 417 caracterizadas como celulolíticas, presentaron un crecimiento micelial rápido pero en ninguna de sus repeticiones hubo formación de halo.

Las cepas P 813 y P 816 son dicariotes (C-) acelulolíticas. Estas 2 cepas presentaron formación de halo en más de la mitad de sus repeticiones.

Las cepas control de tipo monocariótico Mo. 24 y Mo. 36 no presentaron halo, en ninguna de sus repeticiones; en cambio las cepas dicarióticas IAP, P18 y 8X3 formaron un halo muy pequeño en casi todas sus repeticiones.

CUADRO 4.12: COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA CONSUMIR CELULOSA DE DIFERENTES CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* EN FORMA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA.

Cepas	Clasificación cualitativa previa		Evaluación cuantitativa	
	Halo		Halo	U/I
P 214	C-		C+	1169.57
P 215	C-		C+	1104.08
P 216	C-		C+	1048.94
P 217	C-		C+	1069.61
P 218	C-		C+	1345.33
P 219	C-		C+	1061.00
P 220	C-		C+	1117.87
P 221	C-		C+	1252.28
P 222	C-		C+	1000.69
P 223	C-		C-	0.0
P 404	C+		C-	0.0
P 406	C+		C-	0.0
P 409	C+		C-	0.0
P 411	C+		C-	0.0
P 412	C+		C-	0.0
P 417	C+		C-	0.0
Mo. 24	C+		C-	0.0
Mo. 36	C+		C-	0.0
P 813	C-		C+	824.06
P 816	C-		C+	1017.92
8X3	C+		C+	874.89
PI8	C+		C+	883.51
IAP	C+		C+	897.29

Todas las cepas clasificadas previamente como acelulolíticas producen más unidades de enzima que las cepas control, excepto la cepa P 813 que produce menos a los control y la P223 que no formo halo.

En trabajos anteriores cepas de *P. ostreatus* fueron mutadas y mejoradas genéticamente para producir cepas acelulolíticas que permitan una delignificación selectiva de los sustratos lignocelulósicos. Para evaluar su capacidad celulolítica, se les probó en diferentes medios (agar-papel filtro con diferentes suplementos y carboximetil celulosa con extracto de malta). Bajo estas condiciones las cepas son clasificadas como celulolíticas (C+) cuando presentan halo y consumen celulosa y acelulolíticas (C-) cuando no presentan halo y consumen menos celulosa que las cepas control, por lo que producen una delignificación selectiva (Ramírez, 1989 y Fajardo, 1990). Considerando estos criterios los resultados que se obtuvieron fueron que las cepas (C-) evaluadas formaron halo y consumieron más celulosa que las cepas (C+). De las cepas (C+) solo formaron halo 3 de las control 8X3, IAP, y PIB. Es posible que la ausencia de formación de halo en las cepas (C+) probadas, se deba a que quizá el micelio ocultaba el halo y no a la falta de consumo de celulosa. Las cepas (C-) algunas presentaron halo pero no en todas sus repeticiones, además en algunos casos la formación de halo era muy pequeño, por lo tanto se considera que el halo estaba siendo ocultado por el micelio.

Por lo expuesto anteriormente se volvieron a clasificar las cepas evaluadas, ya que se consideró que con esta técnica montada se cuantificaron las unidades de enzima que producen y no solo la formación del halo como las clasificaciones cualitativas anteriores.

#### 4.6.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN UNIDADES DE ENZIMA DE LAS CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*, EN CAJAS PETRI CON PAPEL CELOFÁN.

Para comprobar que el micelio no estaba ocultando el halo formado, se colocó una película de celofán en el medio y se probaron 7 cepas que habían formado halo (para asegurarse que sí hubiera formación de halo). Las cepas después de los 11 días de incubación habían crecido favorablemente y al eliminar el papel celofán con el micelio, no se observó halo. Posiblemente el celofán no sirvió como una membrana permeable para dejar pasar los nutrientes, sino por su composición éste fue utilizado como nutriente, por lo que fue descartado.

ESTA TESIS NO ESTÁ  
CALI DE LA BIBLIOTECA

## V. CONCLUSIONES



---

## CONCLUSIONES

De las dos celulósas probadas se observó que la celulosa microcristalina es la más adecuada para detectar la formación de halo, ya que al irse incrementando el tiempo de incubación se percibe con mayor facilidad el mayor halo.

De los 5 colorantes probados el más adecuado para teñir a la celulosa en forma homogénea en la placa de cristal, fue el colorante violeta marca comercial, sin embargo la celulosa elaborará en cajas petri no se tiñó.

Bajo las condiciones estudiadas, el amortiguador de acetatos en cualquier medio, sin importar la presencia o ausencia de otros nutrientes como DPMA y glucosa, no permite que el micelio se desarrolle y forme halo.

La concentración óptima de agar bacteriológico para dar resistencia al medio es de 1.5% ya que con esta concentración la placa no se rompe y se puede transferir sobre acetatos, para así obtener un registro de los halos.

El tiempo adecuado de incubación para detectar el mayor halo es 11 días, ya que a mayor tiempo se deshidrata el medio en las placas.

El mejor vehículo para suspender la celulosa microcristalina es agua destilada, ya que además de favorecer el crecimiento micelial de las cepas, permitió distinguir con mayor facilidad la formación de los halos, debido al consumo de celulosa.

De los 85 medios evaluados, 50 favorecieron el desarrollo vegetativo y en los 35 restantes no se pudo observar.

El medio seleccionado para cuantificar las unidades de enzima de las cepas de **Pleurotus ostreatus**, quedo constituido de la siguiente manera por caja petri.

Componentes	Caja petri de 9 cm de diámetro
Celulosa microcristalina suspendida en agua destilada al 0.3% (ml)	2.1
Agar bacteriológico al 1.5% (g)	0.075
DPMA al 1% (ml)	4.9
Deoxicolato de sodio al 0.05% (g)	0.0035
Volumen total (ml)	7
Espesor (cm)	0.12

El medio elaborado en placas de cristal es una buena alternativa para evaluar varios inoculos de distintas cepas en periodos de incubación cortos, en este caso con **Pleurotus ostreatus**, se presentó el problema de competencia con otros microorganismos por el sustrato (contaminación aérea por mohos y bacterias) debido a que el tiempo de incubación es muy largo. El halo fue observado solamente en cajas petri.

Todas las cepas estudiadas en este trabajo hablan sido clasificadas con un método cualitativo, la técnica que se monto, nos permitió evaluarlas cuantitativamente. Las cepas fueron reclasificadas, ya que probablemente con el transcurso del tiempo y después de numerosas resiembras, probablemente han perdido ciertas características.

La técnica montada permitió evaluar la capacidad celulolítica de las cepas de **Pleurotus ostreatus** en unidades de enzima.

## RECOMENDACIONES.

La técnica montada permitió cuantificar las unidades de enzima que produce cada cepa evaluada, sin embargo faltaría por realizar el cultivo de estas cepas y evaluar en los sustratos delignificados el consumo de sus componentes (celulosa y lignina) por medio de un análisis químico. Conociendo la cantidad de celulosa degradada se podría correlacionar el consumo de celulosa con la capacidad celuloítica en unidades de enzima.

## VI. REFERENCIAS

- Aguilar G, Delgado L, Trejo B, y Huitrón C. 1991. "Pectinasas de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 obtenidas por fermentación a partir de pectina y subproductos agroindustriales" IV Congreso nacional de micología. 106
- Ahmedova Z.R. 1991. "Cellulases and ligninases of basidiomycetes". Cellulósicos, pulp, fibre and environmental aspects. In Ellis Horwood (Ed). England. 371-376
- Alcantará H.M. 1990. "Mejoramiento genético de cepas acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*". Tesis de Licenciatura Universidad de Motolinía. México D.F.
- Alexopoulos C.J. 1979. "Introducción a la micología". 3 Ed. Editorial universitaria de Buenos Aires.
- Bello M.R, y Ramos Z. J.M. 1993. "Alternativas para el aprovechamiento de los desechos agropecuarios". En producción de hongos comestibles por Sánchez V. J. E. Centro de investigaciones ecológicas del sureste. Cuaderno de trabajo No. 1. 99-107.
- Bis'ko N.A. and Bilay V.T. 1992. "The growth of *Pleurotus ostreatus* en lignocellulosic materials". Micol. Neotrop. Apl. 5: 49-57.
- Blazej A. and Kosik M. 1993. "Environmentally acceptable conversion technology for the biochemical utilization of lignocellulosics". En Cellulosics, pulp, fibre and enviromental aspects. Ed Ellis Horwood. England.355-364.
- Border D. 1993. "Alternatives to peat ". Mushroom journal. 523: 23-24.
- Coughlan M.P and Ljungdahl L.G. 1988. "Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems". En: Biochemistry and genetics of cellulose degradation. Eds. Aubert J, Beguin P and Millet J. FEMS Symposium No. 43. Academic Press. 11-30.
- Coughlan M.P. 1990. "Cellulose degradation by fungi". Fogarty W.M and Kelly C.T. en Microbial enzymes and biotechnology, 2 Ed. El sevier applied science. 1-28.
- Chang S.T. 1980. "Mushrooms as human food". Bioscience (30) 6: 399-401.
- Chang S.T and Miles P.G; 1989. "Edible mushrooms and their cultivation". CRC Press Boca Raton. 265-274.

---

Cisneros M.B. 1984. "Manejo y disposición de la basura". Tesina de Licenciatura. UAMI, México D.F. 1-23.

Cruz C.R. Juárez R.C. y García M.C. 1980. "Estudio preliminar sobre la utilización del bagacillo por vía microbiana". En la utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal por Mayra de la Torre. CINVESTAV. 145-158.

Deacon J. W. 1988. "Introducción a la micología moderna". Limusa 350 p.

De la Torre M. M. M. 1981. "Producción de proteínas a partir de residuos lignocelulósicos". Ciencia y Desarrollo 111-116.

Eger G. 1978. "Biology and breeding **Pleurotus**." In the biology and cultivation of edible mushrooms. Chang S.T. and Hayes W.A. Academic Press, Nueva York. 497-519.

Escobar A. y Muramatsu K. 1992. "Recuperación de desechos plásticos". Contactos UAM 5: 45-49.

Eriksson K. E. 1978. "Enzyme mechanisms involved in cellulose hidrolisis by the rot fungus **Sporotrichum pulveruleum**". Biotechnology and bioengineering 20: 317-332.

Eriksson K. E. 1988. "Microbial delignification basics, potentials and applications". En Biochemistry and genetics of cellulose degradation. Eds. Aubert J, Beguin P and Millet J. FEMS Symposium No. 43. Academic Press. 285-302.

Esau K. 1985. "Anatomía vegetal". Omega, Barcelona, 50-82.

Eugenio C.P. y Anderson N.A. 1968. "The genetics and cultivation of **Pleurotus ostreatus**". Mycologia 60: 627-634.

Fajardo O.M.C. 1990. "Evaluación de mutantes acelulolíticas de **Pleurotus ostreatus**". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.

Fernández S y Valenzuela P. J. 1980. "Biodegradación microbiana de celulosa en masilla residual de la industria cervecera". En la utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal por Mayra de la Torre. CINVESTAV. 193-200.

Ginterová A, Hrabovcová J. and Manzur M. 1992. "Cultivation of fungi on sugar cane biomass". Folia Microbiol. 37(1):60-65.

- Guzmán G. 1977. "Identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera". Limusa. 194p.
- Guzmán G; 1985. "Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café". En Ciencia y Desarrollo 65 41-48.
- Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto V.C. y Guzmán D.L. 1993. "El cultivo de los hongos comestibles". IPN. México D.F.
- Han Y.W and Callihan C.D. 1974. "Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth" Applied microbiology. 27(1): 159-165
- Herrera T. y Ulloa M. 1990. "El reino de los hongos. Micología básica y aplicada". UNAM. FCE, México D.F.552p.
- Kirk T. and Shinada M. 1985 "Biosynthesis and biodegradation of wood components". Academic Press. 579.
- Krieger L. C 1967. "The mushroom handbook". Dover publication INC. New York.
- Leal L. H. 1980a. "Sporlessness in the basidiomycete **Pleurotus ostreatus** (Jacq. ex Fr.) Kummer. A genetical study by means of a new dikaryotization method". Tesis Doctoral. Universidad de Phillips, Alemania Federal.
- Leal L.H; 1980b. "Utilización de desperdicios con alto contenido de lignina a través del cultivo de hongos comestibles de la pudrición blanca". En la utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal por Mayra de la Torre. CINVESTAV. 262.
- Lehninger A.L. 1985. "Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular". 2 Ed. Ediciones Omega. Barcelona, 273-274.
- Levanon D, Dosoretz C, Motro B. and Kahn Y. 1984. "Recycling agricultural wastes for mushroom casing". Mushroom Journal. 133: 13-17.
- Lu S.I. 1988. "A new strategy for genetic improvement of edible fungi through enhancement of their lignocellulose degrading and fruiting abilities". Mic. Neotrop. Aplic. 1:5-19.

---

Madlnaveita F, Solís A, Medrano H. y Quintero J. 1980. "Proyecto para: obtención de proteínas microbianas y mejoradores de suelos a partir del aserrín. Aislamiento de *Trichoderma sp.*". En la utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal por Mayra de la Torre. CINVESTAV. 253- 258.

Martínez D, Quirarte M, Soto C, Salmones D. y Guzmán G. 1984 "Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agro-industriales en México". Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 207-219.

Martínez C.D, Soto V.C y Guzmán G. 1985. "Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de café con paja como sustrato". Rev. Mex. Mic. 1: 101-108.

Martínez C.D, Morales P. y Sobal M. 1988a. "Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada". Rev. Mex. Mic. 4: 153-160.

Martínez C.D. 1988b. "Hibridación entre cepas de *Pleurotus ostreatus* de México y Guatemala". Rev. Mex. Mic. 4: 281-286.

Martínez C. D. y Larqué S. A. 1990. "Biotecnología en la producción de hongos comestibles". Ciencia y desarrollo. 95: 53-64.

Martínez C. D, Larqué S. A, Morales P, Sobal M, Martínez W. y Aguilar A. 1993. "Los hongos comestibles en México: Biotecnología de su reproducción". Ciencia y Desarrollo. 41-49.

Mata G. y Martínez C.D. 1988. "Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México". Rev. Mex. Mic. 4: 287-296.

Morales P. 1987. "El cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de cardomomo". Rev. Mex. Mic. 3:71-73.

Padilla H.F. 1990. "Mejoramiento genético de una mutante acelulolítica (C-) de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México D.F.

Peña A. J. C. y Barba C.J.M. 1994. "Cultivo de *Lycoperdales* en residuos agroindustriales". V Congreso nacional de micología. Guanajuato. 61.



- Pérez C.C. y Alfaro M.C. 1994. "Evaluación de tres sustratos (maíz-frijol-cebada) para la producción de *Pleurotus ostreatus* y *P. djamour* en Chapingo, México". V Congreso nacional de micología, Guanajuato. 72.
- Philippidis G. P, Smith T. K and Wyman C.E. 1993. "Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process". *Biotechnology and bioengineering* 41:46-853.
- Ramírez C.R. 1989. "Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa". Tesis de maestría en biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Rinker D.L. 1991. "Flax shive as a substrate for oyster mushroom production". *Micol. Neotrop. Apl.* 4:1-7.
- Salmones D. 1994. "Cultivo de *Volvariella volvacea* en residuos agroindustriales en México". V. Congreso nacional de micología, Guanajuato. 59.
- Sánchez V.J.E. y Calvo B. L. A. 1994. "Cultivo de *Auricularia fuscusuccinea* (mont) Farlow sobre sustratos agrícolas en el sureste de México". V. Congreso nacional de micología, Guanajuato. 68.
- Shandilya T.R. 1976. "Prepare mushroom compost on wheat straw plus chicken manure". *Ind. J. Mushrooms.* 2(1):43-48.
- Shandilya T.R. 1978. "Farmyard manure as casing medium". *Mushroom Journal* 62: 46-50.
- Sobal M. y Martínez C.D. 1988. "Potencial de entrecruzamiento de diferentes cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus*, aisladas a partir de diversos sustratos". *Mic. neotrop. aplic.* 1: 21-27.
- Soto V.C, Guzmán D.L. y Rodríguez O. 1989. "Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de maguey tequilero fermentado y mezclado con paja de trigo". *rev. Mex. mic.* 5: 97-101.
- Trigos A y Martínez C.D. 1992. "Identificación de ergosterol en *Pleurotus ostreatus*". *Micol. neotrop. apl.* 5:11-15.

---

Villaseñor I.L. Soto V.C. y Rodríguez R. 1994. "Aprovechamiento de hojarasca de parques y jardines públicos, para cultivar **Pleurotus spp.**" V. Congreso nacional de micología, Guanajuato. 107.

Zadrazil 1974. "The ecology and industrial production of **Pleurotus ostreatus**, **Pleurotus florida**, **Pleurotus cornucopiae**, and **Pleurotus eryngii**". Mushroom science IX. 621-652.