

Resumen

En el reino Fungi existen diversas especies de hongos capaces de causar pudrición blanca de la madera, descomponiendo la lignina y la celulosa. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar, a partir de muestras de madera en descomposición, hongos filamentosos con potencial actividad ligninolítica, que puedan ser aplicados a futuros proyectos biotecnológicos. Se han colectado aleatoriamente muestras de carpóforos pertenecientes al phylum Basidiomycota con la particularidad de provocar pudrición de la madera. El lugar de recolección fue la propiedad privada de la familia Hostettler (S 26° 38.116' O 055°39.802' 264 m) que se encuentra dentro de la reserva de San Rafael, ubicada a 167 Km de la ciudad de Encarnación, Departamento de Itapúa, Paraguay. Se lograron aislar e identificar 2 hongos con dichas propiedades: *Trametes* sp. y *Polyporus* sp., siguiendo las claves taxonómicas para su identificación. La capacidad de estos hongos para ser utilizados en la biorremediación y en las industrias permite que éstos sean un recurso biotecnológico sumamente importante.

Palabras clave: Reserva de San Rafael, Hongos de pudrición blanca, actividad ligninolítica.

Abstract

In the Fungi kingdom there are several species of fungi capable of causing white-rot of the wood, decomposing lignin and cellulose. The objective of this work was to isolate and identify, from samples of decaying wood, filamentous fungi with ligninolytic activity, which can be applied to the future in biotechnology. Samples of carpophores belonging to the phylum Basidiomycota have been collected randomly with the particularity of causing wood rot. The place of collection was the private property of the Hostettler family (S 26° 38.116' W 055°39.802' 264 m) that is located within the San Rafael reserve, located 167 km from the city of Encarnación, Department of Itapúa, Paraguay. They were able to isolate and identify 2 fungi with these properties: *Trametes* sp. and *Polyporus* sp., following the taxonomic keys for identification. The ability of these fungi to be used in bioremediation and in the industries give them an extremely important biotechnological resource.

Keywords: San Rafael Reserve, White-rot fungi, ligninolytic activity.

¹Magíster en Biotecnología en Alimentos, Profesoras Investigadoras de la UNI

²Doctora en Ciencias Aplicadas (Biotecnología), Universidad Nacional de Misiones, Argentina

Recibido: 07/10/2019 **Aceptado:** 03/12/2019

Introducción

A nivel mundial, se estima que existen más de 1,5 millones de especies de hongos. Estos se dividen en 5 phylum: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota (Hawksworth, 2001; Garcia et al., 2014). Dentro del phylum Basidiomycota, se encuentran la mayoría de los hongos causantes de la putrefacción de la madera (Encinas y Mora, 2016). La pudrición de madera es uno de los tipos de enfermedades más comunes en los árboles urbanos (Luley, 2005). Estos hongos poseen diversas propiedades que se podrían aprovechar en procesos biotecnológicos. Debido a que tienen la capacidad de degradar la madera hasta su total mineralización mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos (Hernández Mendieta et al., 2013; Orozco Mosqueda et al., 2015). La degradación fúngica implica la descomposición de los principales componentes de la pared celular: celulosa, hemicelulosas y lignina de diferentes modos y en proporciones distintas resultando en 3 tipos de pudrición: blanca, castaña y blanda (Murace et al., 2010).

Este grupo de hongos es el más importante dentro de los organismos responsables de la biodegradación del polímero natural más complejo que existe, la lignina. Para su degradación y mineralización, el hongo utiliza un complejo enzimático con actividades de oxidasas y peroxidasas (Quintero Díaz, 2011; García Ortiz et al., 2017). Otra enzima de amplia distribución entre los hongos de pudrición blanca es la lacasa, también importante para su aplicación en biotecnología (Orozco Mosqueda et al., 2015).

La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar, a partir de muestras de madera en descomposición de la Reserva de San Rafael, hongos filamentosos con

potencial actividad ligninolítica, que puedan ser aplicados a futuro en la biotecnología.

Materiales y métodos

La recolección de las muestras se realizó dentro de la propiedad privada de la familia Hostettler (S 26° 38.116' O 055°39.802' 264 m), ubicada en la reserva de San Rafael, a 167 Km de la ciudad de Encarnación, Departamento de Itapúa, Paraguay, en el mes de octubre del año 2018. Los basidiocarpos colectados fueron colocados en bolsas plásticas y conservados en heladera hasta su posterior análisis.

El aislamiento *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa. Para ello, se realizaron cortes de pequeñas porciones internas del contexto del basidiocarpo utilizando un bisturí. Para el lavado y desinfección de estas porciones, se procedió a utilizar una batería de desinfección descrita por Martínez (2016). La metodología consistió en el empleo de hipoclorito de sodio (NaClO) al 5 % (v/v), alcohol etílico al 70 % (v/v) y agua destilada estéril, los trozos de contexto fueron remojados durante 10 segundos en cada una de estas soluciones. Posteriormente, los pequeños fragmentos desinfectados se colocaron en placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA) al 3,9 % (Britania Lab®, Argentina) suplementados con antifúngico (carbendazim 0,001 %) y antibiótico (ampicilina 0,015 %), para impedir el desarrollo de hongos de crecimiento rápido y bacterias. Las placas se incubaron a 28±1 °C durante 5-7 días. Finalmente, se efectuaron resiembras hasta la purificación completa de las cepas. Los cultivos axénicos fueron conservados en el cepario de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa.

La identificación macroscópica de las cepas aisladas fue realizada de acuerdo a las claves taxonómicas: 1) Tipo de cuerpo fructífero; 2) Tipo de carpóforo; 3) Tipo, color, forma, superficie, tamaño y presencia o ausencia de escamas en el píleo/sombrero; 4) Tipo, color, forma, superficie, tamaño y presencia o ausencia de anillo y/o volva del estipe/pie; 5) Color y presencia de laminillas o poros en el himenóforo; y finalmente, 6) Composición y color del contexto. Por otra parte, la identificación microscópica se llevó a cabo utilizando la técnica de la cinta pegante, en la cual el micelio aéreo se une a la superficie adhesiva de la cinta, facilitando su separación de la colonia. Se colocó una gota de lactofenol azul de algodón (Carlo Erba®) en un portaobjetos y se insertó la tira de cinta conteniendo el micelio para su observación microscópica. Las principales características microscópicas observadas fueron el sistema de hifas y la presencia o ausencia de fibulas.

Resultados

Las muestras de hongos desarrolladas sobre madera en descomposición, colectadas de la Reserva de San Rafael, se aislaron perfectamente utilizando como medio de cultivo PDA, en las condiciones ensayadas. Los cultivos axénicos fueron identificados como *Trametes* sp. y *Polyporus* sp., siguiendo las claves taxonómicas macroscópicas y microscópicas.

Trametes sp. es clasificado taxonómicamente como: Reino: Fungi, División: Basidiomycota, Clase: Agaricomycetes, Orden: Polyporales, Familia: Polyporaceae. Género: *Trametes*.

El carpóforo fue encontrado en un grupo creciendo en racimos sobre un tronco en descomposición. Las características macroscópicas evaluadas y descritas fueron: Tipo de cuerpo fructífero: hongo de repisa.

Píleo: Sentado o imbricado, dimidiado, con una superficie pilosa y escamosa. Visiblemente zonada con tonos verdes, marrón claro, crema y blanco. Bordes de color marrón claro. Himenóforo: superficie porosa. Estipe: ausente. Contexto: insustancial, blancuzco, duro y corcho. Olor y sabor no distintivos.

Los micelios observados en el aislamiento fueron de color blanco con aspecto pulverulento. Finalmente, microscópicamente se observaron el sistema y la forma de las hifas. El sistema de hifas es trimítico, con hifas generativas delgadas y gruesas. No se visualizaron esporas. Se observó la presencia de fibulas.

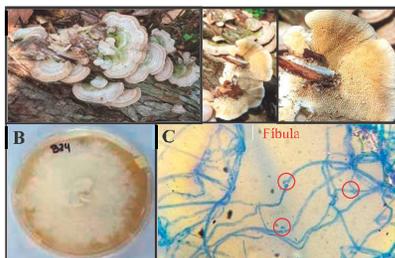


Figura 2. Características del cuerpo fructífero *Trametes* sp.

Referencias: **A)** Características macroscópicas del cuerpo fructífero, presencia de poros en el himenóforo; **B)** Características del crecimiento in vitro de la cepa a los 7 días de incubación; **C)** Características microscópicas: presencia de fibulas. Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, *Polyporus* sp. se clasifica taxonómicamente como: Reino: Fungi, División: Basidiomycota, Subfilum: Agaricomycota, Clase: Agaricomycetes, Orden: Polyporales, Familia: Polyporaceae, Género: *Polyporus*.

Se encontraron dos carpóforos juntos en una rama pequeña en descomposición. Las

características macroscópicas evaluadas y descritas fueron: Tipo de cuerpo fructífero: hongo de sombrero. Píleo: plano-convexo, infundibuliforme, con una superficie pileica del tipo liso, de color marrón, de 1,5 a 3 cm de diámetro. Himenóforo: Presencia de poros circulares. Estipe: del tipo cilíndrico, central, de color marrón con motas, de 1,2 – 3 cm de altura. Contexto: suberoso. Olor y sabor no destacables.

En cuanto a las características del aislamiento, se observaron micelios de color blanco y aspecto pulverulento. Microscópicamente se observó un sistema de hifas dimítico, con hifas generativas delgadas, con ramificaciones no uniformes. No se visualizaron esporas. Se apreciaron fibulas a lo largo de las hifas.

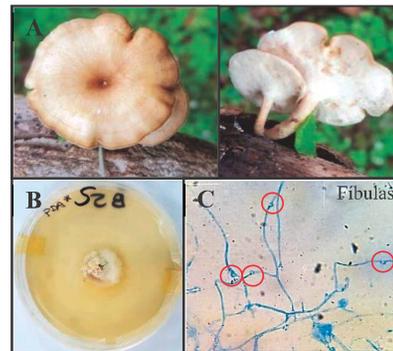


Figura 1. Características del cuerpo fructífero *Polyporus* sp.

Referencias: **A)** Características macroscópicas del cuerpo fructífero, presencia de poros en el himenóforo; **B)** Características del crecimiento in vitro de la cepa a los 5 días de incubación; **C)** Características microscópicas: presencia de fibulas. Fuente: Elaboración propia.

Discusión

El género *Trametes* se caracteriza morfológicamente por su basidioma pileado

con un sistema hifal trimítico y esporas no amiloides, no dextrinoides y de pared delgada, cistidia himenial (Ferreira et al., 2018). Debido a que, ciertas especies poseen características macroscópicas similares, no se pudo llegar a la especie del hongo encontrado en la Reserva de San Rafael. Del mismo modo, la identificación de la especie de *Polyporus* ha sido dificultoso. *Polyporus varius* y *P. badius* se caracterizan por presentar una costra negruzca en el pie y son muy parecidos, se diferencian porque *P. varius* sólo tiene la costra en la base, hifas con fibulas y píleo amarillo ocráceo; mientras que *P. badius* tiene la costra hasta el comienzo del himenóforo, hifas sin fibulas y píleo marrón rojizo (Niemela y Kotiranta, 1991; Borges da Silveira, 2006).

La capacidad de *Trametes* sp. de degradar colorantes de diferentes tipos se ha reportado por varios autores (Cortazar Martínez et al., 2012). La biodegradación de tintes y efluentes textiles utilizando hongos potenciales es un proceso comparativamente barato y seguro para el medio ambiente, para descomponer o mineralizar los compuestos de colorantes sintéticos poco o menos degradantes (Singh, 2017).

La acción de los hongos como degradadores y decolorantes se realiza a través de enzimas, así como por la absorción, adsorción y acumulación de colorantes de los efluentes (Ramachandran y Gnanadoss, 2013). En la investigación realizada por Cano et al. (2012) se encontraron que, la remoción de colorantes textiles con enzimas intracelulares, asociadas y extracelulares de *Trametes versicolor* es comparable o superior a la eficiencia de remoción reportada por los métodos de inmovilización con *Phanerochaete chrysosporium*. Por otra parte, en el estudio realizado en el Bosque Atlántico en Misiones Argentina fueron seleccionados por su producción de enzima degradadora de lignina seis especies del género *Polyporus*

(*P. arcularius*, *P. arcularioides*, *P. tricholoma*, *P. cfr. Tricholoma* y *P. varius*). El análisis de los resultados mostró que sus lacasas presentaron una estabilidad térmica y una temperatura óptima por encima de 70°C, lo que representa una fuente interesante de enzimas termo tolerantes para aplicaciones biotecnológicas (Grassi *et al.*, 2018).

La aplicación más importante de estos hongos es la micorremediación, debido a que son capaces de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos persistentes. La ventaja ante otros microorganismos se basa en su capacidad de tolerar concentraciones considerablemente altas de contaminantes y para crecer a bajos valores de pH. Asimismo, gracias a la extensión de sus hifas, pueden alcanzar contaminantes en el suelo, que no son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos. Finalmente, dado que requieren de sustratos lignocelulósicos para su crecimiento, es posible adicionar a los sitios contaminados, residuos de muy bajo costo como viruta de madera, carozo de maíz o paja de trigo, para promover su crecimiento e incrementar la degradación de los contaminantes (Quintero Díaz, 2011).

Conclusión

Pese a la importancia y la función de los macrohongos son pocos los estudios que abordan su taxonomía y posibles usos. La relevancia del presente trabajo radica en el aislamiento e identificación de hongos degradadores de madera de la Reserva de San Rafael, debido a que, son capaces de sintetizar metabolitos importantes con potencial biotecnológico. La conservación de los mismos para su posterior aplicación es de suma importancia para el desarrollo futuro de investigaciones en el área. El empleo de hongos potenciales es un proceso comparativamente barato y seguro para el medio ambiente.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Universidad Nacional de Itapúa por el financiamiento y a la Facultad de Ciencias y Tecnología por permitir el desarrollo del proyecto en el Laboratorio de Microbiología. Finalmente, a la Asociación Pro Cordillera San Rafael (PROCOSARA) y a la familia Hostettler por el apoyo para el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

Borges da Silveira, R.M. (2006). El género *Polyporus s.str.* (Basidiomycota) en el Cono Sur de América. *Biociencias*, 14(1), 3-14.

Cano, M., Solis, M., Solis, A., Loera, O., Perez, H., Teutil, M.M.M. (2012). Decoloración de CD2 (café directo 2) por encima intracelulares y extracelulares de *Trametes versicolor*. *Interciencia*, 37(4), 294-298.

Cortazar Martínez, A., González Ramírez, C.A., Coronel Olivares, C., Escalante Lozada, J., Castro Rosas, J., Villagómez Ibarra, J. (2012). Biotechnology applied to the degradation of textile industry dyes. *Universidad y Ciencia*, 28(2), 187-199.

Encinas, O., Mora, N. (2016). Patrones de degradación de las maderas de Pino caribe, Curarire y Drago por *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. *Revista Forestal Venezolana*, 44(1), 1-14.

Ferreira, D.S.S., Kato, R.B., Miranda, F.M., Da Costa Pinheiro, K., Fonseca, P.L.C., Tomé, L.M.R, Vaz, A.B.M., Badotti, F., Ramos, R.T.J., Brenig, B., Azevedo, V.A.C., Benevides, R.G., Góes-Neto, A. (2018). Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. *Data in Brief*, 18, 1581-1587.

García, M., Notario, A., Quadvlieg, J., Cardozo, M., Cárdenas, A., Portal, A. (2014). Evaluación preliminar de macrohongos en seis áreas con diferente grado de perturbación en Madre de Dios. *Biodivers. Amazon*, 4, 59-73.

García Ortiz, V.R., Benítez Rocha, G., Martínez Pacheco, M., Velázquez Becerra, C. (2017). Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 56-79.

Grassi, E., Robledo, G., Levin, L. (2018). Influence of light on lignin-degrading activities of fungal genus *Polyporus s. str.*. *Journal of Basic Microbiology*, 1-10.

Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), p.1422-1432.

Hernández Mendieta, E., Guillén Sánchez, D., López Martínez, V., Tejacal, I.A., Rodríguez, M.A., Villegas Torres, O.G., Segura Miranda, A. (2013). Identificación del agente causal de la pudrición blanca en Morelos, México. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 15(2), 178-185.

Luley, C.J. (2005). *Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos*. Wood Decay Fungi: Common to Trees in Northeast and Central United States. Urban Forestry LLC, Estados Unidos.

Martínez, C.N. (2016). *Aislamiento e Identificación de Basidiomicetes nativos de la provincia de Misiones con capacidad celulolítica*. Universidad Nacional de Misiones. Tesis de grado.

Murace, M., Spavento, E., Keil, G., Saparrat, M. (2010). Pudrición castaña: efectos sobre las propiedades de resistencia mecánica de la madera. *Revista de Ciencias Forestales*, 18, 37-46.

Niemela, T. y Kotiranta, H. (1991). Polypore survey of Finland 5. The genus *Polyporus*. *Karstenia*, 31, 55-68.

Orozco Mosqueda, M.C., Valencia Cantero, E., López Albarrán, P., Martínez Pacheco, M., Velázquez Becerra, C. (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 219-228.

Preussler, C.A., Shimizu, E., Villalba, L.L., Zapata, P.D. (2009). Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (Sw.:Fr.) Kreisel. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 11, 9-16.

Quintero Díaz, J. C. (2011). Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64, 5867-5882.

Ramachandran, R., Gnanadoss, J. (2013). Mycoremediation for the treatment of dye containing effluents. *International Journal of Computing Algorithm*, 2, 286-293.

Singh, L. (2017). Biodegradation of Synthetic Dyes: A Mycoremediation Approach for Degradation/Decolourization of Textile Dyes and Effluents. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 3(5), 2-7.