

Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



Original

Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia)

Deisy Fernanda Chaparro, Diana Carolina Rosas y Amanda Varela *

Laboratorio de Ecología de Suelos y Hongos Tropicales, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 4 de septiembre de 2008

Aceptado el 16 de marzo de 2009

On-line el 30 de septiembre de 2009

Palabras clave:

Descomposición madera

Lacasa

Celobiosa deshidrogenasa

Ascomycota

Basidiomycota

RESUMEN

Se realizó la colecta de hongos (rdas.) en troncos caídos con diferentes estados de descomposición en un bosque subandino (la reserva natural La Montaña del Ocaso) y se evaluó su actividad ligninolítica. Se cultivaron en Agar extracto de malta y se realizaron pruebas semicuantitativas de actividad lacasa utilizando como inductor enzimático el ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y el 2,6-diclorofenolindofenol para la celobiosa deshidrogenasa (CDH). Se seleccionaron los hongos con mayor actividad enzimática de troncos con diferente grado de descomposición: *Cookeina sulcipes* (de estado 1), un hongo de la familia Corticiaceae (de estado 2), *Xylaria polymorpha* (de estado 3) y *Earliella* sp. (de estado 4). La fermentación se realizó a 28 °C durante 11 días, a 150 r.p.m., con mediciones diarias para biomasa, glucosa, actividad lacasa, actividad CDH y proteínas. Los hongos de los troncos con estados de descomposición 1 a 3 presentaron mayor actividad lacasa, a medida que aumentaba el estado de descomposición. Hubo un aumento en la actividad CDH a medida que se incrementó el estado de descomposición de los troncos. Hubo una relación positiva entre la producción de las 2 enzimas. *Earliella* sp. fue el hongo con mayor producción de biomasa (1.140,19 g/l), actividad lacasa (157 UI⁻¹) y CDH (43,50 UI⁻¹). Este trabajo es el primer reporte de actividad lacasa y CDH en *C. sulcipes* y *Earliella* sp. Además, sienta las bases para la utilización de estos hongos nativos en aplicaciones biotecnológicas y se adentra en el conocimiento de su función dentro del proceso de descomposición de la madera en bosques.

© 2008 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Isolation of wood-decaying fungi and evaluation of their enzymatic activity (Quindío, Colombia)

ABSTRACT

White rot fungi (Ascomycota and Basidiomycota) were collected on fallen trunks with different decay stages, in a subandean forest (La Montaña del Ocaso nature reserve), and it was evaluated their ligninolytic activity. They were cultured on malt extract agar. Then it was performed semiquantitative tests for laccase and cellobiose dehydrogenase (CDH) activity using ABTS and DCPIP as enzymatic inducers. Based on the results of these tests, the fungi with higher activities from trunks with different decay stages were selected: *Cookeina sulcipes* (for stage 1), a fungus from the family Corticiaceae (for stage 2), *Xylaria polymorpha* (for stage 3) and *Earliella* sp. (for stage 4). A fermentation was performed at 28 °C, during 11 days, in a rotatory shaker at 150 rpm. Biomass, glucose, proteins and enzyme activities measurements were performed daily. The fungi that were in the trunks with decay states from 1 to 3, showed higher laccase activity as the state of decay increased. A higher DCH activity was also associated with a higher. Also, there was a positive relationship between both enzymes' activities. *Earliella* was the fungus which presented the highest biomass production (1140,19 g/l), laccase activity (157 UI⁻¹) and CDH activity (43,50 UI⁻¹). This work is the first report of laccase and CDH activity for *Cookeina sulcipes* and *Earliella* sp. Moreover, it gives basis for the use of these native fungi in biotechnological applications and the acknowledgment of their function in the wood decay process in native forest.

© 2008 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Wood decomposition

Laccase

Cellobiose dehydrogenase

Ascomycota

Basidiomycota

Los hongos de la pudrición blanca, tanto Ascomycota como Basidiomycota, desempeñan un papel importante en los bosques

por ser los únicos organismos capaces de descomponer los componentes de la madera hasta su total mineralización⁴, lo que llega finalmente a la formación de capas de humus en el suelo. El proceso de descomposición de la madera que desarrollan los hongos es complejo y responde a aspectos fisicoquímicos y bioquímicos. El hongo, al establecerse en la madera, desarrolla

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: avarela@javeriana.edu.co (A. Varela).

hifas de 1 a 2 μm de diámetro, coloniza rápidamente las paredes y lúmenes celulares y produce una transformación bioquímica con proyección física²¹. Esto causa un menor porcentaje de lignina en el tronco, una lignina que se modifica cualitativamente y una madera más porosa⁴².

La actividad enzimática de los hongos descomponedores de madera es de gran importancia, tanto en lo ecológico como en lo industrial, ya que su complejo enzimático especializado de peroxidasa, lacasa y celulasas, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH), participa dentro del ciclo del carbono¹¹. Por otra parte, pueden causar grandes perjuicios a nivel económico en la industria maderera, ya que al alterar los componentes celulares cambian las propiedades físicas y químicas de la madera⁴². Debido a su inespecificidad, la actividad enzimática de los hongos de la pudrición blanca presenta una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria del papel, de textiles y tintes, de alimentos y en procesos de detoxificación⁵.

Aunque la tasa de descomposición depende parcialmente del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa del tronco³², la actividad enzimática determina el estado de descomposición de éste¹¹. Sin embargo, no se conoce claramente cómo influyen enzimas como la lacasa y la CDH en el grado de pudrición de la madera. Se han realizado muy pocos estudios de los hongos de la pudrición, así como sobre las posibilidades de utilizarlos biotecnológicamente. Por tal razón, los objetivos de este trabajo fueron aislar hongos que colonizan troncos caídos en el bosque subandino, evaluar su actividad enzimática (lacasa y CDH) y establecer su relación con el estado de descomposición de los troncos en la reserva natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya (Quindío).

Materiales y métodos

Área de estudio. Se ubicó en 2 áreas del bosque subandino (Ocaso y Veraguas), localizadas en la reserva natural La Montaña del Ocaso, municipio de Quimbaya (Quindío, Colombia), entre 975 y 1.100 m de altitud. La precipitación media es de 1.691 mm/año y la temperatura promedio es de 24 °C¹.

Recolección de ejemplares. Se tomaron muestras de los hongos presentes en troncos caídos de latifoliadas, siempre verdes con predominio de las familias Lauraceae, Meliaceae, Moraceae, Sapindaceae y Anacardiaceae. En cada área de bosque subandino de la reserva La Montaña del Ocaso se delimitaron 30 parcelas de 20 × 5 m, paralelas entre sí, desde el borde del bosque hasta aproximadamente 100 m hacia el interior, en las que se realizaron 3 muestreos en el año 2005, que incluyeron tanto época de lluvias como época seca. Se seleccionaron los hongos que se encontraron con mayor frecuencia en troncos con diferentes estados de descomposición y se registraron sus características macroscópicas. En el laboratorio se les realizaron cortes para determinar las características microscópicas¹³ y se identificaron mediante el uso de claves taxonómicas^{6,9,16,19,34–36,41}. El estado de descomposición se determinó introduciendo una varilla de 25 cm de largo en los troncos colonizados^{17,22}. Se usaron 5 estados de acuerdo con la penetración de la varilla y estado del tronco, como se ha descrito previamente para estudios ecológicos^{22,38}. Estado 1: la varilla penetra unos pocos milímetros el tronco y la madera permanece intacta. Estado 2: la varilla penetra 1 cm el tronco y menos del 50% del tronco se presenta descompuesto. Estado 3: la varilla penetra de 1 a 4 cm el tronco, y más del 50% del tronco está descompuesto. Estado 4: la varilla penetra de 5 a 10 cm, madera con alto grado de descomposición y algunas partes del tronco se quiebran con facilidad. Estado 5: la varilla penetra más de 10 cm el tronco, la madera está totalmente descompuesta y en ocasiones se desintegra.

Aislamiento. Se realizó una desinfección al carpóforo con hipoclorito de sodio (5%), alcohol etílico (70%) y agua destilada estéril, y se sembró un trozo de éste en agar extracto de malta al 2% (p/v) suplementado con extracto de levadura al 0,4% (p/v). Se incubaron a 25 °C durante 8 días y se mantuvieron a 4 °C en este mismo medio²⁶.

Determinación semicuantitativa de actividad enzimática. Se tomó un disco de los hongos aislados en el medio extracto de malta y se colocó en forma de sándwich sobre placas de agar con el medio descrito por Ghahfarokhi et al, y cuya composición (p/v) fue del 1% de celulosa, 0,5% de peptona, 0,2% de extracto de levadura, 0,0075% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01% de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el 2% de agar-agar, disuelto en una solución de extracto de salvado de trigo, previamente preparado por extracción inmediata de 175 g de salvado de trigo con 1.000 ml de agua destilada a 25 °C, y cuya composición fue de 9,4 mg/l de amonio, 628,6 mg/l de potasio, 12,3 mg/l de calcio, 69,6 mg/l de magnesio, 8,9 mg/l de sodio, 8,6 mg/l de nitrato, 189,4 mg/l de fósforo, 85,3 mg/l de azufre, 607,6 mg/l de bicarbonato de sodio, 140,2 mg/l de cloro. La relación C:N del medio fue de 394:1¹⁹. El pH se ajustó a 6,0 y se esterilizó a 15 lb de presión y 121 °C durante 15 min, tras lo que se añadieron al medio 0,2 g de ABTS (ácido 2,2'-acino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) como sustrato e inductor enzimático, para la selección de los hongos con actividad lacasa, y 1 mM de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como sustrato e inductor enzimático en el caso de la CDH. Las cajas se incubaron a 25 °C y la actividad enzimática se cuantificó por triplicado, con mediciones diarias del diámetro del halo durante 8 días^{14,20}.

Cuantificación de actividad enzimática. Se realizó de acuerdo a lo reportado^{7,15}; se tomaron 3 discos de Agar de 0,5 cm de diámetro de los hongos que presentaron mayor actividad enzimática lacasa y CDH en el ensayo anterior (uno por cada estado de descomposición). Cada disco se inoculó en 100 ml de medio extracto de salvado de trigo. El pH se ajustó a $6,0 \pm 0,2$ ⁷. Las fermentaciones se realizaron por triplicado durante 10 días, en agitación continua a 150 rpm y a 29 ± 1 °C¹⁵. Se tomaron muestras de 2 ml cada 24 h, que se centrifugaron a 10.000 rpm durante 25 min, cuantificando en el sobrenadante la actividad enzimática lacasa y CDH, el consumo del sustrato celulosa por liberación de glucosa al medio y las proteínas extracelulares. El *pellet* se utilizó para la determinación de biomasa mediante la cuantificación de proteínas miceliales^{12,28}. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó espectrofotométricamente a partir de 100 μl del sobrenadante en cada caso, a las temperaturas óptimas de actividad establecidas previamente¹². La cuantificación de lacasa se realizó de acuerdo con estudios previos, usando 0,5 mM de ABTS como sustrato en tampón acetato de sodio pH 5^{27,28}. Se determinó la absorbancia a 420 nm a 30 °C, ($\pi_{420} = 36 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)^{12,28}. Una unidad de actividad lacasa se definió como moles de producto/min.l¹². La cuantificación de CDH se realizó mediante la medición de la cantidad de DCPIP reducido^{24,40}. Se tomaron 150 μl de DCPIP 2 mM (inductor) en 50 mM de tampón acetato de sodio a pH 4,5, que contenía 1.700 μl de celobiosa 2,5 mM (sustrato). Como inhibidor de la actividad lacasa se utilizó fluoruro de sodio 4 mM (100 μl), ya que la lacasa es capaz de oxidar el DCPIP y alterar su color y, por tanto, la absorbancia². Se realizó la lectura a 600 nm y 37 °C ($\pi_{420} = 1,85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Una unidad de actividad CDH se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 mmol de DCPIP/min.l¹².

Para la determinación de glucosa se utilizó la técnica de DNS o ácido 3,5 dinitrosalicílico²⁵, a partir de muestras tomadas diariamente. Las mediciones se realizaron determinando la absorbancia a 540 nm²⁹. La cantidad de proteína extracelular se cuantificó mediante la técnica de Bradford³, centrifugando 2 ml de

la muestra tomada diariamente a 10.000 rpm Después, se añadieron 0,1 ml del sobrenadante a 5 ml del reactivo de Bradford. El blanco contenía el reactivo y 0,1 ml de cloruro de sodio 0,15 M y las mediciones se hicieron a 595 nm. La determinación de biomasa se realizó a partir de 50 mg de micelio seco homogeneizado después de una hidrólisis alcalina con 1 ml de hidróxido de sodio 1N. Se dejó en baño maría, a 100 °C durante 30 min. Se centrifugó y se cuantificó la cantidad de proteínas miceliales con la técnica de Bradford³. Los resultados se expresaron como µg de proteínas/g de micelio¹².

Análisis estadísticos. El análisis de las pruebas cualitativas se realizó mediante un análisis de covarianza. Se utilizó la correlación de Spearman para establecer la relación entre la actividad lacasa y CDH de los hongos, con el estado de descomposición de los troncos y todas las variables de la fermentación. Se usó la prueba de Friedman para conocer las diferencias entre los hongos evaluados durante la fermentación para cada variable. El análisis de los resultados se llevó a cabo con un nivel de significación de 0,05 y se utilizó el programa Statistica 6.0.

Resultados

Se seleccionaron carpóforos de 37 hongos. Los que tuvieron mayor actividad lacasa y CDH en las pruebas cualitativas en medio de cultivo fueron *Trametes* sp. y *Xylaria polymorpha*, encontrados en troncos en el estado 3 de descomposición, y *Earliella* sp. 3, que se encontraba en troncos en el estado 4 de descomposición (tabla 1). La mayoría de estos hongos se han descrito como causantes de pudrición blanca^{10,31,39}, a excepción del género *Cookeina* y *Ramaria*.

No se encontró un patrón definido en la respuesta de la actividad enzimática lacasa y CDH de los hongos pertenecientes a troncos en el mismo estado de descomposición (tabla 1), así como tampoco lo hubo para el mismo género de hongo encontrado en troncos con diferente estado de descomposición. Lo mismo sucedió al evaluar el comportamiento de la tasa de actividad enzimática de acuerdo al Phylum (rda.). Por ejemplo, *X. polymorpha*, encontrada en troncos con estado de descomposición 2, presentó una tasa de actividad lacasa de 4,50 mm ABTS oxidado/día, mientras que en troncos con estado 3 de descompo-

sición esta tasa fue distinta ($q = 10,23, p < 0,05$) y 2,5 veces mayor (11,42 mm ABTS oxidado/día). Con respecto a la tasa de actividad CDH, *X. polymorpha* también tuvo un comportamiento diferente en cada estado de descomposición del tronco. En troncos con estado 2 de descomposición fue de 3,35 mm DCPIP reducido/día y, en troncos con estado 3 aumentó a un poco más del triple (10,94 mm DCPIP reducido/día [$q = 22,05, p < 0,05$]). *Trametes* sp. en troncos con estado 1 de descomposición presentó un comportamiento parecido, y mostró una tasa de actividad lacasa de 1,60 mm ABTS oxidado/día, mientras que en troncos con estado 3 aumentó 6,5 veces y fue de 10,38 mm de ABTS oxidado/día ($q = 21,42, p < 0,05$). En cuanto a la actividad CDH de este mismo género en troncos con estado 1 de descomposición, la tasa de actividad fue de 1,33 mm de DCPIP reducido/día, mientras que en troncos con estado 3 de descomposición presentó una tasa de 10,17 mm de DCPIP reducido/día, 7,6 veces mayor ($q = 38,13, p < 0,05$).

Sólo se encontró una baja relación positiva para la actividad lacasa con el estado de descomposición de los troncos ($r_s = 0,34, p < 0,05, n = 42$) en las pruebas semicuantitativas de actividad. En troncos con estado 4 de descomposición se encontró un menor diámetro de halo de actividad lacasa (20 mm), determinado por el comportamiento de *Earliella* sp. 3, el único encontrado en este estado de descomposición. En los estados 3 y 4 de descomposición se encontraron los hongos que presentaron los mayores diámetros de actividad CDH, mientras que en los hongos encontrados en troncos en estado 5 de descomposición, ésta no se detectó, aunque sí presentaron actividad lacasa en baja cantidad. En general, se evidenció que al aumentar la actividad lacasa, también lo hizo la actividad CDH de los hongos evaluados ($r_s = 0,70, p < 0,05, n = 41$).

Los hongos de la división Basidiomycota que se hicieron crecer en fermentación presentaron una relación inversa entre la biomasa y la cantidad de glucosa en el medio, mientras que en los hongos de la división Ascomycota el patrón fue distinto: en el momento más alto de cantidad de glucosa se presentó la mayor producción de biomasa (fig. 1A y B). Con respecto a la actividad lacasa se determinaron diferencias significativas entre los hongos, independientemente del estado de descomposición de los troncos ($Fr = 1, p < 0,05$), y *Earliella* fue el que presentó la mayor actividad (157 UI⁻¹), en troncos con estado de descomposición 4. Sin embargo, los hongos en troncos con estados de descomposición

Tabla 1 Actividad lacasa y celobiosa deshidrogenasa de los hongos más frecuentes encontrados en troncos caídos, en el medio extracto de salvado de trigo con ácido 2,2'azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] y 2,6-diclorofenolindofenol como inductores, a una temperatura de 28 °C, durante 8 días

Phyllum	Hongo	Estado de descomposición del tronco	Tamaño final de halo de actividad lacasa, mm ± DE	Tamaño final de halo de actividad CDH, mm ± DE
Ascomycota	<i>Cookeina sulcipes</i>	1	16 ± 1	17 ± 2,5
Ascomycota	<i>Cookeina tricholoma</i>	1	37 ± 4,9	39 ± 5,2
Basidiomycota	<i>Phellinus</i> sp.	1	14 ± 1,7	13 ± 2,3
Basidiomycota	Corticaceae 1	1	17 ± 3,2	16 ± 1,5
Basidiomycota	<i>Trametes</i> sp.1	1	8 ± 6,2	16 ± 0,6
Ascomycota	<i>Hypoxyylon</i> sp.	2	15 ± 1,5	12 ± 2,0
Basidiomycota	Corticaceae 2	2	13 ± 4,7	10 ± 9,3
Basidiomycota	<i>Earliella</i> sp. 1	2	18 ± 1,5	13 ± 2,0
Basidiomycota	Corticaceae 3	2	16 ± 1,5	12 ± 5,1
Ascomycota	<i>Xylaria polymorpha</i>	2	35 ± 5,0	51 ± 2,1
Basidiomycota	<i>Earliella scabrosa</i>	3	6 ± 3,0	15 ± 4,1
Basidiomycota	<i>Earliella</i> sp. 2	3	13 ± 5,6	12 ± 2,5
Basidiomycota	<i>Trametes</i> sp.2	3	71 ± 3,6	78 ± 1,5
Ascomycota	<i>Xylaria polymorpha</i>	3	84 ± 2,3	82 ± 2,6
Basidiomycota	<i>Earliella</i> sp. 3	4	20 ± 3,6	90 ± 1,7
Basidiomycota	<i>Ramaria</i> sp.	5	60 ± 3,5	0 ± 0
Basidiomycota	<i>Earliella</i> sp. 4	5	30 ± 4,6	0 ± 0

DE: desviación estándar.

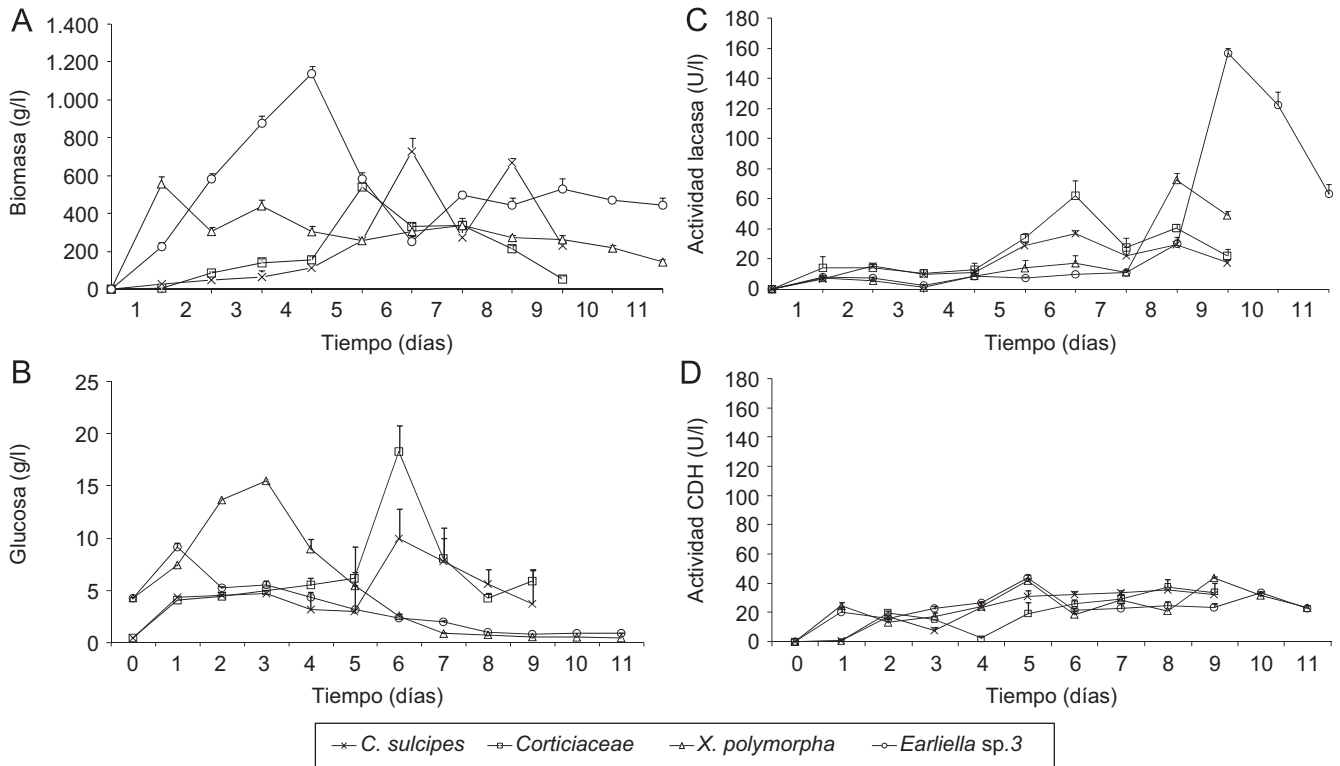


Figura 1. A) Biomasa. B) Cantidad de glucosa. C) Actividad lacasa. D) Actividad CDH en el medio extracto de salvado de trigo de *Cookeina sulcipes* (el hongo de la familia Corticiaceae), *Xylaria polymorpha* y *Earliella* sp. durante 11 días, a 28 °C y 150 r.p.m.

1 y 2 expresaron la enzima con mayor rapidez (a los 6 días) que los hongos en troncos con estados de descomposición 3 y 4 (a los 8 o 9 días) (fig. 1C).

Se observaron 2 patrones de acuerdo con el estado de descomposición de los troncos y la actividad de la lacasa. Uno en el que se presentó la mayor producción de lacasa y concentración de biomasa simultáneamente, como fue el caso de *C. sulcipes* en tronco con estado de descomposición 1. El segundo fue una baja producción de lacasa y alta producción de biomasa, como en *Earliella* de troncos con estado de descomposición 4. Estos patrones no se encontraron para la actividad CDH (fig. 1D). Para esta enzima hubo una relación positiva relativamente alta de su actividad con la cantidad de biomasa producida ($r_s = 0,45$, $p < 0,05$, $n = 396$). *Earliella* sp. fue el que presentó mayor actividad CDH y mayor producción de biomasa. Hasta la fecha se desconocen estudios realizados de esta enzima CDH en Colombia, al igual que de la actividad enzimática lacasa; además, este es el primer reporte de actividad CDH en hongos de los géneros *Cookeina* y *Earliella*.

Se confirmó lo encontrado en los ensayos semicuantitativos en cuanto a la relación positiva entre la producción de las 2 enzimas ($r_s = 0,53$, $p < 0,05$, $n = 396$). La actividad específica de la lacasa y la CDH fue mayor en *C. sulcipes* (229 y 144 U/g de proteína, respectivamente), seguida del hongo de la familia Corticiaceae, (123 y 133 U/g de proteína, respectivamente). *Earliella* sp. presentó una actividad específica de la lacasa de 59 U/g y de 94 U/g de proteína para la CDH, mientras que en *X. polymorpha* fue de 22 U/g para la lacasa y de 110 U/g de proteína para la CDH.

Discusión

Trametes sp. y *X. polymorpha* no se encontraron en los troncos más descompuestos, sino en troncos con estado 3 de descompo-

sición, aunque presentaron la mayor actividad lacasa y CDH medida semicuantitativamente. Esto probablemente se reflejó en la ausencia y en una baja relación de la actividad CDH y la actividad de la lacasa con el estado de descomposición de los troncos, respectivamente. Adicionalmente, la tasa de actividad enzimática obtenida de las mediciones diarias no correspondió al estado de descomposición del tronco. Esto indica que el comportamiento de la tasa de actividad enzimática dependería más que del grado de descomposición de los troncos, de la fisiología de cada hongo, no sólo al nivel de género, sino probablemente al nivel de especie. Entonces, para comprender mejor los factores que pueden contribuir a definir el estado de descomposición de los troncos se propone considerar que hay otras características de los troncos no evaluadas en este estudio (contenido de lignina, celulosa, resistencia) o la actividad de otros organismos. Adicionalmente, la existencia de actividad lacasa, mas no de CDH, por parte de los hongos encontrados en los troncos con estado 5 de descomposición pudo deberse a que la enzima lacasa reoxida todos los aceptores de electrones conocidos de la CDH, incluido el DCPIP¹⁸ y, por tanto, la lacasa pudo enmascarar la actividad de la CDH. Es difícil comparar los anteriores resultados debido a que no hay estudios reportados acerca de la tasa de actividad lacasa y CDH de los hongos estudiados con respecto al estado de descomposición de los troncos. Sin embargo, el aumento concomitante de la actividad lacasa y de CDH de los hongos evaluados hace presumir que las 2 deben producirse simultáneamente para la degradación de los componentes de la madera, aunque no se conozca claramente la función biológica de la CDH y se sepa que es esencial para la invasión y degradación de la madera⁸.

En cuanto a la determinación cuantitativa de las actividades de las 2 enzimas, el comportamiento de los hongos rda. examinados podría indicar un patrón de acuerdo con el Phylum, en el que el consumo de glucosa en los hongos rda. es mayor que la actividad

celulolítica cuando aumenta la producción de biomasa. Por el contrario, en los hongos del Phylum Ascomycota hay una mayor actividad celulolítica con respecto al consumo de glucosa en su etapa de crecimiento. Sería necesario hacer evaluaciones en otros géneros de hongos con el fin de confirmar este patrón. Aunque el comportamiento de la glucosa es uno de los factores más relacionados con el crecimiento fúngico, no sólo está involucrado el proceso de degradación de glucosa, sino también el proceso enzimático de degradación de celulosa y celobiosa, en el que la celulosa es la principal fuente de carbono disponible en el medio extracto de salvado de trigo y en el hábitat natural de estos hongos⁸.

La actividad lacasa se ha reportado como alta en *Xylaria hypoxylon* y *X. polymorpha*, mediante la técnica de ABTS²³, pero no se conocen estudios sobre la actividad lacasa en hongos del género *Cookeina* ni *Earliella*. En este sentido, este es el primer reporte de actividad enzimática lacasa para estos 2 géneros en Colombia. Por su parte, la producción más alta de actividad CDH reportada en hongos de la pudrición blanca es de una cepa de *Trametes versicolor*, con un valor de 270 U/l, medida mediante la técnica de clorpromazina³³. Aunque es difícil realizar comparaciones en cuanto a la actividad CDH entre hongos debido a las diferencias en los resultados que se obtienen por el uso de distintas técnicas para la cuantificación de esta enzima³⁷, la actividad CDH que registran los hongos en este estudio es baja, y llega a ser incluso un orden de magnitud menor. La relación relativamente alta entre la actividad CDH y la cantidad de biomasa puede explicarse por el incremento de la actividad celulolítica de la CDH mediante varios mecanismos, entre los que se encuentra la oxidación de la celobiosa a celobionolactona, lo que despolimeriza la celulosa y evita la inhibición por producto de las enzimas que hidrolizan la celulosa. Esto trae como consecuencia el aumento de la tasa de degradación de la celulosa a moléculas que el hongo pueda asimilar más fácilmente, lo que se refleja en un incremento en la biomasa^{4,30}. *Earliella* sp. 3 fue el hongo que presentó mayor actividad CDH y mayor producción de biomasa, lo que sería una ventaja para éste y otros hongos en la colonización y degradación de sustratos de lignocelulosa, ya que los hongos encontrados en troncos en estados iniciales de descomposición (1 y 2) presentaron una mayor actividad específica de CDH que de lacasa. Esto puede indicar que biológicamente la CDH tendría una mayor importancia para los hongos en las etapas iniciales de colonización de troncos, ya que éste se encuentra compacto y, por tal razón, la lignina y la celulosa no estarían disponibles para las demás enzimas que participan en el proceso de degradación de la madera. La relación positiva entre la actividad de las enzimas lacasa y CDH que se evidenció en este estudio también se ha demostrado en sistemas lignolíticos como los encontrados en todas las especies del género *Pycnoporus*³⁷, ya que la capacidad para degradar la madera depende de la actividad conjunta de la lacasa y la CDH.

Se han realizado muy pocos estudios con el fin de conocer la riqueza de hongos descomponedores de madera de pudrición blanca nativos y de su actividad metabólica. Este trabajo muestra que los hongos nativos recolectados en el bosque subandino tienen potencial enzimático en la degradación de sustratos lignocelulósicos, lo que permite ampliar el conocimiento de la interacción entre las enzimas implicadas y cómo podrían alterar la composición de la madera. Así se dan las bases para futuras investigaciones que evalúen sus posibles aplicaciones no sólo a nivel biotecnológico, sino en el mantenimiento de procesos del ecosistema.

Financiación

A la Pontificia Universidad Javeriana (Vicerrectoría Académica) por la financiación del estudio (proyecto N.º 2.097). Al Centro de

Investigaciones Biológicas de la Universidad del Quindío (CIBUQ) por permitir la entrada a la reserva. A la Doctora Flavia Forchiassin y su grupo (Laboratorio de Micología Experimental, Universidad de Buenos Aires, Argentina) por su apoyo con las técnicas de cuantificación de actividad enzimática. A Germán Darío Gómez por su asesoramiento y colaboración en la fase de campo, y a Daniel Rodríguez por su colaboración en campo. A los revisores anónimos por sus valiosos aportes para mejorar el manuscrito.

Bibliografía

- Agudelo CA, Gómez GD. Reserva Natural la Montaña el Ocaso. Un modelo de conservación. En: Agudelo CA, editor. Importancia de la microcuena del Río Roble. Monografías de la flora andina N.º 3. Armenia: Universidad de Quindío, 2001.
- Baminger U, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase in the presence of laccase. *J Microbiol Meth.* 1999; 35:253–9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
- Buswell J. Fungal degradation of lignin. En: Arora DK, Rai B, Knudsen B, editors. Handbook of applied mycology. Soil and plants, Vol. 1. New York: Marcel Dekker Inc.; 1992.
- Deacon J. *Modern Mycology*. 3 ed. Edinburgh: Blackwell Science; 2002.
- Dennis RW. Some *Xylarias* of tropical America. *Kew Bulletin.* 1956.
- D'Souza T, Boominathan K, Reddy A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:3739–44.
- Dumoncaux T, Bartholomeo K, Valeanu L, Charles T, Archibld F. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and non essential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol.* 2001;29: 478–89.
- Ellis M, Ellis J. *Fungi without gills (Hyenomyces and Gasteromycetes)*. London: Chapman and Hall; 1990.
- Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. New York: Springer; 1990.
- Fernandes L, Loguerio-Leite C, Espósito E, Menezes M. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 2005;55:187–93.
- Forchiassin F. *Manual de micología experimental*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, 2005.
- Foster M, Bills G, Mueller G. *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Burlington: Elsevier Academic Press; 2004.
- Ghahfarokhi M, Fazli A, Lofti A, Abyaneh M. Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. *Iranian Biomedical Journal.* 2004;8: 107–11.
- Guillén-Navarro GK, Márquez-Rocha FJ, Sánchez-Vásquez JE. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15:302–6.
- Hanlin R, Tortolero O. *Illustrated genera of Ascomycetes*. Minnesota: APS Editors; 1990.
- Heilmann-Clausen J, Christensen M. Wood-inhabiting macrofungi in Danish beech-forests-conflicting diversity patterns and their implications in a conservation perspective. *Biological Conservation.* 2005;122:633–42.
- Henriksson G, Johansson G, Pettersson G. A critical review of cellobiose deshydrogenases. *J Biotechnol.* 2000;78:93–113.
- Hjortstam K, Larsson K, Ryaararden L. *The Corticiales of North Europe*, Vol. 1–8. Oslo: Fungiflora; 1987.
- Herrera J, Rosas J. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes en la industria papelera [tesis de pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2003.
- Kirk T, Cullen D. *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi*. En: Young R, Akhtar M, editors. *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1998.
- Kruys N, Fries C, Jonsson GB, Lamas T, Stahl G. Wood-inhabiting cryptogams on dead Norway spruce (*Picea abies*) trees in managed Swedish boreal forest. *Canadian Journal of Forest Research.* 1999;29:178–86.
- Liers C, Ullrich R, Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. Mineralization of ¹⁴C- labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;69:573–9.
- Ludwig R, Salamon A, Varga J, Zámocky M, Peterbauer CK, Kulbe KD, et al. Characterisation of cellobiose dehydrogenases from the white-rot fungi *Trametes pubescens* and *Trametes villosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64:213–22.
- Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annal Chem.* 1959;31:426–8.
- Nazareno M, Martínez M, Cabello M, Arambarri A. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:181–5.

27. Nikku-Paavola ML, Raaeka M, Itavaara M. Detection of white-rot fungi by non-toxic stain. *Mycological Research*. 1990;94:27–31.
28. Papinutti VL, Forchiassin F. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Revista Argentina de Micología*. 2000;32:83–8.
29. Pedroza A, Matiz A, Quevedo B. Manual de laboratorio tecnología de fermentaciones. Bogotá: Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana; 2003.
30. Penttilä M, Saloheimo M. Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. En: Oliver R, Schweizer M, editors. *Molecular fungal Biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
31. Pinzón-Picaseño LM, Ruiz Rodríguez ME. Comprobación del tipo de pudrición y selectividad de sustrato de 15 hongos poliporoides xilófagos de los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Micología*. 2004;18:47–59.
32. Rayner ADM, Boddy L. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. London: John Wiley and Sons Ltd.; 1998.
33. Roy BP, Dumonceaux T, Koukoulas AA, Archibald FS. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62:4417–27.
34. Ryvaarden L. Polyporales del Neotrópico I. Curso de Basidiomycetes tropicales. Oslo: Universidad Simón Bolívar; 1997.
35. Sharma J. Hymenochaetaceae of India. Botanical survey of India. India: Ministry of Environment and Forest; 1995.
36. San Martín F, Rogers J, Yu Min JU. Clave dicotómica provisional para los géneros de la Familia *Xylaraceae* (Pirenomyces, Sphaeriales). *Sociedad Mexicana Micología*. 1998;7:51–8.
37. Sigoillot C, Lomascolo A, Record E, Robert JL, Asther M, Sigoillot JC. Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: Isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31:876–83.
38. Siitonen P, Lehtinen A, Siitonen M. Effects of forest edges on the distribution, abundance and regional persistence of wood-rotting fungi. *Conservation Biology*. 2005;19:250–60.
39. Sutherland JB, Crawford DL. Lignin and glucan degradation by species of the Xylariaceae. *Transactions of the British Mycological Society*. 1981;76:335–7.
40. Temp U, Eggert C. Novel interaction between lacase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:389–95.
41. Tobón LE. Ascomycetes de Colombia. Discomycetes del Departamento de Antioquia. Caldasia. 1991;16:327–36.
42. Wainwright M. Introducción a la biotecnología de hongos. Zaragoza: Editorial Acribia; 1995.