

Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador

Isolation, selection and characterization of cellulolytic fungi from soil samples in Manabí-Ecuador

Ángel Monserrate Guzmán Cedeño ^{1,2}, Diego Efrén Zambrano Pazmiño ¹, Ana Julia Rondón ⁴, Marta Laurencio Silva ⁴, Manuel Pérez Quintana ⁴, Rolando León Aguilar ⁴, Rubén Rivera Fernández ³

Originales: Recepción: 26/05/2014 - Aceptación: 07/10/2014

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo aislar, seleccionar y caracterizar, a partir de muestras de suelo, hongos filamentosos con actividad celulolítica, que tengan aplicación futura como inóculo en el compostaje de residuos orgánicos fibrosos. Se consideraron cinco ambientes de muestreo: agricultura orgánica (AO); agricultura convencional (AQ); bosque artificial (BM); área cañera (RC) y pilas de compost (AC). Para el aislamiento, se realizaron diluciones seriadas y siembra en Agar-Saboroud celulosa. Las colonias crecidas fueron purificadas por agotamiento hasta obtener un cepario de 131 hongos celulolíticos. El criterio de selección fue el crecimiento sobre agar-Saboroud con modificación de la fuente de carbono por Carboximetilcelulosa y su reacción positiva frente a la prueba de rojo congo, en el que se observaron zonas claras alrededor de las colonias en 48 hongos celulolíticos, de los cuales fueron seleccionados los que produjeron el mayor halo (AO-1; AO-2; AO-4; AO-5; AO-6; AO-8; AQ-3; AQ-8 y RC-3) a los que se evaluó el crecimiento a diferentes pH (3, 5, 7, 9) y

ABSTRACT

The research aimed to isolate, select, and characterize cellulolytic filamentous fungi from soil for future implementation as inoculum in the composting of fibrous organic waste. Five sampling environments were considered: organic agriculture (OA); conventional agriculture (AQ); artificial forest (BM); sugarcane area (RC) and compost piles (AC). For the isolation, serial dilutions were plated onto Agar-Sabouraud cellulose. The grown colonies were purified by depletion until obtaining a strain collection of 131 cellulolytic fungi. The selection criterion was the growth on nutrient agar with modification of the carbon source by carboxymethylcellulose, and its positive reaction for red congo test, in which clear zones around colonies were observed on 48 cellulolytic fungi, from which fungi that displayed the highest ratio of halo were selected (AO-1, AO-2, AO-4, AO-5, AO-6, AO-8, AQ-3, AQ-8 and RC-3) growth was evaluated at different pH values (3, 5, 7, 9) and temperature (50 -70 °C). The AO-8 showed higher halo fungus cellulose hydrolysis with 10.33 mm of growth and stability at different pH and

- 1 Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López", 10 de agosto N°82 y Granada Centeno. Calceta, Manabí, Ecuador. aguzman@espa.edu.ec
- 2 Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí. Ciudadela universitaria vía San Mateo. Manta, Manabí, Ecuador.
- 3 Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí; Extensión Chone. Avenida Eloy Alfaro y Malecón. Chone, Manabí-Ecuador.
- 4 Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Apartado Postal 44740, Km 3,5. Matanzas, Varadero, Cuba.

temperaturas (50 y 70°C). El hongo AO-8 mostró mayor halo de hidrólisis de celulosa con 10,33 mm y estabilidad de crecimiento en los diferentes niveles de pH y temperatura estudiados; por lo cual se determinó su dinámica de crecimiento, encontrando respuesta logarítmica hasta las 96 horas; también se evaluó la actividad amilolítica y pectinolítica registrando 11,75 y 2,75 mm, respectivamente. De acuerdo con estos resultados el hongo AO-8 posee potencial para ser usado como inóculo en la elaboración de compost.

temperature levels; so their growth dynamics are determined by finding logarithmic response until 96 hours; furthermore amyolytic and pectinolytic capacity was evaluated reflecting 11.75 and 2.75 mm, respectively. According to these results, the AO-8 fungus has potential to be used as inoculum for composting.

Palabras clave

hongos filamentosos • inóculo fúngico
• compostaje • plasticidad ecológica

Keywords

filamentous fung • fungal inoculum •
composting • ecological plasticity

INTRODUCCIÓN

El compostaje es un proceso biooxidativo que da lugar a un producto orgánico altamente estable denominado compost. Se puede definir, además, como la mineralización y humificación parcial de las sustancias orgánicas mediante reacciones microbianas (Varnero *et al.*, 2011). Los hongos filamentosos pueden estar implicados durante el proceso de compostaje mediante la participación en la degradación aeróbica de la materia orgánica debido a su alta capacidad lignocelulolítica (Munero *et al.*, 2005 y Pérez *et al.*, 2010). Asimismo estos hongos intervienen en la solubilización de compuestos orgánicos complejos y compuestos inorgánicos (Baldrian *et al.*, 2012).

En contrapartida, muchas especies de hongos son fitopatógenos; de ahí la importancia de realizar una correcta caracterización de estos microorganismos para su utilización como inóculos en la elaboración de compost (Zhang *et al.*, 2011); sobre todo si se considera que el proceso de compostaje tiene una duración variable, debido a la calidad de los residuos, el tamaño de partícula, disposición de la pila, aireación, humedad y básicamente la población microbiana activa, entre los que se encuentran los hongos filamentosos (Varnero *et al.*, 2011).

Los inóculos conformados por bacterias y hongos filamentosos contribuyen a la reducción del tiempo de formación y maduración del compost (Chanda *et al.*, 2013). No obstante, son escasos los resultados informados en la literatura científica sobre inóculos nativos, a partir de microorganismos aislados de muestras de suelo y de residuos orgánicos en proceso de descomposición, que se empleen para acelerar la transformación de residuos orgánicos fibrosos, entre ellos la celulosa (Zhang *et al.*, 2011). Entre estos trabajos se reporta la evaluación de un cultivo formado por una mezcla de hongos endógenos seleccionados de pilas de compostaje, donde se determinó que la estabilidad y madurez del compost se alcanzó en menor tiempo en las pilas inoculadas que los tratamientos sin inocular (Vargas *et al.*, 2007).

La celulosa es la molécula orgánica más abundante y disponible en la naturaleza para ser sintetizada y degradada por una variedad de microorganismos (Martínez *et al.*, 2008). Los organismos capaces de degradar la celulosa son principalmente hongos y bacterias, ellos son reconocidos por la habilidad de producir enzimas no sólo celulasas sino también amilasas, proteasas y peptidasas entre otras; que permite el reciclado de material orgánico de nuevo al suelo. La hidrólisis de la celulosa se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Sin embargo, no todas las especies pueden producir elevados niveles de enzimas extracelulares que, a su vez, no sean afectadas por factores físicos y químicos durante el proceso de hidrólisis (Gutiérrez *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2010; Oviedo *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2013).

En Ecuador y particularmente en Manabí se ofertan inóculos, importados, como catalizadores del proceso de compostaje; sin embargo no se ofrece información acerca de la procedencia e identificación a nivel de especie, de los microorganismos que contienen, ante lo cual no es posible referir con especificidad el resultado de su uso (MAGAP, 2008). Esta situación conduce al empleo de microorganismos nativos, aislados de suelos de la localidad, plenamente identificados y caracterizados según criterios de efectividad como inóculo en el compostaje de residuos orgánicos fibrosos.

El objetivo del presente trabajo fue aislar, seleccionar y caracterizar, a partir de muestras de suelo, hongos filamentosos con actividad celulolítica, que tengan aplicación futura como inóculo en el compostaje de residuos orgánicos fibrosos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de sustratos de los diferentes ambientes

En una amplia zona de vida Tropical Subhúmeda correspondiente a la provincia de Manabí-Ecuador, que registra una temperatura promedio de 28°C y alrededor de 800 mm de precipitación anual, repartido en un periodo lluvioso de seis meses (diciembre-mayo), se extrajo en el mes de marzo de 2011 cuatro muestras compuestas de suelo y una muestra de compost de cinco ambientes diferentes, que se describen a continuación:

- 1) Área de agricultura orgánica (AO).- Se encuentra en las coordenadas S 00°49'17" y W 80°10'68", está dedicada a la práctica agroecológica de policultivos hortícolas, incorporación constante de material orgánico al suelo, fresco o estabilizado, y un valor de materia orgánica (MO) alrededor del 4,06%, de acuerdo con el resultado del análisis químico realizado a una muestra compuesta del lugar.
- 2) Área de agricultura convencional (AQ).- La posición geográfica del sitio corresponde a las siguientes coordenadas S 00°49'36" y W 80°10'85", aquí se realizan cultivos intensivos de ciclo corto, empleando prácticas agronómicas químico-mecanizadas, posee suelo de topografía plana, buen drenaje y 1,37% de MO, de acuerdo con el resultado del análisis químico realizado a una muestra compuesta del lugar.

- 3) Bosque artificial (BM).- Situado entre las coordenadas geográficas S 00°49'50" y W 80°10'90", está conformado principalmente por las especies maderables: Caoba (*Swietenia macrophylla*), guachapelí (*Albizia guachapele*) y roble (*Quercus robar*), de aproximadamente 20 años de edad, que ha generado una capa de hojarasca en el suelo de unos cinco centímetros; tiene asociado vegetación espontánea, gramíneas de porte bajo y dicotiledóneas tolerante a sombra, el suelo contiene 4,05% de MO, de acuerdo con el resultado del análisis químico realizado a una muestra compuesta del lugar.

Estos tres ambiente pertenecen al campus politécnico de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" (ESPAM-MFL), ubicada en el cantón Bolívar.

- 4) Área de producción de caña de azúcar (RC).- de aproximadamente 10 años de explotación en monocultivo, tiene una evidente acumulación de residuos fibrosos, alta retención de humedad y 1,61% de MO en el suelo, de acuerdo con el resultado del análisis químico realizado a una muestra compuesta del lugar.

El lugar pertenece al cantón Chone y se ubica entre las coordenadas geográficas S 00°44'03" y W 80°04'67".

- 5) Unidad de producción de compost (AC).- ambiente bajo cubierta y piso de cemento donde se composta grandes volúmenes de residuos orgánicos de bananera, pollinaza y bovinaza; se emplea maquinaria para la remoción y volteos de los materiales, el sistema de compostaje es abierto y existen pilas en diferentes etapas del proceso, la escogida para el muestreo tenía ocho semanas de duración y 25,51% de MO, de acuerdo con el resultado del análisis químico realizado a una muestra compuesta de la pila.

Esta infraestructura pertenece a la bananera orgánica "Nueva Esperanza" ubicada en el cantón Tosagua entre las coordenadas S 00°44'12" y W 80°12'39".

En cada uno de los cuatro primeros ambientes se extrajo una muestra compuesta de suelo de 500 g, a partir de cinco submuestras/ambiente; éstas se tomaron a una profundidad de 10 cm desde la superficie del suelo, previamente despojado de residuos orgánicos gruesos. Los sitios de muestreo fueron escogidos por el hábitat favorable al nicho ecológico de los microorganismos celulolíticos: abundancia de residuos orgánicos fibrosos, humedad suficiente en el suelo, presencia de árboles frondosos o vegetación espontánea vigorosa en el lugar (Goyal *et al.*, 2005 y Alvarado, 2010). En el quinto ambiente se tomaron cinco submuestras de compost a 10 cm de profundidad de la pila, se homogenizó y se extrajo una muestra de 500 g.

Aislamiento y selección preliminar de los hongos

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM "MFL". Para el aislamiento se tomó 1 g de sustrato de las muestras colectadas en cada uno de los ambientes y se siguió la metodología de las diluciones seriadas

(Stanier e Ingraham 1996). Se efectuaron diluciones hasta 10^{-3} y se sembraron por triplicado en medio agar sabouraud modificado que contenía dextrosa 1,0%, celulosa amorfa (Himedia) 1,5% y agar noble 1,5%, con pH ajustado a 5,6. Se incubó por 72 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$; transcurrido este tiempo se escogieron todas las colonias por sus características morfológicas macroscópicas de forma, color, tamaño, borde, superficie y elevación, se resembraron y purificaron para su conservación en tubos con agar sabouraud, inclinado.

Preselección de hongos degradadores de celulosa

Para seleccionar los hongos según su capacidad de degradar celulosa, se sembraron los hongos aislados en punción en el medio de cultivo agar Carboximetilcelulosa (CMC); el medio estaba compuesto por CMC 1%, extracto de levadura 0,25%, peptona 0,25%, sulfato de amonio 0,05%, cloruro de calcio 0,05%, fosfato monobásico de potasio 0,01%, fosfato dibásico de potasio 0,01% y agar 1,5%; el pH del medio fue ajustado a 7,0 y se incubó a 30°C por 72 horas. Se reveló el medio con la solución de rojo congo al 1% (p/v) (Wen-Jinget *et al.*, 2005; Gaitan y Perez, 2007). El colorante se dejó actuar por 15 minutos. Se retiró el exceso y se lavó dos veces con solución de cloruro de sodio 2 mol/L, dejando en reposo durante quince minutos. Se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros (Constantino *et al.*, 2011; Ortiz y Uribe, 2010). Como control positivo se empleó *Pleurotus ostreatus*, dado su comprobada actividad celulosa (Valáskova y Baldrian, 2006; Valencia, 2009).

Capacidad de crecimiento de los hongos celulolíticos aislados que produjeron halo de hidrólisis

Los hongos celulolíticos aislados se sembraron en punción en medio Sabouraud con pH ajustado a 5,6 e incubados a 30°C , por 72 horas; transcurrido este tiempo se midió el crecimiento radial.

Influencia del pH sobre el crecimiento de los hongos celulolíticos aislados

Con cada uno de los hongos celulolíticos aislados se preparó un pre-inóculo en caldo arroz al 3% y pH 5,6, este medio no requiere tratamiento térmico interno para la esterilización, lo cual facilita la producción de inóculos artesanales (Otalora *et al.*, 2001; Chavez, 2006), se incubó a 30°C por 72 horas y una agitación de 140 rpm en zaranda termostataada (Guillen *et al.*, 1999). De cada cultivo se tomaron 5 mL con 10^6 UFC. mL^{-1} y se inocularon en erlenmeyers de 125 mL de capacidad efectiva y 45 mL de caldo arroz. El pH fue ajustado a 3-5-7-9 con HCl 0,1 N. Todas las muestras fueron incubadas a 30°C por 72 horas. El micelio (biomasa) se filtró y secó a 60°C para luego ser pesado en gramos (Henao *et al.*, 2006).

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los hongos celulolíticos aislados

Con cada uno de los hongos celulolíticos aislados se preparó un pre-inóculo en caldo arroz al 3% con pH 5,6, se incubó a 30°C por 72 horas y una agitación de 140 rpm en zaranda. De cada cultivo se tomaron 5 mL con 10^6 UFC. mL^{-1} y se inocularon en erlenmeyer de 125 mL de capacidad efectiva con 45 mL de caldo arroz a pH 5,6 e

incubaron a 50 y 70°C por 72 horas. El micelio (biomasa) se filtró y secó a 60°C para luego ser pesado en gramos (Henao *et al.*, 2006).

Caracterización del hongo celulolítico seleccionado

Al hongo celulolítico aislado que resultó con mejores valores en la degradación de la celulosa y el crecimiento a distintos niveles de pH y temperatura se le realizó las siguientes caracterizaciones, empleando tres réplicas analíticas en cada prueba:

Dinámica de crecimiento

Al hongo celulolítico seleccionado se le realizó una dinámica de crecimiento a las 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; la evaluación del crecimiento fue llevada a cabo en erlenmeyers de 125 mL de capacidad, para lo cual se empleó un pre-inóculo fresco, concentrado 10⁶ y se inoculó en 50 mL de caldo arroz con pH de 5,6. Cada uno de los tratamientos se incubaron a 30°C con agitación de 140 rpm en zaranda termostatada (Henao *et al.*, 2006). En los tiempos indicados se retiraron los erlenmeyers, el micelio (biomasa) se filtró y secó a 60°C para luego ser pesado en gramos.

Actividad amilolítica

El hongo celulolítico seleccionado se inoculó en placas con agar almidón al 1% (p/v). El medio se modificó con una composición a base de almidón soluble 1%, extracto de levadura 0,25%, peptona 0,25%, sulfato de amonio 0,05%, cloruro de calcio 0,05%, fosfato monobásico de potasio 0,01%, fosfato dibásico de potasio 0,01% y agar 1,5%. El pH se ajustó a 5,6. Se incubó a 30°C por 72 horas. La degradación se reveló utilizando una solución de lugol al 0,5% (p/v). Se empleó como control positivo el hongo *Aspergillus niger* el cual tiene comprobada capacidad amilolítica (Rodríguez *et al.*, 2006).

Actividad pectinolítica

El hongo celulolítico seleccionado se inoculó en agar pectina al 1% (p/v). El medio se modificó con una composición a base de pectina soluble 1%, sulfato de amonio 0,05%, cloruro de calcio 0,05%, fosfato monobásico de potasio 0,01%, fosfato dibásico de potasio 0,01% y agar 1,5%. El pH se ajustó a 5,6; se incubó a 30°C por 72 horas. La actividad pectinolítica se determinó por la presencia de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias, revelado con lugol (Sun y Zhao, 2010; Valencia *et al.*, 2011). Se empleó como control positivo el hongo *Colletotrichum sp.* El cual tiene comprobada capacidad pectinolítica (Agrios 2005; Valencia, 2009).

Análisis estadístico de los resultados

En los criterios de selección: degradación de celulosa y crecimiento radial de los hongos celulolíticos aislados se calcularon la media y desviación estándar entre las réplicas analíticas de cada cepa. A los hongos seleccionados por el mayor halo de hidrólisis en CMC, peso de biomasa a distintos niveles de pH y temperatura se efectuó un análisis de varianza según Diseño Completamente Aleatorizado y prueba de Tukey para la comparación de medias donde se encontró significación estadística. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software estadístico INFOSTAT Versión 1 (Balzarini *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y selección preliminar de los hongos

Se aislaron un total de 131 hongos de los cinco ambientes de muestreo que se encuentran distribuidos así: área orgánica (21); área convencional (50); bosque (16); área cañera (19) y de compost (25). Se observa que el mayor número de hongos celulolíticos aislados corresponden al área convencional, lo cual puede estar dado, porque estos microorganismos, con capacidad celulolítica y menor exigencia a factores de tipo nutricional, pueden adaptarse mejor en ambientes más degradados y de baja fertilidad natural (Alcarraz *et al.*, 2010).

Selección de hongos celulolíticos

En la tabla 1 (pág. 184) se señalan los 48 hongos celulolíticos aislados que produjeron actividad celulolítica en CMC; estos resultados son similares a los reportados por Cruz *et al.*, (2009) quien aisló de la sabana-Bogotá 46 microorganismos fúngicos para degradar xilano, siendo promisorios los hongos *Aspergillus niger* y *Cladosporium herbarum*; o los obtenidos por García *et al.*, (2012) quien aisló *Trichoderma reesei* a partir de tejidos vegetales en descomposición, observando dominancia de éste en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y capacidad para competir con otros microorganismos.

A pesar de que la mayor variabilidad de hongos se encontró en el área de agricultura convencional, el hongo celulolítico aislado con mejor actividad celulasa proviene del área orgánica, probablemente las condiciones de suelo con mayor contenido de materia orgánica favorecen la actividad enzimática de los hongos filamentosos ya que son descomponedores primarios de la materia orgánica y por lo tanto colonizan e hidrolizan muy rápido los compuestos orgánicos (Pérez *et al.*, 2010; Aruani *et al.*, 2012). Lo cual coincide con estudios realizados en los llanos Orientales de Colombia para el aislamiento de hongos lignolíticos y celulolíticos capaces de degradar desechos de cosecha y mejorar las características del suelo, donde encontraron dos cepas con alta actividad exoglucanasa (055C y 061C *Penicillium* spp.) y una cepa con alta actividad endoglucanasa (019C *Trichoderma* spp.) frente al control *Trichoderma viride* (Ortiz y Uribe, 2010).

El hongo celulolítico aislado AO-8 del área de agricultura orgánica tiene la mayor actividad celulolítica, seguida del AQ-8 del área convencional, considerando el promedio de las tres réplicas analíticas, aunque el AO-8 registra menor desviación típica de sus valores. La actividad celulolítica de estos dos hongos resultó muy similar al control positivo empleado por Valáskova y Baldrin (2006) y Valencia (2009). Igualmente coincide con la evaluación cualitativa de actividad celulasa reportada por Gutiérrez *et al.*, (2012) en estudios realizados con *Aspergillus niger* que tuvo una producción de B-endoglucanasa de 0,02463 uL/mL, *Cladosporium herbarum* con 0,0554 uL/mL de B-exoglucanasa y *Trichoderma reesei* que mostró la mejor actividad celulolítica B-glucosidasa con 0,000138 uL/mL.

Tabla 1. Actividad celulolítica y crecimiento radial de hongos celulolíticos aislados. Se muestran los datos de desviación estándar (DS) y del error estándar (EE).

Table 1. Cellulolytic activity and radial growth of cellulolytic fungi isolates. The standard deviation and the standard error values are presented.

Ambientes	Hongo celulolítico aislado	Actividad celulolítica mm±DS	Crecimiento radial mm± DS
Área orgánica	AO-1	7,67±0,47	20,75±4,43
	AO-2	6,67±0,47	9,33±0,31
	AO-3	5,00±0,82	21,17±3,38
	AO-4	7,00±0,82	19,77±1,33
	AO-5	6,00±1,41	19,17±1,24
	AO-6	6,00±0,82	15,29±0,56
	AO-7	2,83±1,04	16,50±0,41
	AO-8	10,67±0,31	42,25±1,24
Área de compost	AC-1	1,47±0,39	15,67±0,24
Área de bosque	BM-1	3,00±0,82	20,58±0,31
	BM-2	5,33±0,94	21,42±0,46
Área cañera	RC- 1	4,67±1,70	18,57±0,31
	RC- 2	4,33±0,47	11,38±1,46
	RC- 3	7,67±0,47	26,96±0,12
	RC- 4	3,67±1,89	12,58±1,61
Área de agricultura convencional	AQ-1	1,33±0,94	14,20±0,42
	AQ-2	4,33±1,25	16,00±0,61
	AQ-3	7,67±0,47	6,25±0,74
	AQ-4	4,00±0,82	14,63±0,47
	AQ-5	3,17±0,62	5,17±0,62
	AQ-6	5,33±3,30	15,67±0,74
	AQ-7	2,17±0,78	29,75±1,61
	AQ-8	10,33±1,25	29,88±4,61
	AQ-9	2,67±0,47	15,46±0,16
	AQ-10	2,67±0,47	16,50±0,71
	AQ-11	2,67±1,70	23,21±0,88
	AQ-12	4,33±0,94	14,75±0,74
	AQ-13	4,33±0,47	14,75±0,35
	AQ-14	5,00±1,78	15,75±0,41
	AQ-15	3,67±0,47	18,33±0,31
	AQ-16	3,33±1,25	12,93±0,31
	AQ-17	2,00±0,82	11,29±0,87
	AQ-18	3,17±0,24	14,88±0,67
	AQ-19	3,67±0,94	20,54±0,56
	AQ-20	3,77±0,87	13,42±0,42
	AQ-21	3,17±0,24	16,00±2,07
	AQ-22	3,33±1,25	16,09±0,48
	AQ-23	5,00±0,82	17,58±1,56
	AQ-24	2,67±1,25	15,58±0,85
	AQ-25	1,67±0,47	14,21±0,31
	AQ-26	5,67±0,47	20,04±1,55
	AQ-27	5,00±0,82	22,25±0,61
	AQ-28	3,67±0,47	18,21±0,86
	AQ-29	3,67±0,47	19,08±0,96
	AQ-30	5,00±1,41	21,08±0,92
	AQ-31	2,23±0,05	19,42±0,92
	AQ-32	4,33±0,47	18,88±0,62
	AQ-33	3,33±0,47	18,58±2,04
Control positivo	<i>Pleurotus ostreatus</i>	10,30±0,20	
EE (±)		±0,73	±0,97

Sin embargo, los mejores diámetros de actividad celulolítica encontrados en el presente trabajo son inferiores a los halos de 5 y 3 cm que produjeron *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, respectivamente, reportados por Gutiérrez *et al.*, (2012); así como a las zonas de aclaramiento de 7,5 cm para hongos del género *Trichoderma* en los trabajos de Ponce y Castillo (2011).

Probablemente se requiera una mayor optimización del medio de cultivo suplementado con fuentes de carbono y nitrógeno, sustancias surfactantes y mejores condiciones de aireación y agitación para conocer el verdadero potencial enzimático de la alta variabilidad de hongos encontrados en los diferentes sitios de muestreo.

Tomando en cuenta los criterios de evaluación cualitativa de producción celulosa *in vitro* expresado por Gutiérrez *et al.*, (2012), se seleccionaron nueve hongos celulolíticos que obtuvieron un diámetro de actividad celulolítica superior a los 6 mm; de estos, seis pertenecen al área de agricultura orgánica, dos al área convencional y uno al área de producción de caña de azúcar. Los hongos que se incluyen dentro de este rango son: AO-1; AO-2; AO-4; AO-5; AO-6; AO-8; AQ-3; AQ-8 y RC-3; a los cuales se evaluó capacidad de crecimiento a diferentes niveles de pH y temperaturas (tabla 3, pág. 186), ya que son dos factores ambientales que se presentan, con diferentes valores, durante las fases del proceso de compostaje de los residuos orgánicos y los microorganismos que participan en él deben estar adaptados a estas condiciones para cumplir su acción degradadora (Zhang 2011; Borrero y Silva 2005). En ambos factores abióticos el aislado fúngico AO-8 tuvo la mejor respuesta en los diferentes niveles estudiados.

Se observa en la tabla 2 que la producción de biomasa de los hongos celulolíticos aislados es mayor en medio ácido, a pH 5 se consiguió los promedios más altos y con baja variación entre los diferentes hongos, ya que siete de ocho se agrupan en una misma categoría estadística; igualmente crecen mejor a 50°C, aunque se manifiestan en dos rangos estadísticos.

Tabla 2. Producción de biomasa (g/L) de hongos celulolíticos a distintos valores de pH y temperatura. Se presenta el error estándar (EE).

Table 2. Biomass production (g/L) of cellulolytic fungi at different pH and temperature levels. The standard error values are presented.

Hongos celulolíticos aislados	pH				Temperaturas	
	3	5	7	9	50°C	70°C
AO-1	3,43ab	3,60 b	2,20 c	2,23 a	1,27 a	0,97 ab
AO-2	3,73ab	4,25 a	3,23ab	2,37 a	1,30 a	0,97 ab
AO-4	3,60ab	4,23 a	3,17ab	2,40 a	1,27 a	0,80 ab
AO-5	3,83ab	4,33 a	3,47 a	2,67 a	1,13 ab	1,00 ab
AO-6	3,83ab	4,37 a	3,33ab	2,73 a	1,33 a	0,6 ab
AO-8	4,12 a	4,40 a	3,57 a	2,80 a	1,40 a	1,13 a
AQ-3	3,43ab	4,37 a	3,10ab	2,62 a	1,03 ab	1,03 ab
AQ-8	3,40 b	4,23 a	2,87 b	2,27 a	1,33 a	0,97 ab
RC-3	3,23 b	4,27 a	2,90 b	2,43 a	0,73 b	0,57 b
EE (±)	0,14	0,10	0,10	0,17	0,11	0,10
p	0,0090	0,0007	<0,0001	0,2460	0,0085	0,0166

Letras iguales en columnas no difieren estadísticamente según Tukey $p \leq 0,05$.

Columns with the same letters do not differ statistically according to Tukey's test $p \leq 0.05$.

Tabla 3. Actividad amilolítica y pectinolítica de la cepa AO-8. Se muestran los datos de desviación estándar (DS) y del error estándar (EE).

Table 3. Amylolytic and pectinolytic activity of the strain AO-8. The standard deviation and the standard error values are presented.

Hongo	Actividad amilolítica	Actividad pectinolítica
	mm±DS	mm±DS
AO-8	11,71±0,19	2,75±0,24
Control positivo	11,47±0,31	2,83±0,15

La respuesta a estos parámetros ambientales corresponde a lo que acontece en la descomposición controlada de la materia orgánica, ya que a medida que se van produciendo ácidos orgánicos por acción de los hongos se produce una disminución del pH del medio y aumento de temperatura, lo cual favorece su crecimiento (Peláez *et al.*, 2008).

Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por Henao *et al.*, (2006) quienes al evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad celulolítica del hongo *Aspergillus niger*, uno de los principales hongos celulolíticos, encontraron que el rango óptimo del pH es de 3 a 5 y la temperatura alrededor de 60°C. En sentido inverso, Guillen *et al.*, (1999) demostraron en estudios con *Aspergillus tamarii* que cuando el pH inicial del medio de cultivo estaba por encima de 10 o por debajo de 4 la producción de biomasa y de enzimas era inhibida y que este hongo no creció a temperaturas superiores a 42°C.

Caracterización del hongo celulolítico seleccionado AO-8

Dinámica de crecimiento

En la figura 1 se muestra la curva de crecimiento del hongo celulolítico seleccionado AO-8. En las primeras horas comienza el crecimiento del cultivo que se mantiene en fase logarítmica hasta las 96 horas.

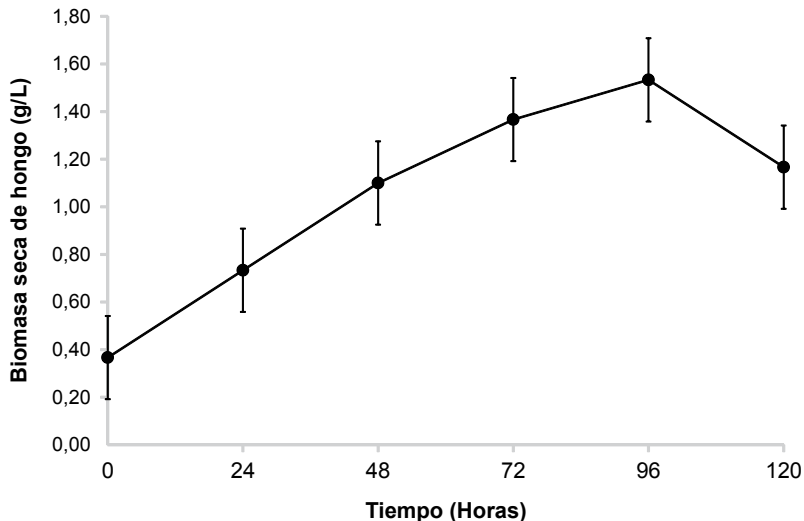


Figura 1. Dinámica de crecimiento del hongo AO-8.

Figure 1. Fungus growth dynamics AO-8.

Actividad amilolítica y pectinolítica

Al evaluar la actividad amilolítica y pectinolítica del hongo celulolítico aislado AO-8 se encontró promedios de 11,71 y 2,75 mm, respectivamente; estos valores resultaron muy similares a los controles positivos empleados en este experimento para la respectiva comparación. Sin embargo, se reportan hongos con mayor actividad amilolítica y pectinolítica, donde se obtuvieron promedios de 33,6 y 15,6 mm de diámetro de halo, respectivamente (Hena *et al.*, 2006; Alvarado 2010). La diversa actividad enzimática responsable de la degradación de compuestos orgánicos resulta ser una característica muy importante en microorganismos que tienen potencial uso como inóculos en compostaje, dado la diversidad de residuos orgánicos (Milpa- Mejía *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

En todos los ambientes muestreados se aislaron hongos con alguna actividad celulolítica, en el ambiente de agricultura orgánica se seleccionó el mayor número de cepas promisorias.

El hongo celulolítico aislado AO-8 proveniente del área orgánica tiene el mejor comportamiento en cuanto a la actividad celulolítica y capacidad de crecimiento en diferentes niveles de pH y temperatura.

El hongo celulolítico aislado AO-8 tiene crecimiento en fase logarítmica hasta las 96 horas, y capacidad enzimática para degradar almidón y pectina.

El hongo AO-8 tiene potencial para ser usado como inóculo, se debería estudiar en futuros trabajos de compostaje.

Se debe identificar y clasificar el hongo aislado seleccionado AO-8.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2005. Plant pathology. Quinta edición. Ámsterdam. Elsevier. Academie press. 922.
2. Alcarraz, M.; Flores, A.; Godoy J. 2010. Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. 13: 97-102.
3. Alvarado, S. 2010. Dinámica de la materia orgánica en suelos agrícolas. Ponencia XI. Congreso ecuatoriano de la ciencia del suelo. Santo Domingo-Ecuador.
4. Aruani, M. C.; Gili, P.; Machuca, Y.; Spera, N. 2012. Evaluación de las características físico-químicas y biológicas en dos suelos superficiales cultivados con pera (*Pyrus communis* L.) cv. Williams bajo manejo convencional. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 44(1): 77-84.
5. Baldrian, P.; Kolářik, M.; Štursová, M.; Kopecký, J.; Valášková, V.; Větrovský, T.; Žifčáková, L.; Šnajdr, J.; Rídl, J.; Vlček, C.; Voříšková, J. 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. ISME J. 6(2): 248-258.
6. Balzarini, M.; Casanoves, F.; Di Rienzo, J.; Gonzales, L.; Robledo, C. 2001. Infostat Software estadístico Versión 1. Córdoba Argentina.

7. Borrero, C.; Silva, M. 2005. Efectos in vitro de *Trichoderma* en los microorganismos no patógenos descomponedores de materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del Piedemonte Llanero.002, Colombia: Villavicencio. Orinoquia. 9: 6-14.
8. Chandna, P.; Nain, L.; Singh, S.; Chander, K. R. 2013. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. BMC. Microbiol.13(2): 99: 1-10.
9. Chavez, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. P. 16.
10. Constantino, M.; Gómez, R.; Álvarez, J.; Pat, J.; Espín, E. 2011. Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. Agron. Costaricense. 35: 15-31.
11. Cruz, N.; Castellanos, D.; Arguello, A. 2009. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana-Bogotá. Revista colombiana de Ciencias Hortícolas. 3(2): 237-249.
12. Gaitán, D.; Perez, L. 2007. Aislamiento y evaluación de Microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Microbiología Industrial. Bogotá, D.C.
13. García, Y.; Ramírez, W.; Sánchez S. 2012. Indicadores de la calidad de los suelos: Una nueva manera de evaluar este recurso. Pastos y Forrajes. 35: 125-138.
14. Goyal, S.; Dhull, S.; Kapoor, K. 2005. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. Bioresource Technology. 96: 1584-1591.
15. Guillen, F.; Arrias, F.; Fazzano, S.; Lenartovicz, V.; Marques de Souza, C.; Peralta, R. 1999. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. Revista de Microbiología. 30:157-162.
16. Gutiérrez, V.; Pinzón, A.; Casas, J.; Martínez, M. 2008. Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia boudiana* Bertoni. Agronomía colombiana. 26(3): 497-504.
17. Gutierrez, L.; Perez, J.; Uribe, M. 2012. Evaluación in vitro de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*. Journal of Agriculture and Animal Sciences. 1(1): 7-15.
18. Henao, I.; Franco, M.; Marín, G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. Scientarium. 11(2): 52-60.
19. Izquierdo, J.; Sizova, A.; Lee, R. 2010. Diversity of Bacteria and Glycosyl Hydrolase Family 48 Genes in Cellulolytic Consortia Enriched from Thermophilic Biocompost. Applied and Environmental Microbiology. 76(11): 3545-3553.
20. Lan, T.; Wei, D.; Yang, S.; Liu, X. 2013. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. BioresourTechnol. 5(133):175-82.
21. MAGAP, (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca). 2008. Políticas de Estado para el desarrollo agropecuario, Quito-Ecuador. 128 p.
22. Martínez, H.; Fuentes, E.; Acevedo, H. 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. J. Soil Sc. Plant Nutr. 8(1): 68-96.
23. Milpa-Mejía, S.; Grenón-Cascales, G. N.; González-Castellanos, A.; Vázquez-García, L. N. 2012. Cultivo en maceta de *Iris xiphium* L. (Iris de Holanda) con diferentes concentraciones de humus de lombriz y sus lixiviados. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 44(2): 109-117.
24. Munero, P.; Gonzalez, J.; Pérez, C.; Manso, M.; Díaz, F. 2005. Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de Hyphomycetes nativos de la provincia de Villa Clara. 32(3): 21-24.
25. Ortiz, M.; Uribe, D. 2010. Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. Cienc. Suelo. 28(2): 169-180.
26. Otalora, A.; Martínez, M.; Pedroza, A. 2001. Evaluación de medios de cultivos alternos para la producción de *Trichoderma harzianum*. Tesis microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá.
27. Oviedo, O. R.; Marmolejo, R. L.; Torres, L. P. 2012. Perspectivas de aplicación del compostaje de biorresiduos provenientes de residuos sólidos municipales. Un enfoque desde lo global a lo local. Rev. Ing. Univ. 11(20): 67-76.
28. Peláez, A.; Meneses, M.; Miranda, L.; Magias, M.; Bárcena, R.; Loera, O. 2008. ventajas de la fermentación sólida con *Pleurotus sapidus* en ensilajes de caña de azúcar. Archivos de zootecnia. 57(217): 25-33.

29. Pérez, B. Y.; Rebolledo, R. R.; Martínez, S. J. 2010. Isolation and identification of fungi in compost from municipal solid waste. *Agro Sur*. 38(1): 1-7.
30. Ponce, K.; Castillo, E. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica y enzimo-funcional de hongos lignino-celulolíticos procedentes de la corteza de aliso (*Alnus acuminata*), Arrayán (*Myrcian theshallii*) y Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) presentes en las manchas del bosque nativo del Pasochoa, bajo condiciones de laboratorio. ESPE. Tesis Ingeniería en biotecnología.
31. Rodríguez, Z.; Bocourt, R.; Rodríguez, J.; Albelo, N.; Núñez, O.; Herrera, F. 2006. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. *Revista cubana de ciencia agrícola*. 40(3): 349-354.
32. Stanier, R.; Ingraham, J. 1996. *Microbiología*. Reverté S. A. 195 p.
33. Sun, H.; Zhao, P.; Ge, X.; Xia, Y.; Hao, Z.; Liu, J.; Peng, M. 2010. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160. 988-1003.
34. Valásková, V.; Baldrian, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in microbiology*. 157(2):119-124.
35. Valencia, M. 2009. Caracterización enzimática de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas. Tesis microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
36. Valencia, M.; Quevedo, B.; Franco, M.; Ortega, H. 2011. Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Univ. Sci.* 16. 147-159.
37. Vargas, G. M.; Suárez, E. F.; López, M.; Moreno, J. 2007. In vitro Studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59(4): 322-328.
38. Varnero, M.; Galleguillos, K.; Rojas, R. 2011. Sistemas de Compostaje para el Tratamiento de Alperujo. *Inf. Tecnol.* 22(5): 49-56.
39. Wen, J. L.; Hong, T. W.; Shi, J. Y.; Zhi, Ch. W.; Yong, F. N. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 353-360.
40. Zhang, S.; Wang, Q.; Wan, R.; Xie, S. 2011. Changes in bacterial community of Anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil. *Journal of Zhejiang University-Science*. 12: 760-768.

Agradecimientos

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López"-Ecuador por el financiamiento de la investigación.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí-Ecuador por la apertura en la realización de este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas-Cuba que aportaron con ideas y acciones en este trabajo.