

**CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A  
RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS (FRUTO Y TORTA) DE LA HIGUERILLA  
(*Ricinus communis*)”**

**DIANA CAROLINA MENESES CABEZAS**  
*Bióloga*

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MANIZALES  
2011**

**“CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS  
A RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS (FRUTO Y TORTA) DE LA HIGUERILLA  
(*Ricinus communis*)”**

**DIANA CAROLINA MENESES CABEZAS**  
**Bióloga**

***Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de  
Especialista en Microbiología Industrial***

***Líneas de Investigación:***

**APROVECHAMIENTO BIOLÓGICO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES –  
BIOINSUMOS – ESTUDIO, USOS Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD  
MICROBIANA**

***Directora:***

**M.Sc TERESA CABRA CENDALES**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MANIZALES  
2011**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Firma de Director del Trabajo de Grado**

\_\_\_\_\_  
**Firma del presidente del Comité de Programa**

\_\_\_\_\_  
**Firma de integrante del Comité de Programa**

Manizales, 9 Diciembre de 2011

## DEDICATORIA

*A mi Señor, Dios, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo.*

*A mi esposo, Germán, quien me brindó su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante. Te amo.*

*A mis padres Antonio y Ruby, por su comprensión y ayuda en momentos malos y menos malos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Los amo.*

*A mi sobrina María José, por ser lo más grande que me ha pasado hasta ahora y por distraerme y relajarme en momentos de estrés. Te amo mi cuchufleca hermosa.*

*A los que nunca dudaron que lograría este triunfo: mis hermanos Katherine, Magda, Marco.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que colaboraron en la realización de esta investigación, ya que fueron fundamentales en el soporte teórico práctico de la misma.

A la Doctora Teresa Cabra Cendales por su gran conocimiento y experiencia, que permitió una gran orientación en el desarrollo de todo el proceso investigativo.

A la Magistra Patricia Vélez por su gran conocimiento y experiencia, que permitió una gran orientación en el proceso investigativo.

A Claudia Payan Bastidas por sus enseñanzas, trasnochos, sábados, festivos, y todo un año de trabajo. Una gran amiga.

A la Magistra Gloria Inés Estrada por su colaboración, apoyo y enseñanza en la investigación.

Al Microbiólogo Fernando Galeano por su colaboración en biología molecular.

A las niñas del CALER: Gladicita, Amparito, Dianita, Angelita, Martica y la Jefe Paulita por ayudarme incondicionalmente.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS .....	13
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1. LA HIGUERILLA ( <i>Ricinus communis</i> ) .....	14
2.1.1 ORIGEN.....	14
2.1.2 BOTÁNICA Y TAXONOMÍA .....	15
2.1.3 ECOLOGÍA .....	16
2.1.4 ASPECTOS AGRONÓMICOS .....	17
2.1.5 COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE HIGUERILLA .....	18
2.1.6 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ACEITE DE RICINO .....	18
2.1.7 USOS DE LA HIGUERILLA.....	19
2.2. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	20
2.2.1 CELULOSA Y BIOCONVERSIÓN.....	21
2.2.2 HEMICELULOSA .....	23
2.2.3 LIGNINA.....	24
2.3. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA .....	25
3. METODOLOGÍA.....	27
3.1. PASO 1: TOMA DE MUESTRA .....	27
3.2. PASO 2: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	27
3.3. PASO3: PROCESO DE SIEMBRA Y RECUPERACION DE LOS MICROORGANISMOS.....	28
3.4. PASO 4: AISLAMIENTO DE LAS COLONIAS .....	28
3.5. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	29
3.6. PRUEBAS MOLECULARES E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS.....	29

3.7. PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
4.1. AISLAMIENTO BACTERIAS Y LEVADURAS.....	30
4.1.1 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS .....	30
4.2. AISLAMIENTO HONGOS FILAMENTOSOS .....	44
4.2.1 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS .....	44
CONCLUSIONES.....	52
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54
ANEXOS.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la semilla de higuera. ....	18
Tabla 2: Componentes aceite de ricino. ....	18
Tabla 3: Número de colonias recuperadas de levaduras y bacterias presentes en el fruto y la torta de higuera. ....	30
Tabla 4: Resultados de las colonias identificadas por secuenciación ....	31
Tabla 5: <i>Bacillus sp</i> (Identificación molecular) ....	31
Tabla 6: <i>Bacillus altitudinis</i> (Identificación molecular) ....	33
Tabla 7: <i>Bacillus pumilus</i> (Identificación molecular) ....	34
Tabla 8: <i>Bacillus subtilis</i> (Identificación molecular) ....	36
Tabla 9: <i>Staphylococcus sp</i> (Identificación molecular) ....	37
Tabla 10: <i>Staphylococcus sciuri</i> (Identificación molecular) ....	38
Tabla 11: <i>Halomona sp</i> (Identificación molecular) ....	39
Tabla 12: <i>Rhodosporidium paludigenum</i> (Identificación molecular) ....	41
Tabla 13: <i>Pichia burtonii</i> (Identificación molecular) ....	42
Tabla 14: Número de colonias recuperadas de hongos filamentosos presentes en el fruto y la torta de higuera. ....	44
Tabla 15: <i>Penicillium brevicompactum</i> (Identificación molecular) ....	44
Tabla 16: <i>Penicillium olsonii</i> (Identificación molecular) ....	47
Tabla 17: <i>Fusarium solani</i> (Identificación molecular) ....	48
Tabla 18: <i>Fusarium equiseti</i> (Identificación molecular) ....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la celulosa .....	22
Figura 2. Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y $\beta$ -glucosidasa.....	22
Figura 3. Estructura molecular de la hemicelulosa y sitio de acción de las enzimas endo- $\beta$ -xilanasasa, $\alpha$ -glucoronidasa, $\alpha$ -arabinofuranosidasa y $\beta$ -xilosidasa. ....	23
Figura 4. Estructura de lignina (Bommarius & Riebel, 2004) .....	24
Figura 5. Preparación muestras para inoculación .....	28
Figura 6. <i>Bacillus sp</i> (197_AG_B-RM) (Agar Sangre) .....	32
Figura 7. <i>Bacillus sp</i> (201_AG_B-RM) (Agar Sangre) .....	32
Figura 8. <i>Bacillus sp</i> (202_AG_B-RM) (Agar Sangre) .....	32
Figura 9. <i>Bacillus altitudinis</i> (Agar Sangre) .....	33
Figura 10. <i>Bacillus altitudinis</i> (imagen tomada al microscopio 100X) .....	34
Figura 11. <i>Bacillus pumilus</i> (Agar Sangre).....	35
Figura 12. <i>Bacillus pumilus</i> (imagen tomada al microscopio 100X).....	35
Figura 13. <i>Bacillus subtilis</i> (Agar Sangre) .....	36
Figura 14. <i>Bacillus subtilis</i> (imagen tomada al microscopio 100X) .....	36
Figura 15. <i>Staphylococcus sp</i> (Agar Sangre).....	37
Figura 16. <i>Staphylococcus sp</i> (imagen tomada al microscopio 100X) .....	38
Figura 17. <i>Staphylococcus sciuri</i> (Agar Sangre) .....	38
Figura 18. <i>Staphylococcus sciuri</i> (imagen tomada al microscopio 100X) .....	39
Figura 19. <i>Halomona sp</i> (Agar Sangre) .....	40
Figura 20. <i>Halomona sp</i> (imagen tomada al microscopio 100X) .....	40
Figura 21. <i>Rhodosporidium paludigenum</i> (imagen tomada al estereoscopio) .....	41
Figura 22. <i>Rhodosporidium paludigenum</i> (imagen tomada al microscopio) .....	41
Figura 23. <i>Pichia burtonii</i> (imagen tomada al estereoscopio).....	43
Figura 24. <i>Pichia burtonii</i> (imagen tomada al microscopio) .....	43
Figura 25. <i>Penicillium brevicompactum</i> (Agar PDA).....	46
Figura 26. <i>Penicillium brevicompactum</i> (imagen tomada al microscopio) .....	46
Figura 27. <i>Penicillium olsonii</i> (Agar PDA) .....	47
Figura 28. <i>Penicillium olsonii</i> (imagen tomada al microscopio) .....	48
Figura 29. <i>Fusarium solani</i> (Agar PDA) .....	49
Figura 30. <i>Fusarium solani</i> (imagen tomada al microscopio) .....	49
Figura 31. <i>Fusarium equiseti</i> (Agar PDA) .....	50
Figura 32. <i>Fusarium equiseti</i> (imagen tomada al microscopio) .....	51

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción DE DNA en Levadura .....	57
Anexo 2. Extracción DNA Bacterias.....	58
Anexo 3. Protocolo Extracción de Hongos de Wendland et al. (1996) .....	59

## RESUMEN

En el presente estudio se aislaron los microorganismos presentes en los residuos lignocelulósicos provenientes de la cosecha y procesamiento de la higuera, (*Ricinus communis*) fruto y torta, las muestras se tomaron de un cultivo de higuera de la Granja Montelindo de la Universidad de Caldas, en el departamento de Caldas, Colombia.

La identificación de bacterias, hongos filamentosos y levaduras se realizó por análisis de secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR con primers universales RM y RW para bacterias y primers ITS1 e ITS4 para hongos filamentosos y levaduras. Para observar las características microscópicas de los hongos filamentosos se realizó la técnica de microcultivos y se utilizó la clave taxonómica de hongos imperfectos de Barnett y Hunter.

Se obtuvieron 23 aislamientos de bacterias, 4 de los residuos de fruto y 19 de los residuos de torta, 10 aislamientos de levaduras, 3 del fruto y 7 de la torta y 21 aislamientos de hongos filamentosos, 7 del fruto y 14 de la torta.

De los aislamientos bacterianos se identificaron 7 especies, 3 del fruto y 4 de la torta, de las cuales 2 especies son de importancia agroindustrial *Bacillus pumilus* encontrada en la torta y en el fruto y *Bacillus subtilis* encontrada en la torta.

De los aislamientos de levaduras se identificaron 2 especies *Rhodosporidium paludigenum* encontrada en el fruto y *Pichia burtoni* encontrada en la torta las dos de importancia agroindustrial.

De los aislamientos de hongos filamentosos se identificaron 4 especies 2 del fruto y 2 de la torta, de los cuales *Penicillium brevicompactum* encontrado en fruto y torta y *Fusarium solani* encontrado en la torta, son reportados en la literatura como posibles degradadores de celulosa.

**Palabras clave:** Residuos lignocelulósicos, degradadores de la lignocelulosa, *Ricinus communis*, microorganismos de importancia agroindustrial, secuenciación.

## INTRODUCCIÓN

La industria agrícola y alimentaria produce millones de toneladas de residuos sólidos y líquidos cada año, en el caso de la higuera (*Ricinus communis*) la producción mundial en el 2006 fue 1'282.807 toneladas siendo la India el principal país productor, seguido de China y Brasil (Barbosa, 2009). Estos residuos son todavía subutilizados, incluso en los procesos tecnológicos y económicos. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un creciente interés en el desarrollo de nuevos métodos con el fin de sacar provecho de los nutrientes encontrados en los residuos. (Laufenberg G, 2004).

En el Departamento de Caldas, al igual que en otras regiones del país, se están adelantando proyectos para el establecimiento de cultivos de higuera que potencien la extracción de aceite de ricino a nivel industrial, generando fuentes de energía renovables que reemplacen la utilización del petróleo como combustible y se convierta en una opción rentable y sostenible como biocombustible.

Su industrialización genera grandes cantidades de residuos de difícil degradación, la pared celular de los tejidos vegetales está conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina; estos componentes son atacados por microorganismos que poseen la capacidad enzimática para degradarlos; la lignina es un polímero complejo que tiene alto grado de resistencia al ataque microbiano. (Moore y Jung, 2001). Una alternativa importante para lograr disminuir el impacto ambiental causado por los residuos lignocelulósicos generados en el cultivo y procesamiento de la higuera, es acelerar el proceso de compostaje mediante la utilización de un consorcio de microorganismos con actividad lignocelulósica.

Son pocos los estudios realizados sobre la identificación de microorganismos degradadores de residuos lignocelulósicos asociados a esta especie, su caracterización y potenciales aplicaciones en bioprocesos es muy promisorio para nuestro país, además de ser un recurso viable para el sector económico y especialmente para la parte ambiental de la agricultura sostenible.

De otra parte, el uso de microorganismos nativos obtenidos en residuos del cultivo de higuera establecidos en el eje cafetero, garantiza el aislamiento e identificación de una diversidad microbiana propia de las condiciones climáticas y agroecológicas de la región.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y seleccionar los microorganismos asociados a residuos lignocelulósicos provenientes de la higuera (*Ricinus communis*).

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar e identificar los microorganismos presentes en los residuos del cultivo (fruto) y del procesamiento industrial (torta) de la higuera.
- Seleccionar los microorganismos con potencial para la degradación de material lignocelulósico.
- Preservar los microorganismos de interés para el banco de referencia de microorganismos de la UCM.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. LA HIGUERILLA (*Ricinus communis*)

#### CLASIFICACIÓN

- Orden: *Euphorbiales*
- Familia: *Euphorbiaceae*
- Genero Ricinus
- Especie: *Ricinus communis*

La higuera también llamada palma cristi, castor, higuera infernal, tertago, higuera, ricino, es un arbusto que crece silvestre en la mayor parte de las regiones tropicales. Sus semillas son venenosas por lo cual no son consumidas directamente sino que son prensadas y sometidas a extracción por solventes para obtener aceite y torta.

El aceite no es considerado normalmente como comestible, sin embargo posee múltiples usos:

- Refinado tiene uso farmacéutico.
- En bruto se usa como emulsificante para desinfectantes del hogar, industria y pesticidas.
- Modificado se emplea como aceite hidráulico, disolvente de pinturas, impregnación de tintura para textiles y cuero, fusión de ceras naturales y químicas, así como en la fabricación de polímeros.

La torta de higuera no se utiliza como alimento animal debido a la presencia de toxinas y de sustancias alergénicas, su empleo se limita especialmente en aplicaciones de fertilizantes orgánicos.

El cultivo de la higuera se ha extendido en el mundo y su aceite tiene amplio mercado por los múltiples usos y las diversas industrias que fomenta. El creciente desarrollo de la aviación y el constante empleo de motores de altas revoluciones, le dan gran demanda al aceite como lubricante por su gran densidad, porque conserva su viscosidad a diferentes temperaturas y porque solo se congela a los 10°C bajo cero.

#### 2.1.1 ORIGEN

Se supone que la higuera es de origen africano de donde se extendió al Medio Oriente como planta silvestre. En la India y la China se conoce hace unos 3000 años, probablemente se introdujo en América después del descubrimiento. Los

egipcios hace más de 4000 años empleaban la higuera en la iluminación o alumbrado de sus casas, parece que era una planta altamente estimada porque en algunas tumbas egipcias se han encontrado sus semillas.

La higuera es una planta que se encuentra distribuida desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm., se encuentra en los bordes de los caminos, de las quebradas y de los ríos, en solares, en huertas y también sembrada en cultivos comerciales con todas las normas técnicas de la agricultura moderna.

## 2.1.2 BOTÁNICA Y TAXONOMÍA

Es una planta arbustiva que resiste climas variados. Casi todos los autores hablan de una sola especie *Ricinus communis* y de muchas variedades botánicas con características bien definidas.

### 2.1.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

- **Raíz.** Es pivotante y puede alcanzar hasta 3m de profundidad constituyéndose en el anclaje principal de la planta. Presenta raíces secundarias numerosas y oblicuas, situadas a poca profundidad.
- **Tallo.** La planta está dotada de un tallo principal recto seccionado por entrenudos, hueco en su parte interior lo cual facilita la eliminación de la soga. Su color depende de la variedad puede ser verde, rosado o caoba. El tallo principal termina en el primer racimo (inflorescencia), siendo este el más grande de la planta. A partir del cuarto nudo empiezan a aparecer las ramas secundarias que producen a su vez ramas adicionales observándose en ambas producción de racimos.
- **Hojas.** Alternas, pecioladas, palmeadas con 7 a 11 lóbulos, dentadas, con nerviación palmatinervia. Peciolos redondos de 8 a 50 cm de largo y de 10 a 20 cm de longitud; con dos glándulas nectaríferas en la unión con la lámina, dos glándulas en la unión con el peciolo; la lamina de la hoja tiene 10 a 75 cm de diámetro y de un color que va de verde a rojo.
- **Flores.** Están agrupadas en una panícula terminal de 10 a 40 cm de largo, la cual es monoica, las flores femeninas están localizadas en la parte superior y las masculinas en la parte inferior de la inflorescencia. Las flores masculinas están en cimas de 3 a 16 flores de pedicelo de 0.5 a 1.5 cm de largo, de 3 a 5 sépalos verdes de 5 a 7 cm de largo, pétalos ausentes, estambres numerosos de 5 a 10 mm de largo con muchos filamentos ramificados, cada filamento termina en una antera pequeña esférica y de color amarillo claro. Las flores femeninas en cimas de 1 a 7 flores, pedicelo de 4 a 5 mm de largo de 3 a 5 sépalos de color verde de 3 a 5 mm de largo

los cuales se caen rápidamente; ovario superior con tres celdas, un óvulo por cada celda, la pared del ovario cubierta con espinas verdes y suaves, cada una termina en un punto transparente, el cual se cae cuando el fruto se desarrolla, estilo muy corto que se divide en tres estigmas bien definidos de color rojo, suaves, papilados y persistentes.

- **Frutos.** Es una cápsula globosa con pedicelo elongado con tres lóculos de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, generalmente espinoso. Los frutos inmaduros son generalmente verdes y algunas veces rojos, se vuelven cafés en la maduración, los estigmas permanecen en el fruto en forma leñosa. La cápsula puede abrirse y soltar las semillas que son tres, estas pueden ser negras o jaspeadas.
- **Semillas.** De forma oval aplastada, redondeadas en un extremo y con una excrescencia en el otro llamada curúncula, de superficie brillante y lisa, de color variable que suele ser gris con manchas rojizas y parduzcas de tamaño variable que va de 0.5 a 1.5 cm de largo; la semilla tiene una cubierta dura y quebradiza exterior y otra inferior muy fina de color blanquecino, ambas protegen la semilla, la cual consta de un embrión pequeño con sus dos cotiledones delgado y el albumen que es blando, compacto y aceitoso, el albumen es el que contiene el aceite. La semilla contiene toxinas que son ricina (albúmica) y la ricenina (alcaloide) las cuales quedan en el bagazo o torta que sobra en la extracción del aceite.

### 2.1.3 ECOLOGÍA

- **Clima:** Para un cultivo comercial el desarrollo normal de la planta se consigue en climas cálidos y secos con precipitación de 700 a 1200 mm anuales y con baja humedad relativa. Las lluvias deben ser moderadas y bien distribuidas, abundantes en la etapa de desarrollo; la maduración y la cosecha deben coincidir con la época seca para que los racimos sequen uniformemente y no se desprendan los frutos antes de la recolección. Cuando las lluvias pasan los requerimientos mencionados, la planta tiende a desarrollarse mucho vegetativamente con disminución en la producción.
- **Suelos:** La higuera no es exigente en suelos, se desarrolla bien en distintos lugares pero requiere de un buen drenaje y materia orgánica. Presenta un buen sistema de raíces que le permite explorar áreas relativamente profundas. Requiere pH entre 5-6.5.
- **Varietades:** Existe una gran cantidad de variedades y especies de higuera. Se presenta una gran variabilidad por el tamaño de la planta, el color y serosidad de los tallos y pecíolos, color forma y tamaño de las semillas, el tamaño de los racimos, entre otras.

- *Ricinus communis* mayor. Ricino grande. Es la más común, de hojas grandes de color verde glauco, frutos numerosos casi esféricos e indehiscentes, su aceite es más indicado para uso industrial. Madura bien y precoz, es planta ornamental.
- *Ricinus communis* minor. Ricino pequeño. De semillas pequeñas, es dehiscente, planta pequeña y muy ramificada desde la base. Madura bien.
- *Ricinus communis* sanguineus. Ricino sanguínea. Los tallos hojas y frutos son de color rojo intenso, semillas grandes de color pardo claro con manchas oscuras, en regiones frías se cultiva como ornamental.
- *Ricinus communis* viridis. Ricino viridis. Tallos y peciolos son de color verde claro, con tintes ligeramente rosados en los nudos, semillas pequeñas, grisáceas manchadas de pardo. Es tardía, se adapta a regiones templadas con lluvias.
- *Ricinus communis* inermis. Ricino enérme. Tallos, peciolos y hojas jóvenes de color rojizo, que se tornan verdes a la madurez. Los frutos no tienen espinas, semillas de color medio, de color castaño, porte pequeño, es precoz.
- *Ricinus communis* zanzibairiensis. Ricino zanzibar. Propia de climas tropicales, de tallos rojizos y hojas grandes, la fructificación es baja y tardía, semillas grandes, solo tiene valor como planta ornamental.

#### 2.1.4 ASPECTOS AGRONÓMICOS

- **Siembra:** La mejor época para la siembra es al inicio de las lluvias. Esta se hace de forma directa y su distancia de siembra depende de la variedad y del tipo de cultivo a establecer. Se siembra por sitio de 3-4 semillas a 3-5 cm de profundidad para conseguir un alto porcentaje de germinación, se recomienda usar semilla certificada.
- **Fertilización:** Altos niveles de nitrógeno perjudican la cantidad de flores y frutos pues se incrementa el desarrollo de hojas innecesarias. Para obtener un adecuado equilibrio se debe hacer análisis de suelos y darle importancia a las aplicaciones de calcio y fósforo.
- **Cosecha:** Puede iniciarse a los 100-150 días después de la siembra. Los racimos son cortados con cuchillos afilados o tijeras podadoras. Las mejores horas para hacer la recolección son las de la mañana. El corte de los racimos puede hacerse cuando estos han secado completamente pero se corre el riesgo de que se hayan desgranado o se desgranen al tirar los

racimos al suelo. Las variedades dehiscentes se desgranar naturalmente con el secado al sol, luego es necesario limpiar bien la semilla sea por ventilación o a mano.

- **Secado:** Los racimos deben secarse en patios de cemento o cajones grandes y pandos con fondo metálico, o artificialmente en máquinas secadoras. Es imprescindible estar removiendo los racimos para acelerar el secado. Si la cápsula abre explosivamente y el fruto es empujado violentamente es necesario cubrir los cajones con un marco de anjeo para evitar la pérdida de los frutos.
- **Desgrane:** Si la variedad es altamente dehiscente, en la manipulación del secado un gran porcentaje de las cápsulas se desgranar en el proceso y el resto, una vez separados los vástagos secos, es necesario desgranarlos manualmente.

### 2.1.5 COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE HIGUERILLA

**Tabla 1:** Composición química de la semilla de higuierilla.

COMPOSICION	PORCENTAJE
Aceite	46.19
Almidón	20.00
Albúmina	0.50
Goma	4.31
Resina bruta y principios amargos	1.91
Fibra Leñosa	20.00
Agua	7.09
TOTAL	100.00

### 2.1.6 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ACEITE DE RICINO

**Tabla 2:** Componentes aceite de ricino.

Acido Ricinoleico	70%
Acido Ricinico	12%
Acido Oleico	12%
Índice De Saponificación	181%
Índice De Refracción (25°C)	1,47
Densidad (15°C)	0.964

Tomado de: <http://www.unalmed.edu.co/~crsequed/HIGUERILLA.htm>

## 2.1.7 USOS DE LA HIGUERILLA

La planta de higuera es usada para dar sombra a los cultivos de cacao y café por su rápido crecimiento y por el tamaño y forma de su hoja. En la antigüedad se usó para repeler los insectos de los cultivos por los principios tóxicos que tiene y aún algunos campesinos la utilizan para este fin. Se utiliza para la protección de las riberas de los ríos y quebradas, por su adaptabilidad a los suelos arenosos.

Debido a su composición química, el aceite de higuera conserva su viscosidad a altas temperaturas y resiste muy bajas sin congelarse, razón por la cual se emplea para motores de altas revoluciones. El aceite refinado se usa en cosméticos y en productos medicinales. El uso más común es como purgante, llamado aceite de ricino, se considera un vermífugo drástico, que no irrita el intestino, es antirreumático, cura los orzuelos y sirve para eliminar las verrugas. El aceite es adecuado contra las úlceras de la piel, alivia los ojos cuando están enrojecidos o irritados. También es usado en la preparación del paciente para las radiografías estomacales.

El aceite de higuera sulfonado se usa en la impresión y acabado de tejidos de algodón, lino, seda y en curtiembres. Deshidratado sirve de base para la preparación de líquidos para frenos y pinturas y por convertirse en aceite secante reemplaza con ventaja los aceites de tung y de linaza que se importan actualmente. Disuelto en alcohol, se utiliza en la mayoría de manufactura de lociones y perfumes, como base o agente fijador de esencias. La fusión a altas temperaturas con la soda cáustica produce el ácido sebástico que se emplea en la fabricación de plásticos y nylon.

Se emplea además en industrias de caucho, baldosines de asfalto, betunes, ceras, sirve para fabricar cuero artificial, como ingrediente en el encurtido de pieles, para impermeabilizar telas, para producir aceites secantes, como aislante.

En otros productos industriales tales como : Crayones, empaques, esmaltes, emulsión para pinturas, fertilizante, espumas, fluido para amortiguadores, fluido hidráulico, fungicidas, germicidas, grasas, hule, insecticidas, lacas, materiales de revestimiento, masilla para vidrios, papel carbón, papel matamoscas, pasta para empaquetaduras, poliésteres, productos farmacéuticos, pulidores, revestimiento para papel, tintas de impresión, velas, etc.

La torta de higuera o afrecho es un excelente abono por el alto contenido de nutrientes, superior al de la torta de algodón y al abono fresco de establo. Su composición es de 1.91% de nitrógeno, 0.28% de fósforo, 3.02% de potasio, 33.8% de proteína cruda. Puede utilizarse como fertilizante y se considera especialmente buena para cultivos de período corto, pierde su toxicidad 2-3 semanas después de aplicada y se le atribuyen propiedades insecticidas.

La torta que sobra después de la extracción de aceite de las semillas comestibles (soya, girasol, ajonjolí, nabo forrajero etc.) tiene sin duda una gran demanda, es una excelente fuente de proteínas y otros nutrientes para la industria de concentrados para ganado. La torta de higuierilla y jatropha es tóxica y por lo tanto no apta para consumo animal o humano. Los principales agentes tóxicos de la torta son lectin (curcin) y ésteres forbólicos, sin embargo, contiene valiosos nutrientes que le permiten su utilización como fertilizante orgánico.

Tomado de: [http://www.gotaverde.org/new\\_portal/node/16](http://www.gotaverde.org/new_portal/node/16) .

Existen investigaciones sobre la detoxificación de la torta a través de su exposición a altas temperaturas y químicos (NaOH y NaOCl), pero hasta el momento no se ha logrado eliminar el 100% de los componentes tóxicos. Tomado de: [www.publish.csiro.au/?act=view\\_file&file\\_id=SP03010.pdf](http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=SP03010.pdf). La extracción de aceite con 80-90% de etanol o metanol también ha dado resultados animadores de detoxificación.

Antes de aprovechar la torta de higuierilla y piñón como fertilizante orgánico, se puede pasar la torta por un proceso de digestión anaeróbica, este proceso implica la descomposición de la torta por bacterias que producen como resultado una mezcla de metano (65%) y CO<sub>2</sub> (35%). Esta mezcla se conoce comúnmente como biogás. El aceite que queda en la torta promueve la actividad bacteriana y es por lo tanto un excelente insumo para un biodigestor.

El biogás sirve como combustible para motores a gas o motores convencionales adaptados, el gas también puede ser utilizado directamente en procesos de calentamiento. El material descompuesto que queda después del proceso de digestión anaeróbica contiene los mismos (N-P-K y micro) nutrientes que el abono orgánico. Por el proceso de descomposición los nutrientes son incluso más fácilmente absorbidos por las plantas. Tomado de: [http://www.gotaverde.org/new\\_portal/node/16](http://www.gotaverde.org/new_portal/node/16).

La planta de higuierilla es repelente de moscas y zancudos. En el ámbito de la protección de las plantas y productos almacenados la higuierilla tiene una gran eficacia contra los hongos, nematodos, insectos y ácaros. Además es una planta huésped para insectos benéficos.

Tomado de: [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_si2/20067199296\\_Plantas%20con%20accion%20insectida.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20067199296_Plantas%20con%20accion%20insectida.pdf)

## 2.2. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales lignocelulósicos son abundantes en el planeta. Los vegetales y sus residuos, las agroindustrias y los subproductos que generan constituyen un excelente sustrato para el crecimiento fúngico. Los hongos cumplen un rol importante, ya que este tipo de materiales está compuesto principalmente de polímeros que no pueden ser degradados por la mayoría de los otros

microorganismos presentes en los diferentes ecosistemas. Los principales constituyentes de los vegetales son el almidón (utilizado como reserva energética) y los que componen sus paredes celulares, constituidas por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina en una relación aproximada de 4:3:3 variando sensiblemente según las diferentes especies (Papinutti, 2003). Gracias a su origen renovable, a la biodegradabilidad de sus derivados y sus posibilidades de reciclaje, son una fuente idónea de materiales poliméricos de interés industrial.

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez *et al.*, 2002).

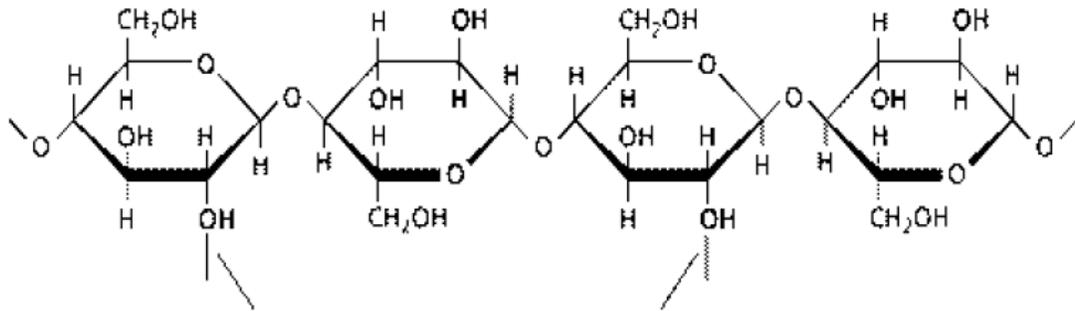
### **2.2.1 CELULOSA Y BIOCONVERSIÓN**

La celulosa es el componente de la biomasa de plantas de mayor abundancia en la naturaleza, sin embargo también es producido por algunos animales (ej.: tunicados) y algunas pocas bacterias ((Lynd *et al.*, 2002).

Las características de la celulosa han sido diversamente investigadas (Atlas & Bartha 1980; Fan *et al.* 1980; Ladisch *et al.* 1983) la celulosa es un hidrato de carbono consistente en su forma nativa de una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ , 1-4. El análisis por difracción de rayos X indica que la celulosa presenta una estructura cristalina altamente ordenada, constituyendo fibras elementales o microfibras de 500 a 1000 angstroms de longitud. Algunas zonas de la fibra elemental contienen porciones de celulosa "amorfa" que es fácilmente hidrolizable. Las moléculas de celulosa están además organizadas en haces de cadenas paralelas que forman fibrillas.

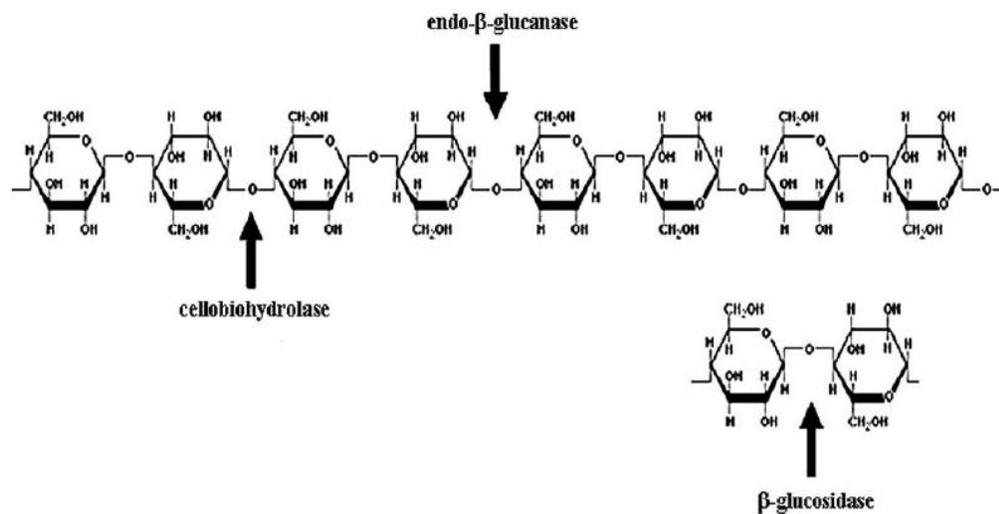
En las paredes celulares de las plantas, las fibrillas de celulosa muy densamente empaquetadas y dispuestas en haces paralelos, rodean a la célula, frecuentemente formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz de otros tres materiales polímeros: hemicelulosa, pectina y extensina. (Lehninger 1987).

En la Figura 1, se muestra la estructura molecular de la cadena de celulosa y como las moléculas de celulosa se unen entre sí mediante enlaces de puente de hidrógeno usando el OH libre (Kumar *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura molecular de la celulosa

A partir de estudios bioquímicos de los sistemas de celulasas de hongos y bacterias, aérobicos y anaeróbicos, las enzimas se han clasificado en tres grupos basados en sus propiedades estructurales: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Ver Figura 2) (Kumar *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa.

Las endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanhidrolasas cortan la cadena de celulosa al azar en sitios amorfos internos, generando oligosacáridos de varios tamaños y consiguientemente cadenas con nuevas terminaciones. Las exoglucanasas incluyen 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasas y 1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas, actúan de manera progresiva en las terminaciones de la cadena

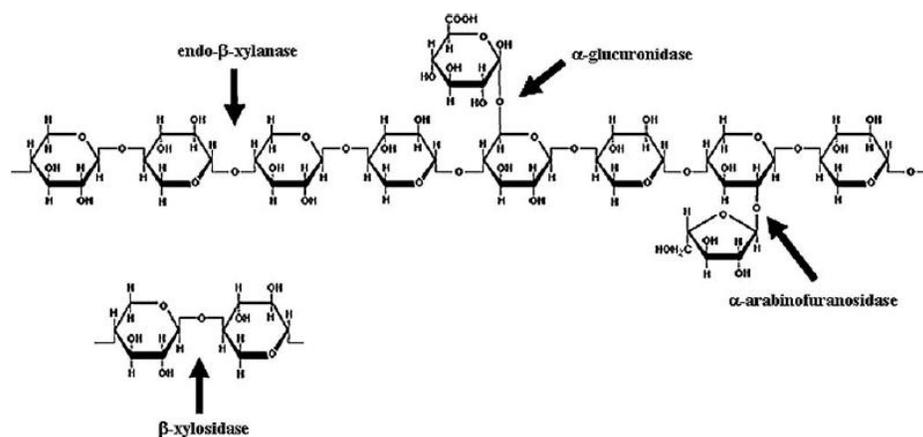
de celulosa, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Y las  $\beta$ -glucosidasas: hidrolizan celodextrinas y celobiosa solubles en glucosa (Lynd *et al.*, 2002; Warren, 1996).

Debido a la estructura de la celulosa, su degradación representa un desafío para los sistemas de celulasas, razón por la cual estos sistemas poseen una estructura modular, que incluye un módulo de unión a carbohidrato y un módulo catalítico, que le permite unirse a la superficie de la celulosa, se presume facilita la hidrólisis de la celulosa al acercar el dominio catalítico a la celulosa insoluble (Lynd *et al.*, 2002).

## 2.2.2 HEMICELULOSA

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Pérez, *et al.*, 2002).

En la degradación de la hemicelulosa interfieren varias enzimas dependiendo de la naturaleza de la molécula, las compuestas por xylan son degradadas por endo-1,4- $\beta$ -xylanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -glucuronidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y esterasas acetilxilan. En la descomposición de glucomanos median las enzimas  $\beta$ -endomananasas que hidrolizan la estructura central resultando en manobiosas y manotriosas. Y las  $\beta$ -manosidasas que liberan manosa de los extremos no reductores de los compuestos degradados por las endomananasas (Ver Figura 3) (DeVries y Visser, 2001)



**Figura 3.** Estructura molecular de la hemicelulosa y sitio de acción de las enzimas endo- $\beta$ -xilanasas,  $\alpha$ -glucuronidasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas y  $\beta$ -xilosidasas.

### 2.2.3 LIGNINA

La lignina es un compuesto difícil de degradar debido a la recalcitrancia química y a la baja porosidad, cualidades que le permiten cubrir la hemicelulosa y celulosa de la pared celular de las plantas vasculares.

La lignina es un polímero natural amorfo que actúa como agente aglutinante entre los componentes del vegetal y está constituido por unidades del tipo phidroxifenil propano. La lignina se origina por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes parahidroxicinámicos. Las maderas suaves o gimnospermas están constituidas fundamentalmente por unidades guayacílica (G), mientras que las maderas duras (angiospermas dicotiledóneas) por unidades guayacílica (G) y siringílica (S) y las plantas anuales (angiospermas monocotiledóneas) tienen los tres precursores: guayacílica (G), siringílica (S) y p-hidroxibencílica (H) (Sabatier, 1992). La lignina es el segundo constituyente en peso (15-30%) y en importancia del reino vegetal (Sabatier, 1992, Mäkelä et al, 2002).

La lignina químicamente es heterogénea y tiene una estructura muy compleja (Figura 4). Los monómeros son todos derivados del fenilpropano y su complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. La diferencia en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi; por ejemplo: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (Olvera, 2003).

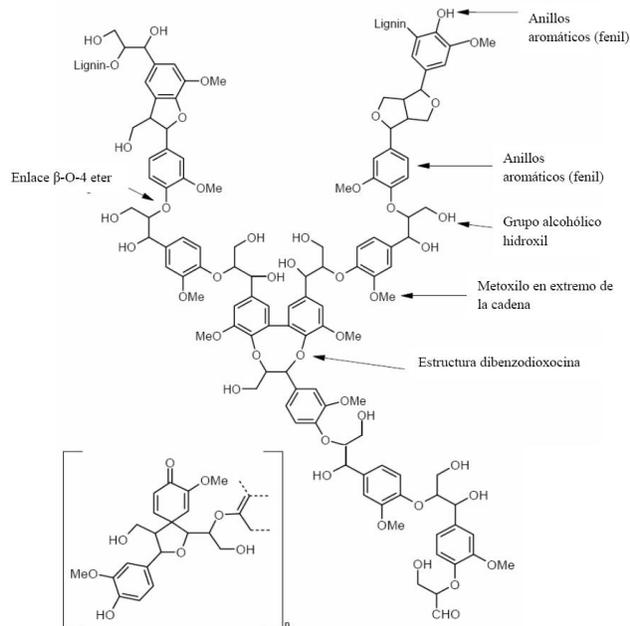


Figura 4. Estructura de lignina (Bommaris & Riebel, 2004)

Hasta el momento se han descrito tres enzimas ligninolíticas: la lignin-peroxidasa (LiP), la manganeso-peroxidasa (MnP) y la lacasa. Otras enzimas ligninolíticas como la peroxidasa versátil (PV) o la peroxidasa manganeso-independiente se mencionan formando parte del sistema ligninolítico de algunos basidiomicetes.

La LiP puede oxidar directamente sustratos aromáticos fenólicos y no fenólicos siendo el más estudiado el alcohol veratrílico (3,4 dimetoxi-fenol). La MnP oxida  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  y este último es quelado por ácidos orgánicos sintetizados por el hongo (Pérez & Jeffries, 1992). Es decir que la MnP puede oxidar sustratos del tipo fenólico a través del  $Mn^{+2}$  (Tuor *et al.*, 1992), pero también puede hacerlo con sustratos no fenólico a través de los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Bao *et al.*, 1994). La PV oxida  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , como lo realiza la MnP y también oxida compuestos no fenólicos, como la LiP; lo que significa que comparte propiedades catalíticas con ambas peroxidases fúngicas (Martínez, 2002; Martínez *et al.*, 1996). Mientras que la lacasa es una oxidasa con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el oxígeno dando agua como producto (Thurston, 1994). Esta enzima por ser oxidasa ataca principalmente compuestos fenólicos, pero la presencia de cooxidantes como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS) o el ácido violúrico; capacita a la enzima para atacar sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico (Soares *et al.*, 2001). La lacasa es la enzima ligninolítica presente más frecuentemente en los hongos de pudrición blanca.

### 2.3. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

Los hongos que tienen sistemas ligninolíticos pertenecen principalmente a la clase de los Basidiomicetes y son llamados hongos de la podredumbre blanca, entre los cuales hay especies saprófitas (Steffen *et al.*, 2002; Olvera, 2003). Además, existen *Ascomycetes* que han sido estudiados en la degradación de la lignina como *Fusarium oxysporum* (Valenzuela *et al.*, 2001), *Penicillium sp.* y sobre todo el género *Aspergillus* (Cardoso y Costa, 1994; Valenzuela *et al.*, 2001; Ahammed y Prema, 2002) entre ellos, las especies de *A. niger* (Conesa *et al.*, 1999; Márquez *et al.*, 2007), *A. flavus* (Betts y Dart, 1989), *A. japonicus* (Milstein *et al.*, 1983) y *A. fumigatus* (Kadam y Drew, 1985). También se han registrado hongos levaduriformes con la capacidad de degradar lignina, como *Candida sake*, *Cryptomyces laurentii*, *Rhodotorula glutinis* (Olvera, 2003). Los hongos descomponedores de paja son un grupo ecológicamente importante de microorganismos involucrados en el reciclamiento del carbono en los suelos y su hábitat es la parte superior de los suelos en bosques y prados, que son ricos en materia orgánica como la celulosa, hemicelulosa y lignina provenientes de plantas muertas (hojas y ramas). La biodegradación de la lignina es un paso clave para el reciclamiento de carbono en los ecosistemas terrestres, donde los basidiomicetes

degradan los polímeros de la madera facilitando la utilización de la celulosa por poblaciones microbiales.

Algunos ejemplos de microorganismos con sistemas de celulosas, xilanasas y peroxidases bien identificados son las siguientes cepas mesofílicas con capacidad de degradar celulosa *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *A.fumigatus*; el género *Aspergillus* tiene características que hacen que sea ideal para aplicaciones industriales tales como alta capacidad de fermentación y alto nivel de secreción de proteínas (DeVries y Visser, 2001)

Algunos hongos termofílicos son: *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvens* y *Thermonospora curvata*. De las bacterias reportadas se encuentran: *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas Wmi*, *Clostridium stercorarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulolyticus*, y *Saccharophagus degradans* (Kumar et al., 2008). Otros microorganismos detectados son *Cellulomonas fimi* posee xilanasas, *Trichoderma reesei* con endoglucanasas, *Escherichia coli* tiene  $\beta$ -galactosidasas y *Trichoderma reesei* y *Phanerochaete chrysosporium* con sistemas de celulasas (Warren, 1996).

### 3. METODOLOGÍA

**TIPO DE ESTUDIO:** Descriptivo

#### **RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS:**

Las muestras fueron suministradas por la GRANJA MONTELINDO de la Universidad de Caldas, ubicada a 38 kilómetros desde Manizales, vereda Santágueda, municipio de Palestina.

Condiciones climáticas:

Altura sobre el nivel del mar: 1.010 metros

Temperatura media: 22.8 grados centígrados

Precipitación promedio anual: 2.200 m.m.

Humedad relativa: 76%

Extensión: 64 hectáreas

Topografía y suelos: plana, totalmente mecanizable, suelos franco de origen volcánico.

#### **SITIO DE REALIZACIÓN:**

Las evaluaciones de los residuos lignocelulósicos, se llevaron a cabo en los laboratorios de la Universidad Católica de Manizales.

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **3.1. PASO 1: TOMA DE MUESTRA**

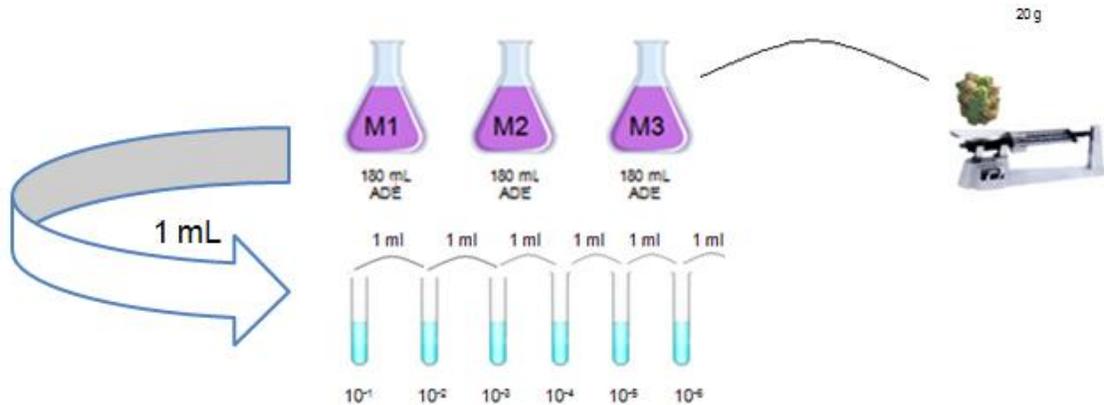
Las muestras están conformadas por fruto y torta de higerilla, para realizar el muestreo se utilizó material estéril y se tomaron por triplicado 200g de muestra respectivamente, de la variedad de higerilla Colbio 01. Se colocaron en bolsas plásticas debidamente marcadas y selladas, se transportaron en nevera de icopor con hielo. Fueron almacenadas a una temperatura de 4°C, con el fin de evitar la proliferación de otros microorganismos diferentes a aquellos presentes en las muestras.

La toma de muestras de torta fueron proporcionadas por la Universidad de Caldas.

##### **3.2. PASO 2: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

De cada una de las tres muestras de fruto y torta ( 200 g) se tomaron 20g y se adicionaron a 180 mL de agua destilada estéril para preparar la solución madre, se agitó vigorosamente para lograr una homogenización completa. Posteriormente, se realizaron diluciones en base 10, para ello se emplearon 10 tubos, cada uno con 9 mL de agua destilada estéril, al primer tubo se le adicionó 1 mL de la

solución madre, quedando de esta manera preparada la dilución de  $10^{-1}$ , luego se transfirió del primer tubo al siguiente 1 mL y así sucesivamente hasta alcanzar una dilución de  $10^{-6}$ .



**Figura 5.** Preparación muestras para inoculación

### 3.3. PASO3: PROCESO DE SIEMBRA Y RECUPERACION DE LOS MICROORGANISMOS.

Se tomó 0,1 mL de cada una de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  para tener un amplio espectro de la muestra, se sembró por superficie en cajas de petri que contenían Agar - Rosa de Bengala para hongos filamentosos, Agar-Nutritivo para bacterias y Agar-PDA para hongos filamentosos y levaduras. El periodo de incubación fue para bacterias de 24 a 48 horas, para levaduras de 96 horas y para hongos filamentosos de 5 a 8 días.

### 3.4. PASO 4: AISLAMIENTO DE LAS COLONIAS

Después de reconocer y describir el tipo de colonia registrada en los medios de cultivo, se realizó tinción de Gram, con el fin de identificar características morfológicas de las bacterias que permitieran la diferenciación de los grupos, y se procedió a realizar su aislamiento en medios de cultivos selectivos.

Se utilizó el medio de cultivo Agar Sangre para las bacterias Gram positivas y Agar MacConkey para las bacterias Gram negativas.

Para las levaduras el medio de cultivo Agar Sabouraud y para los hongos filamentosos el medio utilizado fue el Agar PDA.

### **3.5. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS**

En el proceso de identificación de los hongos filamentosos se tuvieron en cuenta las características macroscópicas de las colonias, como color, topografía y textura. Se utilizó la técnica de microcultivos con el fin de observar las características microscópicas, las cuales fueron corroboradas con la clave de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998).

### **3.6. PRUEBAS MOLECULARES E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS, LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS.**

Se realizaron los diferentes protocolos (Anexo 1, 2, 3) para la extracción de ADN, se realizó la técnica de reacción de cadena de polimerasa ( PCR) para cada uno de ellos utilizando primers universales RM y RW para bacterias y primers ITS1 e ITS4 para hongos filamentosos y levaduras, estos productos de PCR fueron enviados a secuenciación a la empresa MACROGEN en Corea.

### **3.7. PRESERVACIÓN DE LAS CEPAS**

Después de tener identificados los microorganismos recuperados en las diferentes muestras evaluadas, se llevó a cabo su preservación.

Se realizó una suspensión bacteriana y se comparó con el patrón de turbidez de la escala de MacFarland, la cual está numerada del 1 al 10 y representa la concentración específica de bacterias/ml. Para bacterias y levaduras debe comparar con el estándar entre 3 y 4. Posteriormente se depositó 1,5 mL de la suspensión en tubos eppendorf (5-10 tubos por muestra). Se llevaron durante una hora a 4°C, 4 horas a -4°C y luego a una temperatura de -20°C. A las 48 horas se realizaron pruebas de viabilidad de las muestras.

Luego del aislamiento y preservación de las cepas viables, se asignó un código a cada una de ellas, teniendo en cuenta la información requerida por el sistema de organización del banco de cepas de la Universidad Católica de Manizales.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. AISLAMIENTO BACTERIAS Y LEVADURAS

Después del proceso de recuperación de las colonias y el aislamiento de cada una de ellas, se obtuvo un total de 40 colonias presentes en el fruto y torta de la higuera, entre levaduras y bacterias. La tabla presenta el número de colonias aisladas por tipo de muestra y medio de cultivo empleado.

**Tabla 3:** Número de colonias recuperadas de levaduras y bacterias presentes en el fruto y la torta de higuera.

MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO	COLONIAS RECUPERADAS	LEVADURAS	BACTERIAS	TOTAL
FRUTO	ROSA DE BENGALA	1	1	0	9
	NUTRITIVO	6	0	6	
	PDA	2	2	0	
TORTA	ROSA DE BENGALA	3	3	0	31
	NUTRITIVO	18	0	18	
	PDA	10	4	6	
TOTAL			40		

Se evidencia que la torta de higuera la cual es el resultado de un proceso industrial es la que presenta mayor cantidad de colonias recuperadas entre bacterias y levaduras.

#### 4.1.1 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS

A partir de las colonias bacterianas y de levaduras recuperadas se realizó tinción de Gram con el fin de diferenciar y definir las características morfológicas microscópicas. Posteriormente, se inocularon en medios de cultivo selectivos para su aislamiento y purificación.

En total se diferenciaron:  
6 Bacterias Gram negativas  
24 Bacterias Gram positivas  
10 levaduras.

La identificación la realizó la compañía MACROGEN de Corea, analizando la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR con primers universales RM y RW para bacterias, y primers ITS1 ITS4 para las levaduras.

A continuación se presentan los resultados de identificación de cada uno de los microorganismos evaluados.

**Tabla 4:** Resultados de las colonias identificadas por secuenciación

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	<i>Bacillus sp</i> <i>Bacillus altitudinis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus sp</i> <i>Staphylococcus sciuri</i>
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	<i>Halomonas sp</i>
LEVADURAS	<i>Rhodospiridium paludigenum</i> <i>Phichia burtonii</i>

### BACTERIAS GRAM POSITIVAS

➤ ***Bacillus sp* (torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 5:** *Bacillus sp* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	E value	Match	total	Pct. (%)
194_AG_B-RM	FN666876.1	<b><i>Bacillus sp.</i></b> 3LF 20TD partial 16S rRNA gene, strain 3LF 20TD	1503	758	0.0	765	766	99
195_AG_B-RM	FJ615523.1	<b><i>Bacillus sp.</i></b> 41KBZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1501	757	0.0	770	773	99
199_AG_B-RM	FJ615523.1	ribosomal RNA gene, partial sequence	1495	754	0.0	767	770	99
202_AG_B-RM	FJ615523.1	gene, partial sequence	1516	765	0.0	772	773	99
197_AG_B-RM	EU009208.1	<b><i>Bacillus sp.</i></b> Ar1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1104	557	0.0	711	761	93
201_AG_B-RM	HQ677210.1	<b><i>Bacillus sp.</i></b> L-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1489	751	0.0	758	759	99
208_AG_B-RM	EU855757.1	<b><i>Bacillus sp.</i></b> Tp11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	297	150	6e-77	256	290	88

*Bacillus sp* (197\_AG\_B-RM) es una colonia de color blanca, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 5). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo.



**Figura 6.** *Bacillus sp* (197\_AG\_B-RM) (Agar Sangre)

*Bacillus sp* (201\_AG\_B-RM) es una colonia de color blanca, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 6). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo.



**Figura 7.** *Bacillus sp* (201\_AG\_B-RM) (Agar Sangre)

*Bacillus sp* (202\_AG\_B-RM) es una colonia de color blanca, aspecto brillante, textura cremosa, topografía elevada, forma ameboide y borde ondulado (figura 6). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo.



**Figura 8.** *Bacillus sp* (202\_AG\_B-RM) (Agar Sangre)

*Bacillus* es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positiva, pertenece a la División Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes.

La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprófitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, alimentos que contaminan con su presencia. Aunque generalmente son móviles, con flagelos peritricos, algunas especies de interés sanitario (*B. anthracis*, causante del carbunco) son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos. Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus>

➤ ***Bacillus altitudinis* (Fruto):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

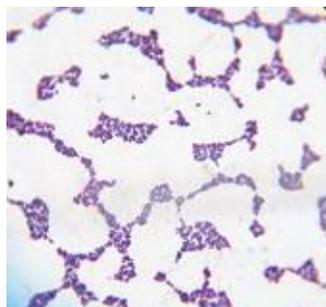
**Tabla 6:** *Bacillus altitudinis* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	E value	Match	total	Pct. (%)
188_AG_B-RM	HQ670424.1	<b><i>Bacillus altitudinis</i></b> strain AIMST 5.Hb.12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	577	0.0	643	665	96

*Bacillus altitudinis* es una colonia de color blanca, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde ondulado (figura 7). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo. (Figura 8).



**Figura 9.** *Bacillus altitudinis* (Agar Sangre)



**Figura 10.** *Bacillus altitudinis* (imagen tomada al microscopio 100X)

*Bacillus altitudinis* tolera hasta un 2% de NaCl, degrada la tirosina, es negativa para la hidrólisis de la caseína, la ureasa y las actividades de fenilalanina desaminasa, la reducción de nitrato a nitrito, la utilización de citrato y la prueba de Voges-Proskauer. Produce ácido de manitol. Utiliza D-trehalosa, almidón, N-acetil-D-ramnosa, D-celobiosa, D-sorbitol, dulcitol, myo-inositol, N-acetilgalactosamina, L-glicina, L-treonina y L-lisina como única fuente de carbono. Sensibles a la norfloxacin (10 mg), penicilina (10 mg), cefoperazona (75 mg), cefuroxima (30 mg), kanamicina (30 mg), cotrimoxazol (25 mg), tetraciclina (30 mg), ácido nalidíxico (30 mg) y amoxicilina (30 mg), pero resistentes a amikacina (30 mg), ciprofloxacina (30 mg), lincomicina (15 mg), novobiocina (30 mg) y ampicilina (25 mg). Principales ácidos grasos son iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub> y iso-C<sub>17:0</sub>.

Hasta el momento no se reportan usos industriales de importancia económica. S. Shivaji *et al.* (2006)

➤ ***Bacillus pumilus* (Fruto y Torta):**

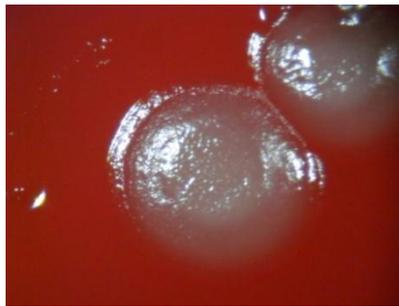
Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 7:** *Bacillus pumilus* (Identificación molecular)

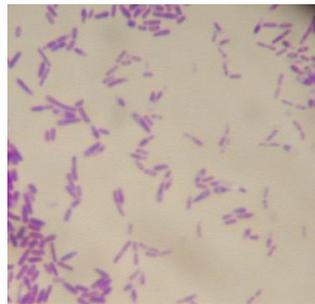
Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	E value	Match	total	Pct. (%)
187_AG_B-RM 192_AG_B-RM	EF672052.1 EF672052.1	<b><i>Bacillus pumilus</i></b> strain B2-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1489 1491	751 752	0.0 0.0	758 759	759 760	99 99
189_AG_B-RM 193_AG_B-RM 206_AG_B-RM	FJ768457.1 FJ768457.1 FJ768457.1	<b><i>Bacillus pumilus</i></b> strain GPL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1499 1497 1427	756 755 720	0.0 0.0 0.0	759 755 750	760 755 760	99 100 98

203_AG_B-RM	HQ670600.1	<b>Bacillus pumilus</b> strain AIMST 5.Mi.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1148	579	0.0	684	719	95
204_AG_B- RM.ab1	EU221329.1	<b>Bacillus pumilus</b> strain NM1C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1511	762	0.0	769	770	99

*Bacillus pumilus* es una colonia de color transparente, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 9). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo, formador de esporas. (Figura 10).



**Figura 11.** *Bacillus pumilus* (Agar Sangre)



**Figura 12.** *Bacillus pumilus* (imagen tomada al microscopio 100X)

Se encuentra en el suelo, agua, aire, y el tejido en descomposición de las plantas. A menudo en el sistema de la raíz en desarrollo de las plantas de soja, pero no daña las plantas. *B. pumilus*, impide la germinación de las esporas de algunos hongos, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. Actúa como un fungicida de la prevención del desarrollo de esporas de hongos en las plantas. Forma una barrera física entre la hoja de la planta y las esporas del hongo, y luego coloniza las esporas. Tomado de: <http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/261310A.html>

➤ ***Bacillus subtilis* (Torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 8:** *Bacillus subtilis* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	E value	Match	total	Pct. (%)
200_AG_B-RM	AY775778.1	<b><i>Bacillus subtilis</i></b> strain BFAS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1503	758	0.0	761	762	99

*Bacillus subtilis* es una colonia beta hemolítica con hemolisis completa, de color transparente, aspecto opaco, textura seca, topografía umbonada, forma ameboide y borde ondulado (figura 11). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram positivo con bordes redondeados, presenta esporas esféricas y centrales que no deforman el bacilo. (Figura 12).



**Figura 13.** *Bacillus subtilis* (Agar Sangre)



**Figura 14.** *Bacillus subtilis* (imagen tomada al microscopio 100X)

*B. subtilis* no es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia.

Algunas variedades de *B. subtilis* también tienen aplicaciones comerciales:

- Una variedad de *B. subtilis* antes conocido como *Bacillus natto* es usada en la producción comercial del manjar japonés Nattō.
- *B. subtilis* QST 713 (comercializado como QST 713 o Serenata) tiene una actividad fungicida natural, y es empleado como un agente de control biológico.
- Las enzimas producidas por *B. subtilis* son usadas como aditivos en detergentes de lavandería.
- *B. subtilis pBE2C1* and *B. subtilis pBE2C1AB* son usados en la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de desechos de malta como fuente de bajo costo para la producción. (Madigan, Martinko, 2005).

➤ ***Staphylococcus sp* (Torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

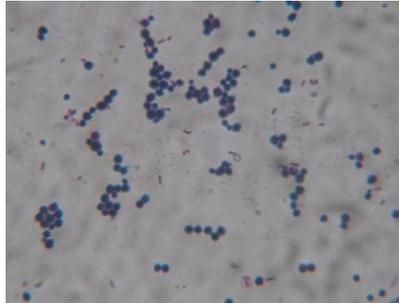
**Tabla 9:** *Staphylococcus sp* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	E value	Match	total	Pct. (%)
196_AG_B-RM	HQ202805.1	<b><i>Staphylococcus sp.</i></b> SW80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1479	746	0.0	762	766	99

*Staphylococcus sp* es una colonia de color amarillo, aspecto brillante, textura cremosa, topografía elevada, forma ameboide y borde lobulante (figura 13). La coloración de Gram da como resultado un coco Gram positivo, en racimos. (Figura 14).



**Figura 15.** *Staphylococcus sp* (Agar Sangre)



**Figura 16.** *Staphylococcus sp* (imagen tomada al microscopio 100X)

La mayoría de estafilococos son inofensivos y viven normalmente en la piel y las membranas mucosas de humanos y otros organismos. Se encuentran en todo el mundo, son un pequeño componente de la flora microbiana del suelo.

Necesitan una fuente nitrogenada orgánica y en sus necesidades de oxígeno son facultativos, se caracteriza por ser catalasa positivo (Prescott 1999).

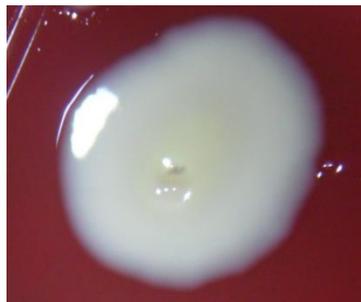
➤ ***Staphylococcus sciuri* (Fruto):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

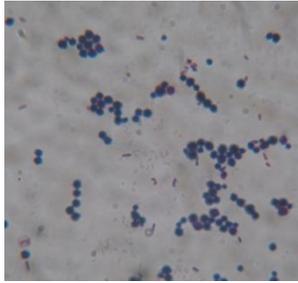
**Tabla 10:** *Staphylococcus sciuri* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Ra w	E value	Match	total	Pct. (%)
186_AG_B-RM	EU855191.1	<b><i>Staphylococcus sciuri</i></b> strain CTSP9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1495	754	0.0	760	762	99

*Staphylococcus sciuri* es una colonia de color blanco, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 15). La coloración de Gram da como resultado un coco Gram positivo, en racimos. (Figura 16).



**Figura 17.** *Staphylococcus sciuri* (Agar Sangre)



**Figura 18.** *Staphylococcus sciuri* (imagen tomada al microscopio 100X)

*Staphylococcus sciuri* fue descrito por primera vez por Kloos y sus colegas en 1976 y es considerada una de las especies de estafilococos más ancestrales y dispersas, con una amplia gama de hábitats que incluye la piel de varios animales, así como los reservorios ambientales, tales como el suelo, arena y agua. La impresionante capacidad de colonización de esta especie puede ser consecuencia de su amplia gama de actividades bioquímicas, que incluye la capacidad de utilizar las sales inorgánicas de nitrógeno como la única fuente de nitrógeno. Tradicionalmente descrito como una especie comensal de los roedores, marsupiales, los cetáceos, artiodáctilos, y perisodáctilos, *S. sciuri* también ha sido aislado de animales domésticos y de cría de sanos y enfermos, incluidos los gatos domésticos. Aunque *S. sciuri* se asocia rara vez con la colonización o infección en los seres humanos, ha sido en ocasiones aisladas de muestras clínicas humanas. Tomado de: <http://www.aam.org.ar/congreso/download/suplemento-ram.pdf>

## BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

### ➤ *Halomona sp* (Torta):

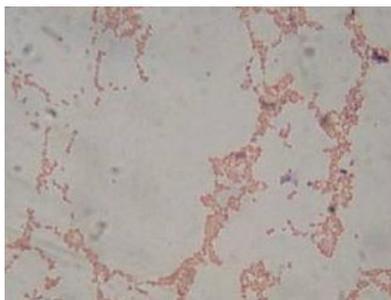
**Tabla 11:** *Halomona sp* (Identificación molecular)

Query	Subjet		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Ra w	E value	Match	total	Pct. (%)
198_AG_B-RM	AY371415.1	<b><i>Halomonas sp.</i></b> R675 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69.9	35	6e- 09	51	55	92

*Halomona sp* es una colonia de color blanco, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 17). La coloración de Gram da como resultado un bacilo Gram negativo. (Figura 18).



**Figura 19.** *Halomona sp* (Agar Sangre)



**Figura 20.** *Halomona sp* (imagen tomada al microscopio 100X)

Todos los organismos del género *Halomonas* son extremófilos, ya que son capaces de tolerar (y en algunos casos requieren) concentraciones medias o altas de sal para el crecimiento (por lo menos 0,2 M NaCl). Los miembros de este género varían de los halófilos moderados como *Halomonas elongata* a los halófilos extremos, tales como *Halobacterium salinarum*. La palabra "halófilos" significa "amantes de la sal" en griego. Los halófilos son comunes en los ambientes acuáticos, tales como el Mar Muerto.

Entre las adaptaciones que los halófilos emplean para sobrevivir en tales ambientes son las proteínas diseñadas para funcionar en una solución de alta fuerza iónica y el mantenimiento de altas concentraciones de sustancias inertes dentro de su citoplasma para reducir la presión osmótica.

*Halomona sp* es capaz de crecer anaeróbicamente en presencia de glucosa (en ausencia de nitratos) y tienen membranas que contienen ácidos grasos éster ligados al glicerol. Esto en contraste con la mayoría de las bacterias halófilas, como otros *Halococcus* y *Halobacterium*, donde los ácidos grasos son el éter ligado al glicerol. Los miembros del género *Halomonas* son no pigmentados o de pigmento amarillo, tienen flagelos laterales y son móviles. Algunos son capaces de llevar a cabo la desnitrificación, la reducción de nitratos a nitrógeno y la obtención de energía en el proceso. Tomado de:

<http://www.microbiologybytes.com/video/Halomonas.html>

## LEVADURAS

### ➤ *Rhodosporidium paludigenum* (Fruto):

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 12:** *Rhodosporidium paludigenum* (Identificación molecular)

Query	Number of hits	Lowest E-value	Accession (E-value)	Description (E-value)	Greatest identity %
209_AG_Y-ITS1	20	0	HQ670676	<i>Rhodosporidium paludigenum</i> isolate 555552 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

*Rhodosporidium paludigenum* es una colonia de color salmón, aspecto brillante, textura cremosa, topografía convexa, forma circular y borde entero (figura 19). Las células son ovoides y varían en su tamaño, toman una coloración total frente a la tinción de Gram, algunas se ven agrupadas. (Figura 20).



**Figura 21.** *Rhodosporidium paludigenum* (imagen tomada al estereoscopio)



**Figura 22.** *Rhodosporidium paludigenum* (imagen tomada al microscopio)

Esta especie ha sido aislada de una gran variedad de fuentes ambientales tan diversas como volcanes activos, aguas profundas, zonas de tratamiento de aguas residuales y se asocian con una variedad de especies de plantas. Son unicelulares, especies de levaduras pigmentadas de color salmón-rosa. Son endófitas, microorganismos que viven dentro de las plantas sin causar enfermedad, en general, proporcionan beneficios de crecimiento a la planta. Algunas cepas producen indol-3-acético, una hormona de crecimiento vegetal que ayuda a mejorar el crecimiento de varias especies de plantas. Algunas cepas utilizan hexosa, así como pentosas, producen altos niveles de alcohol, azúcar, xilitol, y son resistentes a varios fitoquímicos que inhiben las cepas industriales de levadura. Tomado de: [http://genome.jgi.doe.gov/Rhodo1\\_1/Rhodo1\\_1.home.html](http://genome.jgi.doe.gov/Rhodo1_1/Rhodo1_1.home.html)

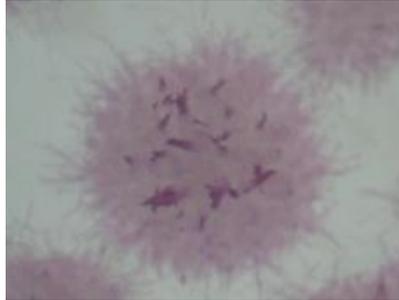
➤ ***Pichia burtonii* (Torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 13:** *Pichia burtonii* (Identificación molecular)

Query	Number of hits	Lowest E-value	Accession (E-value)	Description (E-value)	Greatest identity %
210_AG_Y-ITS1	22	4,4008E-157	EU714323	<b>Pichia burtonii</b> strain EM 9831 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
211_AG_Y-ITS1	21	0	EF175899	<b>Pichia burtonii</b> clone bandF3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
212_AG_Y-ITS1	22	7,9812E-168	EU714323	<b>Pichia burtonii</b> strain EM 9831 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

*Pichia burtonii* es una colonia de color blanco, aspecto opaco, textura seca, topografía umbonada, forma filamentosa y borde filamentoso (figura 21). Las células son ovoides, pueden encontrarse individualmente o en parejas, se observa pseudomicelio simple o escasamente ramificado, pero cabe aclarar que nunca formará un micelio verdadero (Figura 22).



**Figura 23.** *Pichia burtonii* (imagen tomada al estereoscopio)



**Figura 24.** *Pichia burtonii* (imagen tomada al microscopio)

*Pichia* (*Hansenula* y *Hyphopichia* son sinónimos en desuso) es un género de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae* son células esféricas, elípticas u olongadas. La lactosa no es fermentada por esta especie ni asimilada. El comportamiento con respecto a otros hidratos de carbono depende de las diferentes especies. El nitrato es siempre asimilado. Más de 100 especies de este género son conocidos. *Pichia burtonii* interfiere con el proceso de fermentación para la producción de alcohol, fermentando los azúcares presentes. La mayoría se encuentran en las plantas en descomposición, algunos viven en estrecha simbiosis con los insectos, que viven en estas plantas.

*Pichia burtonii* en Semi-fermentación anaeróbica, es glucosa positivo, galactosa positivo, sacarosa positiva, maltosa positivo, lactosa negativo, melibiosa negativo, rafinosa positiva. Tomado de <http://www.ncyc.co.uk/print-ncyc-440.html>.

## 4.2. AISLAMIENTO HONGOS FILAMENTOSOS

Después del proceso de recuperación de las colonias y el aislamiento de cada una de ellas, se obtuvo un total de 27 hongos filamentosos presentes en el fruto y torta de la higuera. Se presentan a continuación el número de colonias por tipo de muestra y medio de cultivo empleado.

**Tabla 14:** Número de colonias recuperadas de hongos filamentosos presentes en el fruto y la torta de higuera.

MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO	COLONIAS RECUPERADAS	TOTAL
FRUTO	ROSA DE BENGALA	6	10
	PDA	4	
TORTA	ROSA DE BENGALA	8	17
	PDA	9	
TOTAL		27	

Se evidencia que la torta de higuera la cual es el resultado de un proceso industrial es la que presenta mayor cantidad de colonias recuperadas.

### 4.2.1 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS

A partir de las colonias aisladas se realizó la técnica de microcultivos con el fin de observar estructuras fructíferas características de cada hongo filamentoso y poderlas comparar con la clave de Hunter y Barnett para su identificación. Posteriormente se enviaron para la secuenciación e identificación molecular.

En total se identificaron 12 hongos filamentosos propios de la muestra, las otras colonias pertenecían a hongos filamentosos ambientales.

#### ➤ *Penicillium brevicompactum* (Fruto y torta):

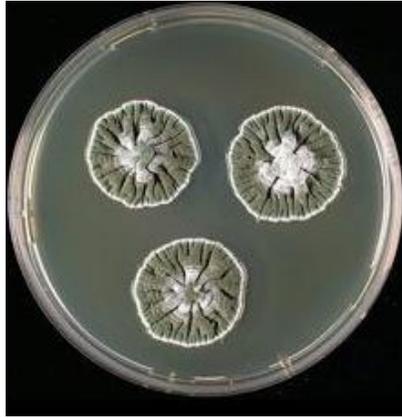
Los resultados de la identificación obtenidos por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 15:** *Penicillium brevicompactum* (Identificación molecular)

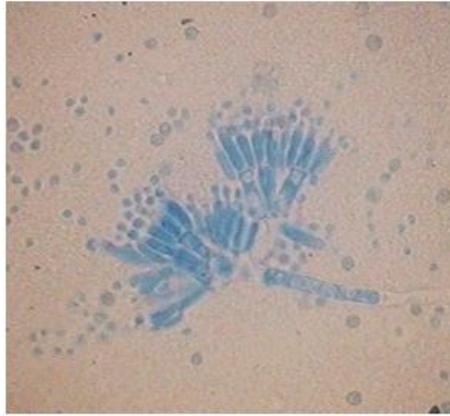
Query	Number of hits	Lowest E-value	Accession (E-value)	Description (E-value)	Greatest identity
227_AG_F-ITS1 226_AG_F-ITS1 225_AG_F-ITS1 217_AG_F-ITS1	20	0	HQ654891 HQ654891 HQ654891 HQ654891	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain 29 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

227_AG_F-ITS4 226_AG_F-ITS4 225_AG_F-ITS4	20	0	HM469408 HM469408 HM469408	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b> strain KUC1628-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
220_AG_F-ITS1 220_AG_F-ITS4 219_AG_F-ITS1 219_AG_F-ITS4 216_AG_F-ITS1	20	0	JN246079 JN246079 JN246079 JN246079 JN246079	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b> isolate P46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
224_AG_F-ITS4	20	0	JN942913	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b> strain DAOM 215373 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	100
223_AG_F-ITS4	20	0	HM469408	<b><i>Penicillium brevicompactum</i></b> strain KUC1628-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

*Penicillium brevicompactum* es un hongo filamentoso con colonias de crecimiento moderado, vellosas, aterciopeladas, con colores verdes y fisuras radiales (Figura 23). Presenta conidióforos tabicados de pared lisa y ramificados en sus extremos, con métulas compactas y fiálides en forma de botella de donde nacen los conidios lisos o ligeramente verrucosos, elipsoidales formando cadenas, sin ramificar, con un aspecto característico de penacho o pincel (Figura 24).



**Figura 25.** *Penicillium brevicompactum* (Agar PDA)



**Figura 26.** *Penicillium brevicompactum* (imagen tomada al microscopio)

*Penicillium brevicompactum* es un hongo filamentoso que presenta un gran potencial para su uso industrial debido a su producción eficiente de pectinasa. Las enzimas pectinolíticas catalizan la degradación de la pectina presente en la pared celular de las plantas. Entre estas enzimas la poligalacturonasa preferiblemente hidroliza ácidos pécticos y la pectina liasa cataliza la división de los límites de la  $\alpha$ -D-(1,4) glucosídico de la pectina por el mecanismo de beta-eliminación. Después de analizar la producción de pectinasa de 10 especies del género *Penicillium*, Pereira *et al.* (2002) informó que *Penicillium brevicompactum* fue el mejor productor de pectina liasa presentando una considerable actividad poligalacturonasa. Considerando el importante papel que estas enzimas tienen en algunos procesos biotecnológicos este hongo se convirtió en un organismo prometedor para uso industrial. Para estas aplicaciones, esta especie debe ser mejorada genéticamente para obtener una mayor producción de enzimas y por lo tanto un mayor rendimiento a un costo accesible.

Polyanna *et al.* (2011) reportan en su estudio que *Penicillium brevicompactum* es un hongo celulolítico aislado de la semilla de ricino lo que coincide con el resultado de este estudio, además realizan pruebas enzimáticas y determinan que tiene un índice celulolítico de 2,0 medido por halos, la producción de esta enzima es óptima en medio líquido.

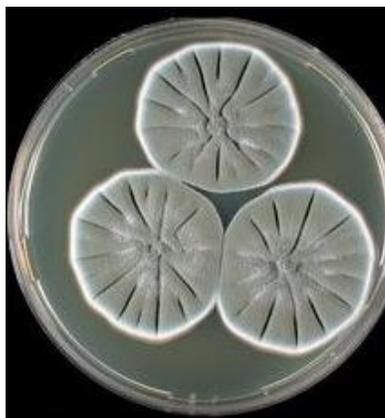
➤ ***Penicillium olsonii* (Torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 16:** *Penicillium olsonii* (Identificación molecular)

Query sequence	Hit	Id	Description	E-value	Score
Contig4	AF484406	28394217	<i>Penicillium olsonii</i> strain NRRL 31467 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	493

*Penicillium olsonii* es un hongo con colonias de crecimiento rápido, aterciopeladas a pulverulentas, de color verde grisáceo. Reverso blanco grisáceo. Exudado como pequeñas gotas incoloras (Figura 25). Presenta conidióforos de paredes lisas, largos, verticilados con múltiples ramas, fiálides en forma de botella con cuello corto, conidios subglobosos a elipsoidales (Figura 26).



**Figura 27.** *Penicillium olsonii* (Agar PDA)



**Figura 28.** *Penicillium olsonii* (imagen tomada al microscopio)

*Penicillium olsonii* es hongo endófito, común en la putrefacción de los tomates, embutidos y legumbres. A menudo se encuentra en el suelo de los invernaderos para el cultivo de plantas ornamentales y puede actuar como especie patógena de plantas. Por lo general se encuentra en el interior de las plantas.

*Penicillium olsonii* puede ser fácilmente confundido con *Penicillium brevicompactum*. La distinción es posible debido a los tamaños relativos de las esporas. En el microscopio con un aumento bajo puede confundirse con el género *Aspergillus*.

Este hongo produce sustancias tóxicas y su efecto no es claro todavía. Tomado de: <http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-olsonii.html>.

➤ ***Fusarium solani* (Torta):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 17:** *Fusarium solani* (Identificación molecular)

Query sequence	Hit	Id	Description	E-value	Score
213_AG_F-ITS1	EU727450	1,9E+08	Fusarium solani isolate 12.4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0	456

*Fusarium solani* es un hongo con colonias de crecimiento lento, algodonoso no elevado, de color blanco. Reverso crema pálido (Figura 27). Presenta

microconidias abundantes y ovals mezcladas con macroconidias en forma de media luna, se pueden observar clamidosporas grandes y redondeadas solas o en parejas, conidióforos largos, fialides largas con punta, (Figura 28).



**Figura 29.** *Fusarium solani* (Agar PDA)



**Figura 30.** *Fusarium solani* (imagen tomada al microscopio)

Esta especie patógena y celulolítica se encuentra en todo tipo de materias orgánicas. Se ha aislado de diversos sustratos y hábitats, tales como: Madera, dunas, agua (agua de mar, agua de manantial), papel, plantas, sedimentos, suelo, textil, xileno.

*F.solani* es un agente de micotoxicosis en el ganado. Es patógena para el hombre.

La temperatura óptima de crecimiento está entre 27 y 31 ° C, dependiendo del lugar geográfico donde esta especie haya sido aislada. Un buen crecimiento en general, es posible a 37 ° C. El pH óptimo de crecimiento está entre 7 y 8.

La formación de clamidosporas es controlada por la entrada externa de carbono y nitrógeno. Entre los aminoácidos presentes en el micelio, la alanina es predominante, así como: el ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ε-amino-n-butírico. (Maia, *et al.*, (2001)

➤ ***Fusarium equiseti* (Fruto):**

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 18:** *Fusarium equiseti* (Identificación molecular)

Query	Number of hits	Lowest E-value	Accession (E-value)	Description (E-value)	Greatest identity %
221_AG_F-ITS1	20	0	HQ607811	<i>Fusarium equiseti</i> isolate ATT040 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
221_AG_F-ITS4	20	1,8076E-162	JF776161	<i>Fusarium equiseti</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

*Fusarium equiseti* (estado sexual *Gibberella intricans*) es un hongo con colonias de crecimiento rápido, algodonoso, de color blanco (Figura 29). Presenta microconidias abundantes y ovals en forma de media luna, se pueden observar clamidosporas grandes en cadena, conidióforos ramificados y no ramificados, (Figura 30).



**Figura 31.** *Fusarium equiseti* (Agar PDA)



**Figura 32.** *Fusarium equiseti* (imagen tomada al microscopio)

*Fusarium equiseti* produce por lo general toxinas como diacetoxiscirpenol, y al menos en algunas cepas toxina T-2, fusarenona-X y neosolaniol. Tomado de <http://www.mold-help.org/content/view/417/>.

Se ha aislado en las zonas tropicales de una amplia gama de plantas que pertenecen a los siguientes géneros: Agave, Allium, Apium, Arachis, Beta, Brassica, Cajanus, Carica, Crisantemo, Cicer, Citrullus, Citrus, Cocos, Coffea, Cola, Crotalaria, Cucumis, Cucurbita, Cupressus, Daucus, Dianthus, Elaeis, Eucalipto, Ficus, Fragaria, Glicina, Gossypium, Helianthus, Hevea, Hordeum, Linum, Luffa, Lycopersicon, Macadamia, Mangifera, Manihot, Musa, Nicotiana, Oryza, Panicum, Papaver, Pennisetum, Phaseolus, Pinus, Pisum, Prunus, Pyrus, Rosa, Solanum, Sorgo, Theobroma, Trifolium, Triticum, Vicia, Vigna, Zea, Zingiber, también se encuentra en el suelo.

Este hongo es patógeno para las cucurbitáceas y el aguacate, causa la pudrición del tubérculo de *Cycas* y la pudrición del tallo del maíz. La infección y la pudrición del tallo de maíz causado por *F. equiseti* parece ser por esporas transportadas por el aire. Es patógeno para los cereales durante la etapa de plántula y también causa la pudrición de raíces.

Se puede encontrar en todo el mundo, muy frecuente en zonas tropicales y subtropicales, pero también en las regiones templadas. Tomado de: <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=252761>

## CONCLUSIONES

De los residuos del fruto y de la torta de higuera (*Ricinus communis*) se logró el aislamiento e identificación de varias especies de microorganismos de importancia agroindustrial. Bacterias; *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis*. Levaduras; *Rhodosporidium paludigenum* y *Pichia burtonii*. Hongos filamentosos; *Penicillium brevicompactum* y *Fusarium solani*, reportados en la literatura como posibles degradadores de celulosa.

La identificación molecular es una metodología muy sensible, sin embargo los métodos tradicionales se deben tener en cuenta para lograr buenos resultados en la identificación de microorganismos.

En los residuos del fruto y de la torta de higuera existe una gran diversidad de microorganismos que pueden ser empleados en la industria y en diferentes bioprocesos, contribuyendo de esta manera a mitigar el impacto ambiental

## RECOMENDACIONES

- En trabajos de investigación cuyo objetivo sea la identificación de microorganismos si se cuenta con recursos, es importante utilizar técnicas de biología molecular.
- Efectuar estudios enzimáticos para evaluar el potencial de degradación de compuestos lignocelulósicos de los microorganismos aislados.
- Diseñar estudios sobre la utilización potencial de residuos lignocelulósicos en procesos agroindustriales y de esta forma contribuir a mitigar la contaminación ambiental.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahammed S. y P. Prema. 2002. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103(1-6).
- Atlas, R.M. & Bartha, R. 1980. The carbon cycle. In: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Addison-Wesley Publishing Company.
- Betts W. y R. Dart. 1989. Initial reactions in degradation of tri- and tetrameric lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*. *Mycological Research* 92(2):177-181.
- Bommarius, A. S., & Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Cardoso J. y M. Costa. 1994. *Aspergilli* and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications. *Microbiology Reviews* 13(2-3):377-386.
- chryso sporium. *App Environl Microbiol* , 58, 2402-2409.
- Conesa A., C. Hondel y P. Punt. 2000. Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol* 66(7): 3016–3023.
- Devries, R.; Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of Fan, L.T.; Lee, Y-H & Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. XXII, 177-199.
- Kadam K. y S. Drew. 1985. Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white-rot fungi using C-labeled and unlabeled kraft lignins. *Biotechnology and Bioengineering* 28(3): 394-404.
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* 35: 377-391.
- Ladisch, M.R.; Lin, K.W.; Voloch, M. & Tsao, G.T. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5,82-102.
- Lehninger, A.L. 1987. *Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A 2<sup>a</sup>.ed. Barcelona.
- Lynd, L.; Weimer, P.; Van Zyl, W.; Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose

- Madigan M; Martinko J (editors). (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
- Maia, M.M.D.; Heasley, A.; camargo de Morais, M.M.; Melo, E.H.M.'Morais Jr, M.A.; Ledingham, W.M.; Filho, J.L. 2001. Effect of cultura conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76:23-27.
- Mäkelä M., S. Galkin, A. Hatakka y T. Lundell. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 30: 542-549.
- Marquez A., G. Mendoza, S. Gonzales, S. Buntix y O. Loera. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 Y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. INCI 32(11). Microbiology. 50: 183-212.
- Milstein O., Y. Vered, L. Shragina, J. Gressel, H. Flowers y A. Hüttermann. 1983. Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. Archives of Microbiology 135(2).
- Olvera P. 2003. Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación. Tesis profesional presentada para obtener el título en maestría en biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.
- Papinutti, L. (2003). *Enzimas Ligninolíticas en Fomes sclerodermeus*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina.
- Pereira, J.F.; Queiroz, M.V.; Gomes, E.A.; Muro-Abad, J.I.; Araújo, E.F. Molecular characterization and evaluation of pectinase and cellulase production of *Penicillium* spp. *Biotechnol. Lett.*, 24, 831- 838, 2002.
- Pérez, J., & Jeffries, T. W. (2002). Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete* plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(4): 497-522.
- Polyanna N. Herculano D. Lima M. Fernandes R. Neves C. Souza-Motta A. 2011. Isolation of cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis* L.). *Curr Microbiol* (2011) 62:1416-1422. DOI 10.1007/s00284-011-9879-3.
- Prescott L. 2004. Microbiología 5ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid-España

Sabatier J. 1992. Estudio de la deslignificación a la soda del bagazo. Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. Ciudad de la habana-Cuba.

Shivaji, P. Chaturvedi, K. Suresh, G. S. N. Reddy, C. B. S. Dutt, M. Wainwright, J. V. Narlikar and P. M. Bhargava. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from highaltitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), 56, 1465–1473.

Soares, G., De Amorin, M., & Costa-Ferreira, M. (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol* , 89, 123-129.

Steffen K., M. Hofrichter y A. Hatakka. 2002. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter–decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology* 30:550 – 555. utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3): 506-577.

Valenzuela E., C. Santibañez, S. Leiva y H. García. 2001. Hongos aislados desde sedimentos del lago Riñihue y afluentes X región. *Bol. micol.* 16:79-80.

WARREN, R. 1996. Microbial Hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews of*

## ANEXOS

### Anexo 1. Extracción DE DNA en Levadura

1. Transfiera 1.5 ml de cultivo líquida de levadura en un tubo eppendorf. Centrifugar 20,000g (4100rpm) durante 5 minutos.
2. Añada 200  $\mu$  de buffer Tritón/SDS.
3. Sumerja los tubos en un baño de etanol de hielo seco durante 2 minutos,
4. Transferencia a en un 95°C baño maría durante 1 minuto.
5. Repita los dos últimos pasos
6. Vortex 30 segundos.
7. Añada 200  $\mu$ l de fenol cloroformo y 0.3 g de perlas de cristal. vortex 2 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 200  $\mu$ l de TE (pH 8). Mezclar en vortex brevemente.
8. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente. Para separa la fase acuosa y la fase orgánica.
9. Trasferir la fase superior acuosa a un tubo y añadir 400-1000 de etanol helado al 100%. Mezclar por inversión o vortex. Incubar a temperatura ambiente, 5 minutos. O bien, precipite el ADN en -20°C para aumentar la producción.
10. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Remover el sobrenadante con una pipeta de Pasteur por aspiración.
12. Lavar el pellet con 500  $\mu$ l etanol 70%.
13. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Remover el sobrenadante. Secar a temperatura ambiente.
15. Suspender el pellet de acido nucleico en 50  $\mu$ l TE (pH 8.0).

## **Anexo 2. Extracción DNA Bacterias**

1. Adicionar 50 µL de ADE a un tubo eppendorf y agregar una colonia.
2. poner a hervir en 1 mL de ADE durante 10 minutos a 95 °C.
3. llevar a nevera a -20 °C.

### **PURIFICACIÓN PCR BACTERIAS**

1. Prepare el gel a 0.8% de Agarosa en buffer TAE 1X.
2. Corra la electroforesis de 3-6 V/cm.
3. Deje correr la electroforesis hasta que este haya llegado a las  $\frac{3}{4}$  partes de la cámara de corrido.
4. Coloque con mucho cuidado el gel de agarosa en el transiluminador con la luz UV encendida, y corte el fragmento de interés que será aislado (lo más delgado posible).
5. Transfiera el pedazo de gel cortado a un tubo limpio.
6. Después de cortar la banda tome la fotografía del gel para documentar el tamaño de la banda que fue purificada.
7. Adicionar 5 volúmenes de buffer de elución, cierre el tubo y fusione el gel por incubación por 5 minutos a 65°C.
8. Enfríe la solución a temperatura ambiente y añadale un volumen igual de Fenol a pH 8.0. Haga vortex de la mezcla durante 20 segundos y recupere la fase acuosa por centrifugación a 4000 g por 10 minutos.
9. Extraiga la fase acuosa y después agregue fenol:cloroformo y luego con cloroformo siguiendo el paso 8.
10. Transfiera la fase acuosa a un tubo limpio de centrifugación. Adicione 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto a 4°C.
11. Almacene la mezcla por 10 minutos a -20°C y después centrifugue a 5000 g por 20 minutos a 4°C.
12. Lave el pellet con 70% de etanol, centrifugue, vote el sobrenadante, deje secar y disuelva en un volumen apropiado de TE pH 8.0.

### Anexo 3. Protocolo Extracción de Hongos de Wendland et al. (1996)

1. Crecer el hongo en 5 ml de medio SB durante 3 o 4 días en un tubo cónico de 50 ml.
2. Filtrar en un papel whatman en manifold, el contenido del medio hasta que pase completamente.
3. Agregue 200 ml de agua destilada estéril y deje pasar en su totalidad hasta que pase todo el líquido.
4. Seque con papel absorbente y retire el micelio del hongo y pase a un tubo eppendorf con 500  $\mu$ L de Buffer de extracción.
1. Incubar a 65°C durante 1 hora.
2. Agregar 1  $\mu$ g/ml de RNAsa e incubar por 1 hora a 37°C.
3. Adicionar Fenol-Cloroformo-Isoamilalcohol (25:24:1) (V/V), y agitar suavemente hasta formar emulsión.
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante y agregar solución de Cloroformo: isoamil: alcohol (24:1) y mezclar por inversión SUAVEMENTE durante 30 segundos.
6. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
7. Repetir estos dos pasos cuantas veces sea necesario hasta observar el sobrenadante transparente. De no llegar hasta este estado, lavar sólo tres veces.
8. Recuperar el sobrenadante y adicionar 2.5V de etanol Absoluto y 0.3 M de Acetato de Sodio.
9. Incubar 1-2 horas a -20°C.
10. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
11. Descartar la solución y lavar el pellet con Etanol al 70%
12. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
13. Dejar secar a temperatura ambiente.
14. Adicionar 500  $\mu$ L de Agua o Buffer TE pH 8.0
15. Mezclar suavemente e incubar a 60°C por 5 minutos.
16. Correr electroforesis en agarosa al 1%.