



***DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE ORIGEN NATURAL
PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD
LIGNINOLITICA***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, D.C. 2019**



***DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE ORIGEN NATURAL
PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD
LIGNINOLITICA***

Wilson Alejandro Puerto Zea

Asesora

MSc. Ligia Consuelo Sánchez Leal

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, D.C. 2019**

DEDICATORIA

A mi madre, la mujer más valiente e inteligente que conozco.

A mis abuelos que siempre estuvieron pendientes de mi formación como persona y profesional.

A mi tía que a pesar de estar lejos siempre la tengo como ejemplo a seguir.

A mi pareja que ha estado presente siempre para mí, brindándome su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a todos los docentes y directivos que hacen parte de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento educativo.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a la docente Lúgía Consuelo Sánchez, principal colaborador durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento y enseñanza permitió el desarrollo de este trabajo

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	12
INTRODUCCION	14
OBJETIVOS.....	16
GENERAL.....	16
ESPECIFICOS.....	16
1. ANTECEDENTES.....	17
2. MARCO TEORICO	25
2.1 LIGNINA Y PARED CELULAR	25
2.2 COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL	27
2.3 LA MADERA	27
2.3.1 PINO <i>Pinus sp.</i>	29
2.3.2 GRANADILLO <i>Dalbergia granadillo</i>	30
2.3.3 SAJO <i>Camptosperma panamensis</i>	30
2.4 METODOS PARA LA EXTRACCION DE LIGNINA.....	31
2.4.1 LIGNINA TIPO KRAFT	31
2.4.2 LIGNINA TIPO SODA	32
2.4.3 LIGNINA TIPO SULFITO	32
2.5 MEDIOS DE CULTIVO	33
2.6 MEDIOS DE CULTIVO CON LIGNINA DISEÑADOS A PARTIR DE MODIFICACIONES	35
2.6.1 AGAR LIGNINA THORN <i>et al 1996</i>	35
2.6.2 MEDIO MINIMO DE SALES CON LIGNINA ABHAY <i>et al 2007</i> .	36
2.6.3 MEDIO CZAPECK	36
2.6.4 MEDIO MADERA DE ABEDUL Y MEDIO SALVADO DE TRIGO THA SWE K. 2011	37
2.6.5 AGAR EXTRACTO DE ASERRIN BUITRAGO S. <i>et al 2014</i>	37
2.7 BACTERIAS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA	37
2.7.1 <i>Serratia marcescens</i>	37
2.7.2 <i>Bacillus subtilis</i>	38

2.7.3 OTRAS BACTERIAS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA	38
2.8 HONGOS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA	41
2.8.1 <i>Penicillium commune</i>	41
2.8.2 <i>Paecilomyces formosus</i>	41
2.8.3 <i>Pleurotus fossulatus</i>	42
2.8.4 OTROS HONGOS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA	42
2.9 ENZIMAS MICROBIANAS DE FACULTAD LIGNINOLITICA	45
2.9.1 LACASAS	45
2.9.2 LIGNINO PEROXIDASA.....	45
2.9.1 MANGANESO PEROXIDASA	46
3. DISEÑO METODOLOGICO.....	47
TIPO DE INVESTIGACION	47
3.1 UNIVERSO POBLACION Y MUESTRA.....	47
3.2 HIPOTESIS, VARIABLES E INDICADORES.....	48
3.3 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	50
FASE 1: Determinación de los componente y preparación del medio	50
FASE 2: Verificación de la capacidad del medio para el crecimiento de	
microorganismos ligninolíticos.....	54
FASE 3: Establecer un protocolo para la preparación del medio de	
cultivo	58
4. RESULTADOS	59
FASE 1: Determinación de los componente y preparación del medio	59
FASE 2: Verificación de la capacidad del medio para el crecimiento de	
microorganismos ligninolíticos.....	60
FASE 3: Establecer un protocolo para la preparación del medio de	
cultivo	77
5. DISCUSION	79
6. CONCLUSIONES	85
7. REFERENCIAS	87
8. ANEXOS.....	104

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la pared celular.....	28
Tabla 2. Aspectos generales de las bacterias con cualidades ligninolítica .	39
Tabla 3. Aspectos generales de los hongos con cualidades ligninolíticas ..	43
Tabla 4. Variables e indicadores de la fase experimental.....	48
Tabla 5. Cantidad de los componentes nutricionales del medio de cultivo..	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los principales componentes de la lignina	25
Figura 2. Muestras de maderables para la fase experimental	50
Figura 3. Componentes nutricionales del medio de cultivo	51
Figura 4. Cocción del aserrín en soda caustica 4%	52
Figura 5. Ligninas extraídas de los tres diferentes tipos de material vegetal	53
Figura 6. Cepa de <i>Serratia marcescens</i>	55
Figura 7. Cepa de <i>Bacillus subtilis</i> (TB2)	55
Figura 8. Cepa de <i>Pleurotus fossulatus</i>	55
Figura 9. Cepa de <i>Penicillium commune</i>	56
Figura 10. Cepa de <i>Paecilomyces formosus</i>	56
Figura 11. Cepa de <i>Streptomyces</i> sp	56
Figura 12. Cepa de <i>Listeria innocua</i>	57
Figura 13. Cepa de <i>Enterococcus faecalis</i>	57
Figura 14. Medios de cultivos preparados a partir de las ligninas extraídas	59
Figura 15. Prueba de esterilidad los medios de cultivo	60
Figura 16. <i>Streptomyces</i> sp. en Agar Lignina 1,2 y 3	61
Figura 17. <i>Listeria innocua</i> en Agar Lignina 1,2 y 3	61
Figura 18. <i>Enterococcus faecalis</i> en Agar Lignina 1,2 y 3	62
Figura 19. <i>Serratia marcescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en Agar Lignina 1	63
Figura 20. <i>Serratia marcescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en Agar Lignina 2	65
Figura 21. <i>Serratia marcescens</i> en Agar Lignina 3	66
Figura 22. Coloracion de Gram de <i>Serratia marcescens</i>	67
Figura 23. Coloracion de Gram de <i>Bacillus subtilis</i> (TB2)	68
Figura 24. Prueba BBL-Crystal para Gram Negativas	70
Figura 25. Prueba BBL-Crystal para Gram Positivas	70
Figura 26. <i>Penicillium commune</i> , <i>Paecilomyces formosus</i> y <i>Pleurotus fossulatus</i> en Agar Lignina 1	71
Figura 27. <i>Penicillium commune</i> , <i>Paecilomyces formosus</i> y <i>Pleurotus fossulatus</i> en Agar Lignina 2	72

Figura 28. <i>Penicillium commune</i> , <i>Paecilomyces formosus</i> y <i>Pleurotus fossulatus</i> en Agar Lignina 3	73
Figura 29. Tincion con azul de lactofenol de <i>Penicillium commune</i>	74
Figura 30. Tincion con azul de lactofenol de <i>Paecilomyces formosus</i>	75
Figura 31. Tincion con azul de lactofenol de <i>Pleurotus fossulatus</i>	76

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Hoja de vida de los microorganismos seleccionados	104
---	-----



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE ORIGEN NATURAL
PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD
LIGNINOLITICA.**

RESUMEN

La lignina es el biopolímero más abundante en el planeta después de la celulosa, representa un componente de gran importancia en las paredes celulares de los organismos del reino Plantae, debido a que este es el responsable de aportar protección, rigidez y soporte a la planta. Sin embargo, es uno de los causantes de problemas ambientales producidos por la industria papelera, debido a que se utilizan solventes químicos para eliminar la lignina y dejar solamente la celulosa. El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar un medio de cultivo que contenga como fuente principal de carbono la lignina, con el fin de ver el crecimiento y desarrollo de microorganismos con la actividad enzimática para degradar el polímero agregado, conocidos como ligninolíticos. La metodología incluyó la extracción de lignina de 3 variedades vegetales maderables, sajo, pino y granadillo; comparación del crecimiento de los microorganismos frente a las ligninas, verificación de las características microscópicas de 5 microorganismos, 2 bacterias y 3 hongos que son reconocidos como potencialmente ligninolíticos y que fueron inoculados en los medios con el fin

de determinar la viabilidad y funcionalidad del sustrato preparado. Las cepas provenían del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y están caracterizadas fenotípica y genotípicamente. Se evidenció que los 5 microorganismos demostraron capacidad ligninolítica en los medios de cultivo, pero, *Bacillus subtilis*, no creció en el agar con lignina de sajo. Se espera a futuro, poder escalar estos medios por fermentación en estado sólido, para ser aplicado en biorremediación.

Palabras clave: sajo, granadillo, pino, lignina, medio de cultivo, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus*, *Pleurotus fossulatus*

Estudiante: Wilson Alejandro Puerto Zea

Profesor: Ligia Consuelo Sánchez Leal MSC.

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha: agosto 31 de 2018

INTRODUCCION

La lignina, después de la celulosa, es el segundo biopolímero de mayor abundancia en la tierra que compone la pared celular de todas las células vegetales, junto con otros compuestos como la celulosa y hemi-celulosa¹. A este biopolímero, el cual es generado a partir de varios fenil-propanoides², se le ha encontrado en la actualidad varias utilidades a nivel industrial, como por ejemplo, la industria papelera, para producción de pesticidas, emulsificantes y secuestradores de metales pesados, entre otras³.

Los microorganismos requieren ciertas concentraciones mínimas de carbono y otros elementos tales como nitrógeno, oxígeno, fósforo, etc. en su entorno de crecimiento para utilizarlo como principal fuente de energía, con el fin de poder realizar todas sus funciones vitales, algunos utilizan carbohidratos, almidón, otros requieren de algunas proteínas, componentes de las paredes celulares como la celulosa y hemicelulosa, entre otras sustancias orgánicas^{4,5}.

En el campo microbiológico, la lignina representa un biopolímero muy grande el cual no puede ser degradado con facilidad^{1,2,3}; existen varios microorganismos tanto de origen bacteriano como de origen fúngico, a los cuales se les ha identificado la capacidad de crecer y sobrevivir utilizando como fuente de carbono y energía principal, este biopolímero^{4,5} haciendo uso de enzimas como la lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa que tienen la capacidad de degradar la lignina. Sin embargo, en la actualidad no existe un medio de cultivo el cual tenga un proceso de producción estandarizada, desde la obtención del biopolímero vegetal hasta el resultado final que sería el sustrato de cultivo, que permita el crecimiento de un microorganismo capaz de utilizar la lignina como sustrato de crecimiento⁶.

El desarrollo de medios de cultivo para el análisis e identificación de los requerimientos metabólicos y nutricionales de los microorganismos, resulta un gran campo de investigación en el laboratorio, porque facilita clasificar e identificar el microorganismo sembrado por las reacciones bioquímicas que producen según las enzimas que tenga⁶. En los medios, estas

modificaciones en las que se pueden agregar o eliminar componentes tales como nutrientes, aminoácidos, antibióticos, inhibidores de crecimiento, factores de crecimiento, vitaminas, entre otras, permiten establecer “selectividad”^{7,8,9}. Se han desarrollado varios medios de cultivo, como por ejemplo el Medio Mínimo de Sales (MSM) que aporta cantidades mínimas de nutrientes a los microorganismos, sometidos a estrés y son modificados⁶, de tal manera, que al agregar lignina ya extraída de materiales vegetales o maderables genere un sustrato de cultivo en el cual solamente crecerán microorganismos capaces de utilizar este polímero como fuente de energía, que los obliga a tomar la vía metabólica adecuada para el uso del biopolímero^{10,11}.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un medio de cultivo a partir de componentes naturales ricos en lignina, utilizando aserrín de tres variedades vegetales maderables, con el fin de tener un sustrato con un contenido significativo de lignina, que permita a los microorganismos tanto de origen bacteriano como también fúngico, la utilización de enzimas degradadoras, para determinar su capacidad ligninolítica para ser utilizado a futuro en Biorremediación.

La lignina puede ser obtenida de forma comercial, la cual es distribuida por diferentes laboratorios, esta lignina ha pasado por procesos previamente de extracción y purificación, lo cual hace que su costo sea bastante elevado, en el presente trabajo se ejecutó un proceso de extracción que, pese a que no purifica el residuo extraído final, es bastante económico y no es indispensable el uso de equipos sofisticados.

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar un medio de cultivo a partir de componentes naturales ricos en lignina, utilizando aserrín de tres variedades vegetales maderables, con el fin de tener un sustrato con un contenido significativo de lignina, que permita a los microorganismos tanto de origen bacteriano como también fúngico, la utilización de enzimas degradadoras.

ESPECÍFICOS

- Obtener lignina a partir de aserrín de tres variedades vegetales maderables para la elaboración del medio de cultivo
- Comprobar la actividad enzimática ligninolítica de algunos microorganismos bacterianos y fúngicos reportados con capacidad ligninolítica.
- Establecer un protocolo de la preparación del medio de cultivo a partir de las tres variedades vegetales seleccionadas.

1. ANTECEDENTES

A continuación, se presentan algunas investigaciones que describen medios de cultivo desarrollados hasta la actualidad, los cuales proponen un sustrato para el crecimiento de microorganismos con potencial ligninolítico. Además, también se presentarán los antecedentes relacionados con sustratos que hayan sido creados a partir de modificaciones a medios de cultivos ya existentes, tales como el Medio Mínimo de Sales (MSM).

Uno de los primeros medios de cultivo que se hizo para propiciar un buen crecimiento de biomasa microbiana capaz de degradar la lignina, fue el realizado en 1996 gracias a un estudio realizado por Thorn *et al*, en el que, se tomaron 64 muestras de suelo las cuales fueron cultivadas en placas de agar sólido compuesto de varias sales esenciales como: Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4), nitrato de amonio (NH_4NO_3), cloruro de potasio (KCl), sulfato de hierro (FeSO_4), nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y suplementado con lignina alcalina. Este medio presentaba una selectividad la cual permitía únicamente el crecimiento de microorganismos que fueran capaces de obtener energía a partir de este biopolímero tan grande, además agregaron también benomilo, un fungicida capaz de inhibir el crecimiento micótico en especial de los Ascomycetos. Los microorganismos que lograron ser aislados pertenecían al grupo de Basidiomicetes, especies tales como *Clitopilus* sp., *Coprinus* sp., *Irpex* sp., *Ceratobasidium* sp., *Armillaria* sp., entre otros¹².

Estudios previos realizados por Arora D. y Sandhu D. en 1985, en los que se concluyó la acción reveladora del guayacol como reactivo capaz de demostrar la producción de peroxidasa de tipo ligninasas y lacasas¹³ permitieron la identificación de microorganismos ligninolíticos en especial *Polyporus versicolor*, o mejor conocido como el hongo de la pudrición de la madera, de 150 muestras de tres (3) lugares con condiciones climatológicas diferentes. Thorn *et al*, realizó el mismo procedimiento y agregó a su Agar lignina-benomilo el reactivo guayacol como indicador de la producción de enzimas degradadoras de lignina¹².

En el 2007, Abhay Raj *et al* realizó el aislamiento de ocho (8) cepas bacterianas capaces de crecer en Medio Mínimo de Sales (MSM) el cual contenía lignina de Kraft, esta lignina es la resultante del proceso de obtención de pulpa de celulosa por el método propuesto por las industrias papeleras³, la cepa sobre la cual se realizó el estudio fue la ITRC-S8 debido a que esta produjo en mayor cantidad y velocidad, enzimas capaces de degradar y utilizar el biopolímero presente en el MSM como fuente de carbono, seguido de una coloración para identificar la afinidad de la bacteria al cristal violeta o a la fucsina, se demostró que este microorganismos eran Gram positivos, en forma de bastón o bacilo, no-móvil. Posteriormente, gracias a una secuenciación de este microorganismo utilizando el rRNA se obtuvo un 95% de compatibilidad con el género *Bacillus* sp., y se demostró también la degradación del colorante presente en el medio sólido. Se confirmó la capacidad ligninolítica del *Bacillus* sp. mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, con el que se identificaron compuestos aromáticos de bajo peso molecular asociados a la lignina (LMWACs de sus siglas en inglés Lignin-related Low Molecular Weight Aromatic Compounds) tales como: ácido t-cinámico, 3,4,5-trimetoxil benzaldehído y ácido ferulico¹⁴.

En el trabajo de grado presentado por Arias E. y Piñeros P en 2008, se hizo uso del agar Czapeck, medio utilizado para la recuperación de hongos filamentosos, apropiado para la caracterización de su capacidad lignocelulósica, este sustrato de cultivo está compuesto de varias sales esenciales como nitrato de sodio (NaNO_3) 3.0 g/L, fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 1g/L, sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.5 g/L, cloruro de potasio (KCl) 0.5 g/L y sulfato ferroso (FeSO_4) 0.01 g/L, se diferencia del agar lignina alcalina debido a que este agrega sacarosa o glucosa como fuente de energía, junto con 1% de lignina alcalina. Este sustrato de cultivo fue utilizado para el aislamiento de hongos filamentosos de muestras tomadas de suelos del páramo de Guasca y Cruz Verde, en donde lograron aislar hongos de géneros como: *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Byssochlamys* sp.,

Cladosporium sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Emericella* sp., *Mucor* sp., *Phanerochaete* sp., entre otros¹⁵.

Laura J. y Castellanos P. en 2009 realizaron un estudio para identificar hongos filamentosos con capacidad ligninolítica. Obtuvieron muestras de paja silvestre (*Calamagrostis nitidula*) en condición erguida y descompuesta, recolectadas de la región de Ticlio a 4800 M.S.N.M. (Metros Sobre el Nivel del Mar), provincia de Huarochiri, Lima, Perú. Cuando las muestras llegaron al laboratorio estas fueron cortadas en trozos pequeños y sembradas en medio líquido de sales Czapeck suplementado con lignina alcalina 0,2% como única fuente de carbono, mantenidos en oscuridad y bajo una temperatura de 25°C, con una humedad relativa del 65% fueron incubados durante 30 días. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron muestras de cada frasco con medio líquido y se pasaron a cajas de Petri con Agar Czapeck 0,2% lignina, las colonias que crecieron en este medio fueron re-sembradas en agar papa dextrosa (PDA) para poder realizar un análisis macroscópico a las colonias en el que se identificaban cualidades como textura, color, etc. y un análisis microscópico para identificar estructuras vegetativas y reproductivas, que pudieran dar pista del microorganismo que fue aislado. Para la prueba de degradación de lignina, se utilizó un espectrofotómetro estableciéndose una curva de calibración a 560 nm. Los microorganismos que lograron aislar gracias a este método fueron de los géneros *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Helicomyces*, *Mucor* y *Aspergillus* sp¹⁴.

Saenz M. en su tesis presentada en 2009, propone un sustrato de origen natural diferente a la lignina alcalina o a la lignina de Kraft, las cuales se obtienen a partir de procesos de extracción con solventes y productos químicos, para analizar la capacidad de producción de peroxidasas por parte de los microorganismos. Se preparó una solución la cual contenía sales esenciales (MSM), guayacol y tamo de arroz como sustrato rico en compuestos ligninocelulosicos, por triplicado; se sembraron muestras de control positivo *Pleutotus ostreatus*, hongo ya reconocido con capacidad de

metabolizar este biopolímero, después de un tiempo de incubación de 8 días, se llevaron a agitación y posteriormente a centrifugación para obtener un sobrenadante, este sería utilizado en un inmuno-ensayo tipo ELISA para determinar la presencia de peroxidasas. También plantea un método para la identificación de ligninasas, similar al procedimiento utilizado para la determinación de peroxidasas, se prepara la solución, esta vez sin agregar guayacol, luego con el mismo procedimiento de agitación y centrifugación se obtendrá un sobrenadante el cual se hará reaccionar con un reactivo para determinar, por mecanismos colorimétricos la presencia de ligninasas¹⁶.

Un estudio realizado por Ortiz M. y Uribe D. en 2010 para la determinación de microorganismos con actividad lignocelulosica, aislados de muestras de la sabana de pastoreo y bosque secundario de sabana inundable tropical en la vereda La Balsa (Puerto López), departamento del Meta, Colombia, estos microorganismos fueron aislados e identificados con el fin de utilizarlos como factor de biorremediación de suelos en donde haya presencia de desechos de cosecha, debido a su arsenal enzimático capaz de degradar la mayoría de compuestos lignocelulosicos presentes en tales desechos estos microorganismos poseen un potencial biorremediador^{3,5,13}. La investigación obtuvo un total de una sola cepa de *Verticillium* sp. con capacidad ligninolítica, frente a 75 cepas de hongos y bacterias con actividad celulolítica en especial géneros como *Penicillium* sp. y *Trichoderma* sp. Estos aislamientos fueron realizados utilizando como sustrato de cultivo agar CMC y agar lignina, finalmente tanto la actividad celulolítica, como la ligninolítica, fue confirmada a partir de espectrofotometría¹⁷.

En el 2011, Gao H. *et al* aislaron un *Ascomycete* capaz de utilizar la lignina como fuente principal de energía. Obtuvieron muestras de madera descompuesta del árbol *Salix matsudana* en el Monte Tai, China, fueron sembradas en agar PDA para la identificación de la capacidad ligninolítica de los microorganismos que crecieran en este sustrato, se adicionaron indicadores al sustrato de cultivo tales como azul remazol brillante, guayacol y ácido tanínico para observar la producción de peroxidasas gracias a la

decoloración del reactivo; la morfología y esporulación fue analizada gracias a la microscopia, mientras que el reconocimiento de colonias fue gracias a un estudio macroscópico. Además, se realizaron estudios genéticos para la identificación del ascomiceto aislado. También se realizaron cultivos en medios líquidos para obtener otro tipo de crecimiento microbiano aparte del que se puede obtener en medios sólidos, se utilizó Medio Básico V para observar la producción de lacasa, se realizaron cuatro (4) tipos de modificaciones a este medio para observar con cual se obtenía una mayor producción enzimática. La actividad de la lacasa al igual que la manganoso peroxidasa fue medida utilizando espectrofotometría utilizando guayacol como sustrato. La actividad de la enzima lignino peroxidasa fue medida utilizando espectrometría de UV. Para la caracterización del potencial ligninolítico del *Ascomycete* aislado, este fue re-suspendido en un medio mínimo de sales, a dicho medio se le había agregado lignina previamente, además de otros nutrientes y guayacol como indicador de la producción enzimática. La cepa aislada y tipificada es reconocida como GHJ-4⁸.

En ese mismo año al igual que Gao H. *et al*⁸, Tha Swe K. presenta en su tesis para optar por el título de Magister en ciencias, un estudio que plantea posibles condiciones que pueden favorecer la producción de enzimas capaces de romper la lignina para poder utilizarla como fuente de carbón y energía. Los medios de cultivo que utilizaron en el estudio fueron suplementados con extracto de madera de abedul y salvado de trigo, esto con el fin de aumentar la producción de enzimas ligninolíticas, aislaron siete cepas de hongos filamentosos que fueron capaces de crecer en el medio de cultivo que contenía abedul, además de poder degradar el colorante presente en el medio (azul remazol brillante, verde de metileno y guayacol), indicando la efectiva producción de enzimas por parte de los agentes fúngicos. De estas cepas se seleccionaron *Penicillium pinophilum* y *Trametes hirsuta* para analizar su capacidad ligninolítica. Ambos microorganismos fueron cultivados en medios líquidos que contenían abedul y peptona, demostraron una mayor producción enzimática frente a los hongos que crecieron en medio líquido sin peptona. *T. hirsuta* demostró la

capacidad de producir lacasas en el medio sólido de cultivo enriquecido con salvado de trigo, aunque no logro detectarse la producción de manganeso peroxidasa por parte de este microorganismo¹⁸.

De igual modo que Thorn *et al.*¹² en 1996, Paillié M. en el 2012 hace uso del agar lignina alcalina, agar carboximetilcelulosa (CMC) y agar almidón para realizar un proceso de aislamiento de microorganismos con potencial enzimático de degradar compuestos ricos en lignina, celulosa y amilasa respectivamente, obteniendo muestras de suelo rizosférico de trébol blanco *Trifolium repens*. Lograron aislar 23 cepas de actinobacterias en especial del género *Streptomyces* sp¹².

Abdul Rahman N. *et a.* realizó una investigación en 2013 en la cual logro aislar tres bacterias aerobias a partir de muestras tomadas de suelos en los que hay plantaciones de palma de cera en Seri Ulu Langat Palm Oil Mill, Selengor, Malasya, estas bacterias fueron seleccionadas debido a su capacidad de crecer en un Medio Mínimo de Sales (MSM) suplementado con lignina de Kraft, las tres bacterias eran capaces de producir las tres enzimas ligninolíticas más relevantes: lacasa, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa, sugiere que estas bacterias pueden ser utilizadas en procesos de biorremediación de suelos en los que existan plantaciones de palma de cera. Estas muestras reconocidas en el estudio como SHC1, SHC2 y SHC3, fueron posteriormente identificadas como: *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp. y *Leucobacter* sp. Propone también usar un pH de 7,5-8.0 junto con una temperatura que oscile entre 28-30°C para obtener un pico máximo de producción enzimática por parte de las tres bacterias aisladas¹⁹.

Se lograron aislar microorganismos en un estudio realizado por Buitrago S. *et al.* en el 2014, tanto de origen bacteriano como de origen fúngico, estos fueron recuperados a partir de muestras de los humedales Torca, Guaymaral, Córdoba y La Conejera, todos ubicados en el norte de Bogotá D.C. Una vez seleccionados los cuatro (4) humedales de donde se obtendrían las muestras de suelo, se procedió a la toma de muestra del suelo de este, en una cantidad de 100g los cuales fueron sembrados sobre

agar almidón 1%, agar CMC y agar extracto de aserrín, los cuales fueron incubados durante cinco (5) días a 30°C; para revelar el halo de hidrólisis de la celulosa se utilizó la técnica de Rojo Congo y para los amilolíticos se utilizó lugol como revelador. Finalmente por macro y microscopia se realizó la identificación del microorganismo. En los cuatro (4) humedales se logró el aislamiento de microorganismos con capacidad enzimática, 27 cepas de bacilos Gram positivos, 17 de bacilos Gram negativos y siete (7) de hongos. Las bacterias ligninolíticas fueron identificadas como *Arthrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp. y *Pseudomonas* sp⁴.

En el año 2014 Sasikumar V. *et al*, hicieron una investigación en la cual aislaron microorganismos capaces de crecer en un MSM suplementado con 1% de lignina alcalina. Primero se preparó la lignina alcalina (sustrato principal que se busca sea degradado), seguido a esto se obtuvieron muestras de estiércol de vaca, suelo de compostaje y pulpa de celulosa, utilizando el MSM como base principal del medio de cultivo desarrollado se agregó 1% de lignina alcalina, la capacidad ligninolítica del microorganismo que creciera de las muestras sería medida utilizando azul de metileno. En total se aislaron 9 cepas de microorganismos con capacidades ligninolíticas, entre ellos bacterias del género *Pseudomonas* sp y hongos del género *Phanerochaete* sp⁷.

Jadhav P. *et al*, en 2016 propuso un diseño para observar el potencial blanqueador y biodegradador de dos bacterias frente a colorantes y lignina respectivamente, en su proceso logro aislar dos microorganismos de gran relevancia debido a su capacidad de degradar los colorantes y la lignina presentes en un medio de cultivo, los sustratos utilizados para el aislamiento de estas bacterias fueron el Medio Mínimo de Sales (MSM) suplementado con lignina y agar lignina. Estas bacterias fueron identificadas como *Corynebacterium jeikeium* y *Sphingomonas paucimobilis*, su capacidad ligninolítica fue analizada cuantitativamente por medio de espectrofotometría y cualitativamente por observación del crecimiento de biomasa en el sustrato de cultivo suplementado con lignina, su potencial blanqueador fue analizado

mediante la marcación con cromóforos de varios colorantes, previo a un cultivo realizado con estos colorantes, la lignina peroxidasa producida por las bacterias ligninolíticas fueron capaces de destruir los cromóforos y degradar los colorantes²⁰.

Es gracias a estos estudios realizados previamente que se posee una pauta la cual seguir, para el correcto desarrollo de un medio de cultivo a partir de componentes de origen natural que permita el crecimiento de microorganismos que posean la capacidad de producir enzimas con potencial ligninolítico.

2. MARCO TEORICO

2.1 LIGNINA Y PARED CELULAR

La lignina es, después de la celulosa, el segundo biopolímero más abundante en el planeta tierra ya que conforma aproximadamente el 32% del total de la pared celular vegetal. Este es generado a partir de la oxidación de varios fenilpropanoides y compuestos hidroxicinámicos; dicho biopolímero se encuentra en la pared celular de especies herbáceas maderables y no maderables, es el responsable de aportar a la planta rigidez y soporte junto con los demás componentes presentes en la pared^{1,3,16,21,22}. Debido a su capacidad de generar enlaces, aleatoriamente, durante su síntesis y a su gran tamaño, se posiciona como uno de los biopolímeros de origen natural más difíciles de degradar². Los principales compuestos hidroxicinámicos de los cuales se parte para sintetizar la lignina son: Alcohol paracoumaryl, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, las ligninas generadas a partir de estos compuestos pueden ser denominadas ligninas hidroxifenilicas, guaiacilicas o siringilicas. Plantas como las traqueofitas, es decir, plantas vascularizadas, son las que sintetizan esos tipos de ligninas, mientras que especies herbáceas briofitas no producen ningún tipo de lignina^{2,21,22}.

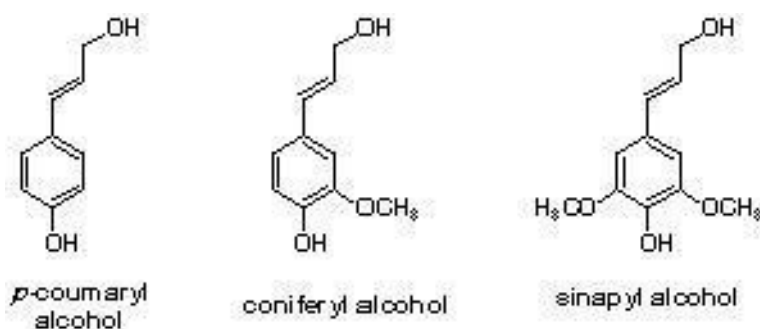


Figura 1. Estructura química de los principales componentes de la lignina. Tomado de: López S. Fabricación de pasta de celulosa. Aspectos técnicos y contaminación ambiental. Revista Ciencia y Tecnología. Universidad de Palermo 2007.

Junto con la celulosa, es un biopolímero que tiene gran repercusión a nivel mundial debido a que su presencia afecta la obtención de la pasta de celulosa, sustancia fundamental que es requerida para la producción de papel, las aplicaciones industriales de la lignina se ven en campos como la producción de energía, bio-combustibles y químicos.^{1,21,22}.

La pared celular es una estructura presente en todas las células eucariotas de origen vegetal, a diferencia de las células animales las cuales carecen de esta y, en su remplazo, poseen una membrana celular. Su principal función es proveer a la célula de protección, rigidez y soporte, también es la responsable de generar los canales de intercambio de agua, minerales y otras sustancias por medio de las proteínas de transporte que se encuentran en esta²¹. Esta estructura se puede dividir en tres partes las cuales son: laminilla media, pared principal o pared primaria y la pared secundaria^{21,22}.

La laminilla media se encuentra en el espacio intersticial entre las células vegetales, situada en medio de las paredes celulares, funciona como una sustancia de adhesión celular debido a sus altos niveles de compuestos pecticos, los cuales son el resultado de la unión de moléculas de ácido galacturónico, ácido pectico mas iones metálicos como calcio (Ca) y magnesio (Mg)²¹. Esta es más fácil de observar bajo el microscopio cuando el tejido vegetal se encuentra inmaduro, ya que cuando la planta u organismo se encuentra en estado de adultez se vuelve demasiado tenue e imperceptible bajo el lente óptico^{21,22}.

La pared principal o pared primaria se localiza debajo de la laminilla media²¹, está presente en células jóvenes que están finalizando su proceso de división, en lugares que cursen por una etapa de crecimiento del material vegetal²³, compuesta por fibrillas en desorden de celulosa, es decir la unión de las moléculas de celulosa por puentes de hidrogeno, lo cual le confiere una característica flexible a la célula; también por algunos agregados de hemicelulosa, pectinas y algunas glucoproteínas²³. Cuando la célula vegetal ha alcanzado su tamaño y volumen máximo se inicia la formación de la pared secundaria^{21,22,23}, esta posee una concentración de fibrillas de

celulosa dispuestas en orden mayor con respecto a la de la pared primaria ya que es mucho más rígida, pero carece de sustancias pecticas debido a su baja o casi nula flexibilidad²³.

2.2 COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL

La pared celular de las células vegetales se encuentra conformada por una serie de biopolímeros entre los más destacados se hallan la celulosa, hemi-celulosa y la lignina, los cuales están en concentraciones y proporciones diferentes en cada especie herbácea^{1,21,22}; también en la composición de la pared celular es posible distinguir algunos compuestos fenólicos, pecticos, proteicos, carbohidratos entre otros^{1,21,22}. En la actualidad la celulosa y la hemi-celulosa tienen uso en el área de los biocombustibles y la industria papelera, mientras que, la lignina es utilizada para la producción de plásticos y también en menor medida como biocombustible³.

2.3 LA MADERA

La madera es el material encontrado como principal contenido del tronco de una especie vegetal de origen arbóreo²⁴. Este material está compuesto por fibras de celulosa unidas con lignina, debido a que es un material muy resistente la humanidad ha optado por utilizarle como materia prima para el campo de la construcción^{24,25}, Las partes de un tronco son:

- **CORTEZA EXTERIOR:**

Es la primera y principal barrera de protección del árbol, se mantiene en constante reparación y renovación, impide el paso del agua, protege frente a las temperaturas altas o frías. Además de impedir la invasión de bacterias, hongos e insectos al interior del tronco^{24,25}.

- **CORTEZA INTERNA O FLOEMA**

Conjunto de fibras unidas por lignina que producen un sistema de transporte de nutrientes en sentido descendiente hacia las raíces del árbol, una vez las células de la corteza internen envejecen y mueren migran hacia el exterior para hacer parte de la corteza externa^{24,25}

- **CAMBIO**

Es una capa que permanece formada de células inmaduras en constante transformación para hacer parte del xilema o floema^{24,25}.

- **XILEMA**

Células dispuestas en fibrillas que funcionan como tejido vascular de transporte ascendente de savia bruta a las hojas desde las raíces del árbol^{24,25}.

- **ALBURA**

Es la madera de más reciente maduración, a medida que el tronco va creciendo, las células de la albura se dirigen al cambium para sufrir un proceso que las transformara a células pertenecientes al tejido maderable externo^{24,25}.

- **CORAZON O DURAMEN**

Es la madera más dura y sustentadora del árbol, se diferencia de la albura debido a que es más oscura ya que no posee tejido vascular, es el material que se conoce como madera propiamente dicha.

Tabla 1. Composición de la pared celular

Celulosa	~50%	Maderas duras
	~45%	Maderas blandas
Lignina	~25%	Maderas duras
	~21%	Maderas blandas

Hemicelulosas	~35%	Maderas duras
	~25%	Maderas blandas
Otros	~2-8	Maderas duras
		Maderas blandas

Según su dureza las maderas se pueden clasificar en: maderas duras y blandas

- **MADERAS DURAS:**

Procedentes de árboles de lento crecimiento, soportan más peso debido a que son más densas, proceden de especies arbóreas que para su uso deben tener un periodo de crecimiento y maduración de meses hasta incluso décadas^{24,25}.

- **MADERAS BLANDAS:**

Madera proveniente de árboles del orden *Coníferas*, poseen una ventaja sobre y es que el tiempo de crecimiento y maduración es mucho menor al de las maderas duras, además de ser mucho más ligeras y más económicas, aunque su dureza y resistencia es significativamente menor a la de las maderas duras^{24,25}.

2.3.1 PINO *Pinus* sp.

Arboles de follaje persistente con abundante ramificación, su copa se dispone de forma piramidal, con hojas de forma linear, con borre serrado, solitarias, se encuentran insertas en la punta de los brotes cortos, duran en el árbol dos años o más, la semilla es de tamaño variable según su especie. Este género comprende alrededor de 80 especies, se encuentra distribuido por todo el hemisferio norte, por toda Asia, Europa y América del Norte, también se encuentra presente en áreas tropicales con climas lluviosos^{26,27}.

Algunos aspectos de la madera del pino son^{27,28}.

- pH: de 4.0 a 4.4

- Celulosa: 68,1 – 74,7 %
- Lignina: 24 – 28%
- Taninos: 0.07 – 0.12 %
- Cenizas: 3%
- Extraíbles totales: 7.6 – 8.2%

2.3.2 GRANADILLO *Dalbergia granadillo*

Perteneciente a la familia de las leguminosas, estos árboles se encuentran distribuidos en los trópicos de todo el mundo, África, Madagascar, sur de Asia, Centroamérica y Suramérica, son plantas heliófilas, es decir, requieren sol de manera constante para su crecimiento, las flores son pequeñas, miden menos de 2cm de color blanco o amarillo. Actualmente es una madera altamente pedida debido a su exótico color, además de poseer una buena dureza y durabilidad, lo que la convierte en un material bastante costoso, dadas sus propiedades acústicas es utilizada para la fabricación de guitarras, xilófonos, clarinetes, flautas, entre otros²⁹.

En su composición química y molecular se encuentra³⁰:

- Celulosa: 49,2 – 55,25%
- Lignina: 25.24 - 27-24%
- Cenizas: 0.62 – 1.84%

2.3.3 SAJO *Campnosperma panamensis*

Árbol nativo de Colombia, se localiza en los ríos Atrato, Baudò, León, San Juan y Mataje, aunque también está presente en países como Brasil, Costa Rica, Nicaragua, Panamá, Venezuela; esta especie de árbol se desarrolla con facilidad en los bosques húmedos cercanos al nivel del mar. Puede alcanzar una altura de hasta 28 metros, su corteza externa es de color café grisáceo, mientras que la interna tiene una tonalidad rosa³¹.

De los componentes moleculares del sajo resalta una sustancia que es de la familia de los flavonoides, la cual tiene acción antiparasitaria frente a

Plasmodium falciparum, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*².

Las anteriores maderas descritas fueron las variedades vegetales maderables seleccionadas, para extraer por medio del método de la soda caustica 4%, la lignina que es necesaria para la preparación de los medios de cultivo.

2.4 MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE LIGNINA

La lignina puede ser aislada y extraída del material lignocelulósico por distintos métodos que incluyen procesos mecánicos o químicos. Estos métodos según sus productos residuales se pueden clasificar en dos: 1) Aquellos procesos en los que se libera la celulosa y hemi-celulosa mediante solubilización, dejando la lignina como residuo insoluble; 2) Métodos en los que se implica la disolución de la lignina, dejando como residuos insolubles la celulosa y la hemi-celulosa, seguido a esto se procede a recuperar la lignina a partir de la fase líquida (producto de la disolución³).

En la actualidad existen diferentes métodos para la obtención de la lignina como lo son: Lignina tipo Kraft, tipo soda y tipo sulfito, estos son principalmente los más utilizados que corresponden a los desarrollados por la industria papelera para la obtención de la pulpa de celulosa, esto determina el tipo y cantidad de lignina disponible^{2,3}.

2.4.1 LIGNINA TIPO KRAFT

El proceso al sulfato o proceso tipo Kraft para la extracción de lignina, es el proceso más utilizado en la actualidad para la obtención del biopolímero del material lignocelulósico, alrededor del 90-95 % de pastas químicas producidas son por la aplicación de este método^{3,33,34,35}. Consiste en someter el material vegetal maderable o no maderable previamente astillado, en una solución compuesta por hidróxido de sodio y sulfuro de sodio a un pH entre 12-14³⁴, a una temperatura de 170°C durante 0,5 a 2 horas según el protocolo establecido en presencia de 7-10 bar o de 100-145 p.s.i (libra de

presión por pulgada cuadrada)^{33,35}. La principal característica de este tipo de lignina es su alta pureza³, aunque una de las mayores desventajas de este proceso es la poca reutilización de los reactivos y la recuperación de estos en las aguas residuales de estos procesos, generando un gran problema ambiental^{3,34}.

2.4.2 LIGNINA TIPO SODA

Es un método desarrollado en 1853 y fue diseñado para extraer biopolímeros lignocelulosicos de material vegetal no maderable³, las pastas químicas obtenidas en este proceso son utilizadas principalmente para producir papel, este proceso utiliza como reactivo químico principal una solución acuosa de hidróxido de sodio, gracias a que el material no maderable no posee la misma rigidez que los maderables, este método requiere de una menor temperatura, alrededor de 160°C^{3,36}.

2.4.3 LIGNINA TIPO SULFITO

Durante un tiempo este proceso fue el que más se obtenía pasta química para la producción de pape hasta que la extracción por el método de Kraft obtuvo resultados mejores en comparación a los del proceso sulfito³. Se basa en la utilización de disoluciones de bisulfitos, el cual puede ser amónico, anhídrido sulfuroso, cálcico, magnésico o sódico, para la obtención de la pulpa química, el material vegetal sea maderable o no se debe astillar previamente para luego ser puesto en cocción con el bisulfito a 170°C durante 8 a 12 horas^{3,33,34,37}, como resultantes en los residuos hay presencia de compuestos lignosulfonatos, aquellos permiten la creación de papeles especiales como el utilizado en fotografía³³. También posee una gran desventaja debido a que en los residuos hay presencia de azufre y sulfuro los cuales son altamente tóxicos³.

La estructura de la lignina provee a este polímero una cualidad que la hace termo-resistente a temperaturas que pueden superar los 500°C³, el pH es otro factor que altera este biopolímero puesto que en ambientes alcalinos la lignina es insoluble en medios acuosos, mientras que en entornos ácidos,

con pH menor de 5 la lignina se vuelve soluble en el medio, lo cual facilita su recuperación debido a que esta se precipita en la solución en donde esta se encuentra disuelta^{3,4}.

El conocimiento de los anteriores tipos de extracción y recuperación de la lignina del material ligninocelulósico son necesarias para el entendimiento del experimento que se llevara a cabo, en este se desarrollara un medio de cultivo el cual tenga como sustancia de degradación principal la lignina, los microorganismos requieren para su crecimiento una fuente de energía principal, para ello este biopolímero deberá ser extraído y recuperado de manera correcta del material vegetal de origen maderable y no maderable, si este no es extraído y purificado de manera correcta cabe la posibilidad de proporcionar un medio de cultivo que permita el desarrollo de microorganismos capaces de degradar otras sustancias presentes en la pared vegetal, como por ejemplo la celulosa.

2.5 MEDIOS DE CULTIVO

Para poder estudiar a un microorganismo se requiere un ambiente o sustrato que contenga todos los requerimientos nutricionales necesarios para su supervivencia, desarrollo y reproducción. Estos nutrientes que en su mayoría son aminoácidos, carbohidratos, proteínas, sales, entre otros, son agregados en una matriz líquida o semi-sólida la cual será posteriormente esterilizada y vertida en un contenedor en donde se intentara “cultivar” al microorganismo en cuestión^{38,39}. Esto aplica para microorganismos que no requieran de la maquinaria celular para su supervivencia, debido a que existen microbios que para su desarrollo necesitan de los orgánulos presentes en las células eucariotas o procariontes de las cuales aprovecharan dicho funcionamiento, como por ejemplo los virus o algunos hemo-parasitos^{12,38}.

Existen diferentes criterios de clasificación del medio de cultivo, dependiendo del microorganismo que se quiera aislar, el uso que se le dar al sustrato, su consistencia, origen, etc^{12,38,39}.

Según su consistencia, se clasifican en medios sólidos, líquidos y semisólidos; Los sólidos, son aquellos que poseen un alto porcentaje de un agente solidificante el cual es el agar, utilizados para el estudio y obtención de bacterias y hongos en formas de colonias sobre la superficie gelificada^{38,39}. Algunos ejemplos de estos medios de cultivo son: agar PDA, agar Saboureaud, agar nutritivo, agar BHI, entre otros.

Los líquidos, como su nombre lo indica se encuentran en estado líquido por lo cual son conocidos principalmente como caldos de cultivo, cumplen una función de enriquecimiento para favorecer el desarrollo de células estresadas. Entre los caldos de cultivo más conocidos se encuentran el caldo nutritivo, caldo cerebro corazón (BHI), caldo SMRS, caldo saboureaud, etc^{12,39}.

Los semisólidos, se diferencian de los medios solidos porque contienen un menor porcentaje y concentración de sustancia solidificante, es decir, de agar. Son utilizados principalmente para el estudio de la motilidad en microorganismo de naturaleza bacteriana como por ejemplo el agar motilidad o el agar MIO (Motilidad, INDOL, Ornitina)^{12,39}.

Según su origen, los medios pueden ser: naturales y sintéticos. En el grupo de los medios naturales se encuentran aquellos que, su composición está dada en su mayor parte por extractos o infusiones de material de origen animal o vegetal, se desconoce del todo de su composición química total y no posee ningún otro tipo de sustancias químicas, como por ejemplo el agar PDA el cual es elaborado a partir de puré de papa, dextrosa y el agente gelificante que es agar-agar^{12,38}.

Los medios sintéticos son diseñados casi en su totalidad por sustancias químicas que suplirán las demandas de carbono, nutrientes, sales y demás elementos requeridos por el microorganismo para desarrollar sus funciones metabólicas de supervivencia, existe un gran abanico de estos medios ya que pueden ser modificados agregando, eliminando o sustituyendo algún componente del medio, agar McConkey, King B, YDC, rosa de bengala,

TCBS, ENDO, TSI, entre muchos otros sustratos que componen el conjunto de los medios sintéticos^{12,38,39}.

Según su propósito o uso, los medios pueden ser comunes o corrientes, de enriquecimiento y selectivos.

El medio común, es el utilizado para proporcionar los nutrientes mínimos necesarios para la multiplicación de microorganismos en una muestra, no posee ningún tipo de agente inhibidor de crecimiento de otros microorganismos o flora microbiana, tampoco posee nutrientes especiales, de manera que agentes microbianos que sean exigentes no podrán crecer en estos medios, en este grupo de medios encontramos el caldo nutritivo, agua peptonada, agar nutritivo, agar medio mínimo de sales y caldo medio mínimo de sales^{12,38,40}.

Los de enriquecimiento aunque similares a los medios corrientes, se diferencian porque se les agregan sustancias especiales con un alto nivel nutricional para microorganismos que sean exigentes, también el pH del medio puede ser alterado para favorecer el crecimiento de microorganismos que requieran de un pH específico para su crecimiento, medios como agar sangre, agar infusión cerebro corazón, entre otros, son los pertenecientes al conjunto de los medios enriquecidos^{12,38,39}.

Los selectivos se caracterizan porque poseen sustancias que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos e inhibe el crecimiento de otros mediante el uso de compuestos de origen químico tales como antibióticos, antimicóticos, sales biliares, sustancias que acidifiquen o alcalinicen el sustrato, medios como por ejemplo el McConkey, salado de manitol, NaCl 7,5 %, agar TCBS, entre otros^{12,14,38}.

2.6 MEDIOS DE CULTIVO CON LIGNINA DISEÑADOS A PARTIR DE MODIFICACIONES

2.6.1 AGAR LIGNINA THORN *et al* 1996

Uno de los primeros medios de cultivo que se generó para propiciar un buen crecimiento de biomasa microbiana capaz de degradar la lignina fue en 1996 gracias a un estudio realizado por Thorn *et al*, en el que, se tomaron 64 muestras de suelo las cuales fueron cultivadas en placas de agar solido compuesto de varias sales esenciales como: Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4), nitrato de amonio (NH_4NO_3), cloruro de potasio (KCl), sulfato de hierro (FeSO_4), nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y suplementado con lignina alcalina, esto generaba una selectividad la cual permitía únicamente el crecimiento de microorganismos que fueran capaces de obtener energía a partir de este biopolímero tan grande, además agrego también benomilo, un fungicida capaz de inhibir el crecimiento micotico en especial de los *Ascomycetes* sp., los microorganismos que lograron ser aislados pertenecen al grupo de *Basidiomycetes* sp., especies tales como *Clitopilus* sp., *Coprinus* sp., *Irpex* sp., *Ceratobasidium* sp., *Armillaria* sp., entre otros¹².

2.6.2 MEDIO MÍNIMO DE SALES CON LIGNINA (ABHAY *et al* 2007)

En el 2007, Abhay Raj *et al* logro realizar el aislamiento de ocho (8) cepas bacterianas capaces de crecer en Medio Mínimo de Sales (MSM) el cual contenía lignina de Kraft, se aisló una bacteria que posteriormente se identificaría mediante pruebas bioquímicas y biología molecular dando un 95% de compatibilidad con el género *Bacillus* sp., además mediante la observación de la degradación del colorante en el medio se pudo apreciar la producción de enzimas con capacidad ligninolítica, esto se confirmó gracias al uso de cromatografía de gases para observar los componentes químicos de los residuos presentes en el medio¹⁵.

2.6.3 MEDIO CZAPECK

Medio utilizado para la recuperación de hongos filamentosos, apropiado para la caracterización de su capacidad lignocelulosica, este sustrato de cultivo está compuesto de varias sales esenciales como nitrato de sodio (NaNO_3) 3.0 g/L, fosfato dipotasico (K_2HPO_4) 1g/L, sulfato de magnesio (MgSO_4) 0.5

g/L, cloruro de potasio (KCl) 0.5 g/L y sulfato ferroso (FeSO₄) 0.01 g/L, se diferencia del agar lignina alcalina debido a que este agrega sacarosa o glucosa como fuente de energía, junto con 1% de lignina alcalina^{14,18}.

2.6.4 MEDIO MADERA ABEDUL Y MEDIO SALVADO DE TRIGO (Tha Swe K. 2011)

Con el fin de favorecer la producción enzimática de lignino peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas, Tha Swe K. en su investigación agrego un extracto de madera de abedul y salvado de trigo a los medios de cultivo, obteniendo crecimiento de microorganismos tanto de origen bacteriano como fúngico con capacidad ligninolítica⁴.

2.6.5 AGAR EXTRACTO DE ASERRÍN (BUITRAGO S. *et al.* 2014)

Similar al medio suplementado con extractos de abedul y salvado de trigo, Buitrago S. *et al.*, uso un extracto de aserrín para enriquecer el medio de cultivo y proveer una selectividad al medio, de tal manera que solo aquellos microorganismos capaces de crecer utilizando las sustancias presentes en el aserrín es decir celulosas, hemi-celulosas y ligninas pueda crecer en este medio de cultivo⁴¹.

2.7 BACTERIAS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA

2.7.1 *Serratia marcescens*

Bacteria de morfología bacilar de afinidad Gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* la cual puede encontrarse en la flora intestinal del ser humano, también en otros animales⁴², además también se puede encontrar en cañerías y lugares donde las condiciones sanitarias son bastante precarias, en insumos hospitalarios puede estar esta bacteria, su contagio es principalmente de modo nosocomial^{42.43.44}.

Es un bacilo que posee la enzima lisina y ornitina descarboxilasa, es capaz de utilizar el citrato como fuente de energía, tiene la facultad de fermentar el sorbitol, la lactosa y la glucosa productor de CO₂ y móvil, posee sensibilidad a antibióticos como imipenem, ofloxacina, trimetropim/sulfametoxazol,

ciprofloxacina, mientras que tiene resistencia a cefalotina, cefuroxima, ampicilina, ampicilina/sulbactam⁴⁴.

2.7.2 *Bacillus subtilis*

Esta bacteria perteneciente al género *Bacillus* sp., es una de las más representativas de dicho género, tiene una morfología bacilar, al microscopio se observan unos largos bacilos que tienen afinidad Gram positiva, es productor de endosporas las cuales son termorresistentes, su desarrollo en agar sangre muestra unas colonias grandes, blanquecinas, de bordes irregulares, presenta β -hemólisis, es utilizado en el campo de la microbiología ambiental debido a que cumple un rol de bio-controlador en suelos con cultivos que sean propensos a enfermarse por *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., nematodos como los pertenecientes al género *Meloidogyne* sp., entre otros^{45,46,47}.

Son bacterias capaces de producir la enzima catalasa, móviles gracias a flagelos en disposición peritrica, capaces de hidrolizar la gelatina y el almidón, puede utilizar el citrato como fuente de energía, resiste altas concentraciones de salinidad, puede reducir el nitrato a nitritos y tiene la facultad de crecer en ambientes de hasta 65°C^{45,46,47,48}.

Estas bacterias anteriormente nombradas: *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*, fueron las seleccionadas para testear la capacidad del medio de cultivo de proporcionar un ambiente ideal que permita la producción de enzimas ligninolíticas de origen bacteriano.

2.7.3 OTRAS BACTERIAS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA

En la literatura se han descrito varias especies y géneros de bacterias involucradas en los procesos de degradación de la lignina, a continuación se describirán algunas características morfológicas, utilidades en el área ambiental, entre otras cualidades de dichos microorganismos

Tabla 2. Aspectos generales de los principales microorganismos de origen bacteriano con la capacidad ligninolítica

GENERO ESPECIE BACTERIANA	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y TINCION DE GRAM	IDENTIFICACION BIOQUIMICA	UTILIDAD EN EL CAMPO AMBIENTAL	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
Bacterias del genero <i>Bacillus</i> sp.	Bacilos de gran tamaño bajo el microscopio, capaces de generar esporas y con afinidad Gram positiva ^{19,49} .	Aerobios estrictos o anaerobios facultativos. Se desarrolla con facilidad en pH de 7.0 – 7.4 Poseen la enzima catalasa, gelatinasa, almidonasa. Capaces de utilizar el citrato y de reducir el nitrato a nitrito, además de poder desarrollarse en medios con concentración de NaCl de 7.0% ^{19,49} .	Poseen una gran capacidad enzimática para degradar la lignina	Abhay Raj <i>et al.</i> , en el año 2007 logro aislar un microorganismo de origen bacteriano capaz de degradar la lignina, el cual fue posteriormente clasificado taxonómicamente en el género <i>Bacillus</i> sp ¹⁴ . Abdul Rahman N. <i>et al.</i> También aisló del suelo de cultivo de palma de cera tres microorganismos capaces de degradar la lignina, identificados después como <i>Bacillus</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp. y <i>Leucobacter</i> sp ¹⁹ .
Bacterias del genero <i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilos cortos, móviles, no esporulan y son de afinidad Gram negativa ^{7,50} .	Aerobios estrictos o anaerobios facultativos. Oxidasa negativa. No fermentan la lactosa ni la glucosa. Fermentan el manitol, sorbitol y la sacarosa. Algunas especies son capaces de producir	Poseen un arsenal enzimático capaz de degradar un gran abanico de sustancias organicas ^{7,50} .	Buitrago S. <i>et al.</i> , aislaron de muestras provenientes de humedales de la ciudad de Bogotá en el año 2014, bacterias con potencial celulolítico y ligninolítico, identificados posteriormente como <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp ⁴ . Otro estudio fue llevado a cabo por Sasikumar V. <i>et al.</i> ,

		pigmentos fluorescentes que se pueden apreciar bajo la luz UV		realizando una modificación del medio mínimo de sales (MSM) aisló una bacteria del genero <i>Pseudomonas</i> sp., capaz de degradar la lignina presente en el medio modificado ⁷ .
Bacterias del genero <i>Ochrobactrum</i> sp.	Bacilos cortos, móviles, afinidad Gram negativa ⁵¹ .	Oxidasa positiva. No son microorganismos fermentadores. Capaces de producir ureasas ⁵¹ .	Bacterias con potencial ligninolítico.	Como se mencionó anteriormente en un estudio realizado en el 2007 por Abdul Rahman N. et al., se aislaron tres (3) microorganismos que posteriormente serian identificados mediante biología molecular como pertenecientes a los géneros <i>Bacillus</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., y <i>Leucobacter</i> sp, capaces de degradar la lignina y utilizarla como fuente principal de carbono ¹⁹ .
Bacterias del genero <i>Leucobacter</i> sp.	Bacilos no móviles, incapaces de producir esporas. Posee afinidad Gram positiva ^{51,52} .	Bacilo fermentador de glucosa. Puede desarrollarse en un amplio rango de pH desde 5.0-10.0 y también en concentraciones de NaCl de 0-8.0%. Similar a <i>Staphylococcus aureus</i> puede	Posee la capacidad de degradar la lignina y de reducir el cromo, posicionándolo como un género bacteriano de gran importancia en la biorremediación	El estudio realizado por Abdul Rahman N. et al. ¹⁹ en donde se recuperó una bacteria perteneciente a este género con capacidad ligninolítica.

		producir bio-film	de ambientes contaminados con metales ^{50,52} .	
--	--	-------------------	--	--

Los anteriores son algunos de los microorganismos ligninolíticos de origen bacteriano más reconocidos, aunque también se han descrito con dicha capacidad enzimática bacterias del género *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., y *Flavobacterium* sp, así como microorganismos en específico tales como *Corynebacterium jeikeium* y *Sphigomonas paucimobilis*²⁰.

2.8 HONGOS CON CAPACIDAD LIGINOLITICA

2.8.1 *Penicillium commune*

Hongo filamentoso perteneciente al género *Penicillium* sp., estos se encuentran dispersos a nivel mundial en diferentes sustratos, granos, cueros, frutas, entre otros sustratos. Se desarrolla con facilidad en temperaturas de 20-30°C, puede crecer en un amplio espectro de pH que va desde entornos ácidos de 3.5 hasta una alcalinidad de 10.0, este hongo se observa bajo el microscopio como hialino, septado, forma conidios en una estructura ramificada que sale de unas células conocidas como fialides, estas ramificaciones se ubican formando verticilos. Macroscópicamente desarrolla una colonia de color blanco con tonos verdes o azulados en el centro y la periferia, textura es plana, filamentosa, algodonosa, puede presentar gotas de exudado^{53,54,55}.

Es de los principales causantes de la alergia por moho en edificios, se han reportado cepas nefrotoxicas y carcinogénicas, debido a que son productores de varias toxinas como: ocratoxina A, patulina, citrinina, ácido penicílico^{54,55}.

2.8.2 *Paecilomyces formosus*

Perteneciente al filo *Ascomycota* son hongos que se encuentran dispersos a nivel mundial en los suelos de diferentes regiones, tiene colonias de rápido

crecimiento y su temperatura optima de crecimiento es de 25°C, la colonia es de tonos cafés con bordes blancos, reverso café, bajo el microscopio se observa que es un hongo hialino septado que se asemeja morfológicamente a *Penicillium* spp., presenta conidióforos ramificados , fialides un poco más largas que las de *Penicillium* spp., clamidiosporas abundantes^{56,57,58}. Se ha reportado también que posee actividad nematicida frente a diferentes especies de larvas parasitarias⁵⁷.

2.8.3 *Pleurotus fossulatus*

Esta especie es perteneciente al grupo de las setas hongos provenientes de la división *Basidiomycota*, se producen a partir de basidiosporas las cuales se producen de manera exógena por medio de un órgano denominado basidio, son hongos comestibles, aportan una importante cantidad de nutrientes al cuerpo^{59,60}.

Su crecimiento es más lento en comparación al de los hongos pertenecientes a la división *Ascomycota* puesto que son hongos más grandes que, para producir todo ese tejido micotico, demoran una mayor cantidad de tiempo^{59,60}.

La morfología de estos hongos es como una seta que crece lateralmente del tronco de un árbol, o pueden crecer a partir de sustratos descompuestos en el suelo, su cutícula y estipe son de color blanco con brizos cafés, pueden observarte ciertos tonos beige las lamélulas de igual modo son de color blanco con tonos beige. *In vitro* inicia su crecimiento como una colonia bastante filamentosa de aspecto algodonoso de color blanca, en el microscopio se observan las basidiosporas además de una gran cantidad de micelio hialino^{59,60,61}.

2.8.4 OTROS HONGOS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA

Así como se han descrito bacterias con capacidad ligninolítica, también se han identificado gran cantidad de agentes micoticos con la cualidad de

degradar la lignina y utilizarla como fuente de energía, a continuación se nombrarán y describirán algunas características de dichos hongos.

Tabla 3. Aspectos generales de los hongos con cualidades ligninolíticas

HONGO	CLASIFICACION TAXONOMICA	UTILIDAD AMBIENTAL	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Polyporus versicolor</i>	Reino: <i>Fungi</i> División: <i>Basidiomycota</i> Orden: <i>Polyporales</i> Familia: <i>Polyporaceae</i> Género: <i>Trametes</i> Especie: <i>P. versicolor</i>	Conocido como el hongo de la pudrición de la madera, posee un arsenal enzimático capaz de degradar no solo la lignina sino también la celulosa presente en la corteza de plantas maderables ¹³ .	Estudios realizados por Arora D. y Sandhu D. en 1985 demostraron la capacidad ligninolítica del hongo <i>Polyporus versicolor</i> , gracias a la utilización del guaiacol como agente revelador de la producción de enzimas degradadoras de lignina ¹³ .
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Reino: <i>Fungi</i> División: <i>Basidiomycota</i> Orden: <i>Agaricales</i> Familia: <i>Pleurotaceae</i> Género: <i>Pleurotus</i> Especie: <i>P. ostreatus</i>	Este hongo es reconocido a nivel mundial como la gírgola o champiñón ostra, hace parte de las setas comestibles, tiene gran importancia en el área de la gastronomía. Crece en material vegetal con corteza maderable, lo cual infiere que es capaz de degradar la celulosa y la lignina para usarlas como fuente de energía ¹⁶ .	Saenz M. presento en 2009 un sustrato para el desarrollo, identificación y análisis de microorganismos con capacidad ligninolítica, realizando una modificación al MSM agregándole tamo de arroz como sustrato rico en lignocelulosas, utilizando como control positivo el hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , reconocido por su capacidad de degradar este polímero ¹⁶ .
Hongos del genero	Reino: <i>Fungi</i>	Es reconocido como	En el trabajo de grado presentado

<i>Phanerochaete</i> sp.	División: <i>Basidiomycota</i> Orden: <i>Polyporales</i> Familia: <i>Phanerochaetaceae</i> Género: <i>Phanerochaete</i>	el hongo de la pudrición blanca de la madera, se le atribuye la cualidad de ser degradador de polímeros lignocelulosicos presentes en material vegetal maderable.	por Arias E. y Piñeros P en 2008, gracias al medio de cultivo Czapeck, logró aislar varias cepas de agentes fúngicos ligninolíticos, entre los cuales estaba presente <i>Phanerochaete</i> sp ¹⁵ . Sasikumar V. <i>et al.</i> , aisló un hongo que demostró actividad enzimática degradadora de ligninas, gracias a la acción reveladora del azul de metileno que se oxido por la producción de enzimas ligninolíticas. Mediante pruebas moleculares se identificó el hongo como perteneciente al género <i>Phanerochaete</i> sp ⁷ .
Hongos del genero <i>Alternaria</i> sp.	Reino: <i>Fungi</i> Filo: <i>Ascomycota</i> Clase: <i>Dothideomycetes</i> Orden: <i>Pleosporales</i> Familia: <i>Pleosporaceae</i> Género: <i>Alternaria</i>	Hongo microscópico distribuido ampliamente a nivel mundial, se ha analizado su capacidad para degradar componentes de la pared celular de material vegetal de tipo maderable y no maderable.	Arias E. y Piñeros P aislaron <i>Alternaria</i> sp., utilizando el medio czapeck ¹⁵ . Laura J. y Castellanos P. en 2009 obtuvieron muestras de paja silvestre en las que lograron recuperar un varios hongos productores de enzimas ligninolíticas, entre los hongos aislados se encuentra <i>Alternaria</i> sp ¹⁴ .

Existen varios hongos capaces de degradar el biopolímero lignocelulosico, los anteriores son algunos de los más destacados, sin embargo hay varios que pertenecen a la división de los *Basidiomycetes* como por ejemplo *Clitopilus* sp., *Coprinus* sp., *Irpex* sp., *Ceratobasidium* sp., y *Armillaria* sp., entre otros; claro está que no solamente son hongos macroscópicos los involucrados en este proceso de degradación, también se encuentran algunos géneros de hongos microscópicos tales como: *Aspergillus* sp.,

Byssochlamys sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Emericella* sp., y *Mucor* sp., etc^{13,15,17}.

2.9 ENZIMAS MICROBIANAS DE FACULTAD LIGNINOLITICA

Puesto que las ligninas no son moléculas fáciles de degradar ya que poseen una capacidad de enlace muy aleatoria^{1,3}, no todos los microorganismos pueden hacer uso de este biopolímero como fuente de carbono. Esto hace que el grupo de microorganismos con la facultad de degradar esta molécula sea más reducido, dicho grupo está conformado por bacterias y hongos de distintos géneros microbianos, dichos microorganismos utilizan su herramienta celular para producir enzimas que pueden trabajar solas o en conjunto para romper y degradar la estructura de la lignina, con el fin de transformarla en compuestos menos complejos, pequeños y fáciles de degradar hasta poder mineralizar el biopolímero⁵.

2.9.1 LACASAS

También conocidas como fenol oxidasas⁵, son enzimas que catalizan reacciones oxidativas en los radicales fenólicos y aminas aromáticas de la estructura de la lignina, utilizando el oxígeno como aceptor de electrones, reduciendo estos compuestos a agua, además de producir especies reactivas de oxígeno H_2O_2 , OH^- y O_2^- .^{5,63,64,65}

Se ha demostrado que pueden funcionar en un amplio rango de pH que va desde 2.0 – 8,5, esta enzima puede actuar por sí sola, sin tener que funcionar en conjunto con el resto de enzimas ligninolíticas, su uso está incursionando el campo de la biorremediación puesto que es capaz de degradar diferentes tipos de contaminantes ambientales como: residuos del blanqueo de la pulpa de papel, colorantes textiles, plaguicidas organofosforados, entre otros^{5,63,64,65}.

2.9.2 LIGNINO PEROXIDASA

Es una enzima involucrada en el proceso de degradación y mineralización de la lignina, fue descubierta en 1983 en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Esta enzima cataliza la despolimerización oxidativa de la

lignina, esta reacción es dependiente de la presencia de peróxido de hidrogeno en el sustrato, Es bastante inespecífica, por lo que puede oxidar una gran cantidad de compuestos fenólicos y aromáticos mientras se mantenga en presencia de H₂O₂^{5,66,67}.

2.9.3 MANGANESO PEROXIDASA

Las enzimas manganeso peroxidasa cumplen la función de oxidar el Mn²⁺ a Mn³⁺ debido a que en este estado, el manganeso es una especie reactiva capaz de oxidar una gran variedad de compuestos fenólicos aunque frente a los no fenólicos no tiene mucha utilidad, cabe resaltar que esta reacción depende de la presencia de peróxido de hidrogeno en el sustrato, altas concentraciones de manganeso inhiben a la enzima, su pH ideal es ácido 4,5 aunque puede llegar a ser funcional hasta 7.0 en medios más alcalinos la enzima se vuelve bastante inestable, de las tres enzimas presentes en el proceso de degradación de la lignina, esta es la que menos actividad demuestra, siempre actúa en conjunto con la lignina peroxidasa o también conocida como ligninasa^{5,66,67,68,69}.

3. DISEÑO METODOLOGICO

TIPO DE INVESTIGACION

Este proyecto corresponde a una investigación de tipo cuantitativo basada en un diseño descriptivo experimental.

- **Cuantitativo:** Debido a que se busca desarrollar un medio de cultivo a partir de material biológico vegetal que permita el crecimiento de microorganismos que utilicen la lignina como fuente de carbono y energía, por medio de diferentes ensayos con biopolímeros provenientes de diferentes especies de árboles maderables.
- **Descriptivo:** Se realiza un análisis de manera continua para interpretar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos basándose en algunas herramientas estadísticas.
- **Experimental:** En el desarrollo de la investigación se tendrán en cuenta más de una variable, todas serán estudiadas y controladas de modo simultaneo, con el fin de analizar cuál de los diferentes experimentos llevado a cabo con los diferentes tipos de madera usados en el ensayo provee los mejores resultados que demuestren un mejor crecimiento y desarrollo de los microorganismos considerados potencialmente ligninolíticos.

3.1. UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

- **Universo:** Material biológico de origen vegetal con alto contenido de lignina para desarrollar un medio de cultivo que permita el crecimiento de microorganismos con potencial ligninolítico.
- **Población:** Aserrín de variedades maderables con alto contenido de lignina para desarrollar un medio de cultivo que permita el crecimiento de microorganismos con potencial ligninolítico.

- **Muestra:** Pino, granadillo y sajo con alto contenido de lignina para desarrollar un medio de cultivo que permita el crecimiento de microorganismos con potencial ligninolítico.

3.2. HIPÓTESIS, VARIABLES E INDICADORES

HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un medio de cultivo a partir de componentes naturales ricos en lignina, utilizando aserrín de tres variedades vegetales maderables, con el fin de tener un sustrato con un contenido significativo de lignina, que permita a los microorganismos tanto de origen bacteriano como también fúngico, la utilización de enzimas degradadoras.

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 4. Variables e indicadores de la fase experimental.

NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCIÓN DE LA VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD DE MEDICIÓN
Componentes nutricionales del medio de cultivo	Dependiente	Existe un gran abanico de sales minerales que pueden ser agregadas a los sustratos de cultivo con el ánimo de proporcionar al microorganismo las sustancias esenciales para su supervivencia, seleccionando dichos minerales y sus concentraciones se pueden alterar la capacidad del medio de cultivo.	Cantidad y concentraciones de los componentes nutricionales	g/L
Temperatura de incubación	Dependiente	La temperatura influye en el crecimiento tanto de bacterias como también de los	Grados Celsius a los que será incubado el medio de	25-35°C

		hongos, es importante controlar dicho parámetro para beneficiar al microorganismo que se pretenda cultivar	cultivo.	
Concentración y cantidad de lignina	Independiente	Las maderas, poseen en su pared celular, diferentes cantidades y concentraciones de lignina, por lo cual es necesario realizar más de 1 ensayo con diferentes maderas para analizar cual sirve mejor como sustrato de cultivo.	Porcentaje de lignina que hace parte de la pared celular del material vegetal maderable.	Porcentaje (%)
Capacidad Ligninolítica de los microorganismos	Independiente	Crecimiento de microorganismos con capacidad ligninolítica, que puedan utilizar la lignina extraída de las diferentes maderas como fuente de energía para su desarrollo.	Desarrollo de colonias microbianas de origen bacteriano o fúngico capaces de utilizar la lignina como fuente de energía	Crecimiento de UFC de bacterias y hongos.
Tipo de maderable a utilizar	Dependiente	Se utilizaron 3 tipos de maderas diferentes ya astilladas, las cuales son pino, granadillo y sajo, para observar y analizar cual sirve mejor como sustrato de crecimiento para el medio de cultivo.	Maderas aserradas utilizadas para la preparación del medio de cultivo: pino, granadillo y sajo.	Lignina 1 (Pino) Lignina 2 (Granadillo) Lignina 3 (Sajo)
Crecimiento microbiano	Independiente	Se evaluará la viabilidad del medio, gracias a la capacidad de este de permitir el crecimiento de cepas ligninolíticas.	Capacidad del microorganismo de desarrollarse adecuadamente en el medio de cultivo.	Cantidad de colonias microbianas.

3.3 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

FASE 1: Determinación de los componentes y preparación del medio

Con base a la literatura recolectada, se establecieron los principales componentes nutricionales del medio, en cuanto a sales, minerales y demás sustancias necesarias para el desarrollo microbiano, se tomó como referencia las cantidades y componentes usados en el experimento llevado a cabo por Sasikumar V.⁷ además, también se identificaron cuál o cuáles serían los materiales vegetales de los cuales se obtuvo la lignina.

- Material vegetal

Se seleccionaron tres (3) variedades de material vegetal maderable: pino, granadillo y sajo, dichas muestras ya estaban aserradas.



Figura 2. Muestras de maderables para la fase experimental **A)** Aserrin proveniente de Pino; **B)** Aserrin de Granadillo; **C)** Aserrin de Sajó

- Componentes nutricionales

Se estableció que las sales minerales que se le agregaron al medio fueron $MgSO_4$, KCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4NO_3 y $FeSO_4(7H_2O)$



Figura 3. Componentes nutricionales del medio de cultivo

- Cantidad de los componentes nutricionales

Tabla 5. Cantidad de los componentes nutricionales del medio de cultivo

SAL MINERAL	CANTIDAD
MgSO ₄	0,5 g/L
KCl	0.5 g/L
K ₂ HPO ₄	4,55 g/L
KH ₂ PO ₄	0.53 g/L
NH ₄ NO ₃	5 g/L
FeSO ₄ (7H ₂ O)	0.005 g/L

Los anteriores componentes y sus respectivas cantidades mencionados en la tabla 5, fueron los utilizados en experimentos realizados por Sasikumar V, en el cual se realiza una modificación de un medio mínimo de sales (MSM) agregando lignina al medio descrito⁷.

- Agentes inhibidores

No se utilizaron agentes inhibidores con la intención disminuir el estrés producido al microorganismo, esto con el fin de obtener un crecimiento de biomasa ligninolítica mayor.

- Extracción de la lignina

Por medio del proceso de extracción de la lignina tipo soda, se puso en cocción 100g de aserrín con 150 mL de Soda caustica 4% durante 45 minutos en producción de vapores constante (Figura 4 A,B,C y D), finalmente el producto residual de este proceso fue filtrado gracias al uso de un embudo y papel filtro, se logró recuperar aproximadamente 5 mL de líquido rico en lignina de los 3 diferentes variedades de madera, conocidos como: Lignina 1 la proveniente del aserrín de pino, Lignina 2 obtenida a partir del aserrín de granadillo y finalmente la Lignina 3 que fue extraída del aserrín de sajo.



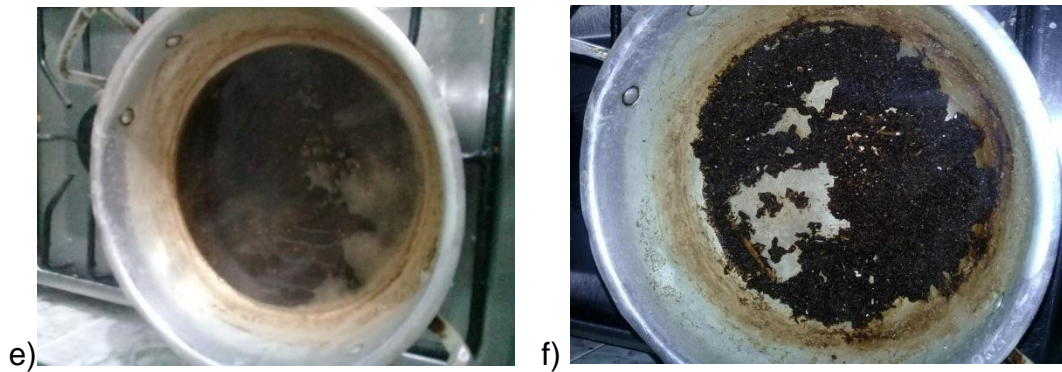


Figura 4. Cocción del aserrín en soda caustica 4%: **A)** Aserrín de pino; **B)** Cocción de aserrín de pino con Soda caustica 4%; **C)** Aserrín de granadillo; **D)** Cocción de aserrín de granadillo **E)** y **F)** Cocción de aserrín de sajo

Las ligninas extraídas fueron conservadas en frascos color ámbar en refrigeración como se puede apreciar en la Figura 5.



Figura 5. Ligninas extraídas de los tres diferentes tipos de material vegetal

- Preparación del medio

Se preparó 600 mL del medio agregando las cantidades establecidas de las sales minerales, seguido a esto se separó en tres fiolas con 200 mL cada una, 2mL de las ligninas extraídas se adicionaron en cada fiola, posteriormente las fiolas fueron cubiertas en su abertura con papel aluminio para ser autoclavadas.

Después del proceso de autoclavado para esterilizar el medio de cultivo, se sirvió cada medio en cajas de Petri, se obtuvieron 16 cajas de Agar Lignina 1 (Pino), 16 cajas de Agar Lignina 2 (Granadillo) y 16 cajas de Agar Lignina 3 (Sajo), se dejó reposar hasta que el medio estuviera totalmente gelificado, finalmente los medios fueron guardados en refrigeración durante 24 horas.

□ Prueba de esterilidad

Después de preparar los medios y de que estos gelificaran se escogió un ejemplar de cada ensayo para incubarlos a 37°C con el fin de visualizar si crecía flora contaminante sobre la superficie del sustrato de cultivo.

FASE 2: Verificación de la capacidad del medio para el crecimiento de microorganismos ligninolíticos

- Selección de cepas para testear el medio de cultivo

Luego de dejar reposar el medio de cultivo preparado en la nevera durante 24 horas se procedió a realizar la siembra de los microorganismos que fueron escogidos para demostrar la funcionalidad y viabilidad del sustrato de cultivo, se seleccionaron cepas de origen bacteriano y fúngico provenientes del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, dichas cepas fueron reconocidas como productoras de enzimas ligninolíticas en anteriores estudios realizados, las cepas seleccionadas fueron: *Bacillus subtilis* (Identificado en el cepario como TB2) ver Figura 7, *Serratia marcescens* ver Figura 6, *Pleurotus fossulatus* ver Figura 8, *Penicillium commune* ver Figura 9 y *Paecilomyces formosus* ver Figura 10. Todas las cepas anteriormente nombradas fueron tipificadas por métodos moleculares en estudios previos realizados para el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Ver Anexo 1.

Para verificar los resultados se utilizaron cepas de microorganismos que funcionarían como control positivo y negativo, en el caso del control positivo los microorganismos seleccionados fueron: *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*

sp. Ver figura 11, mientras que las cepas de control negativo fueron: *Listeria innocua* Ver figura 12 y *Enterococcus faecalis* Ver figura 13.



Figura 6. Cepa de *Serratia marcescens*.



Figura 7. Cepa de *Bacillus subtilis* (TB2).

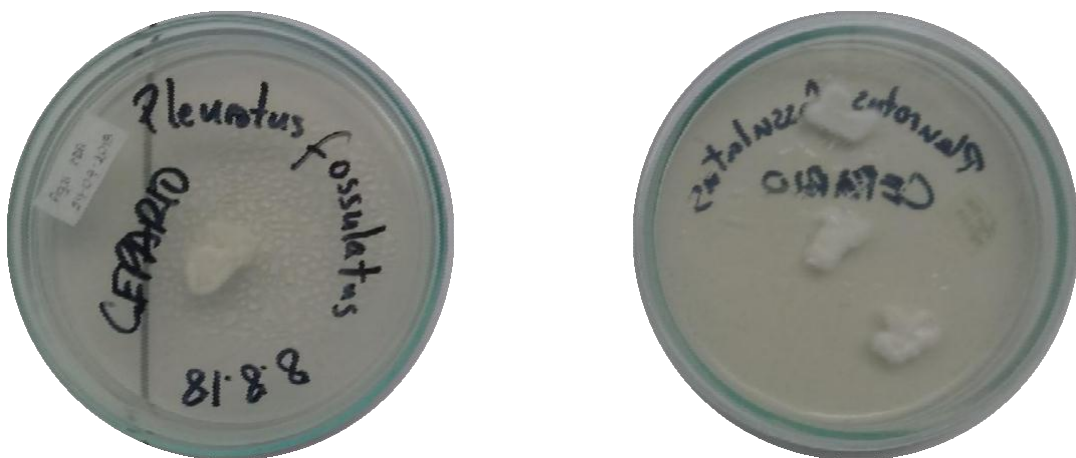


Figura 8. Cepa de *Pleurotus fossulatus*.

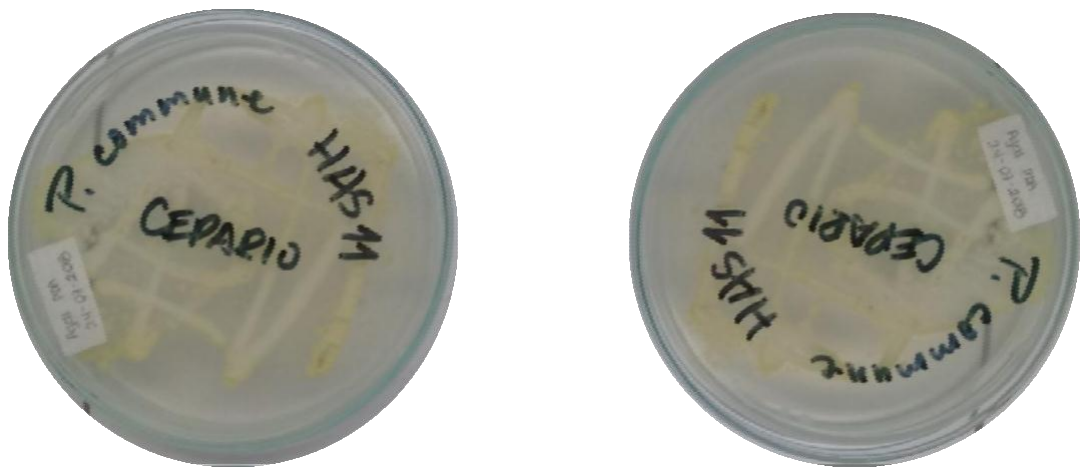


Figura 9. Cepa de *Penicillium commune*.

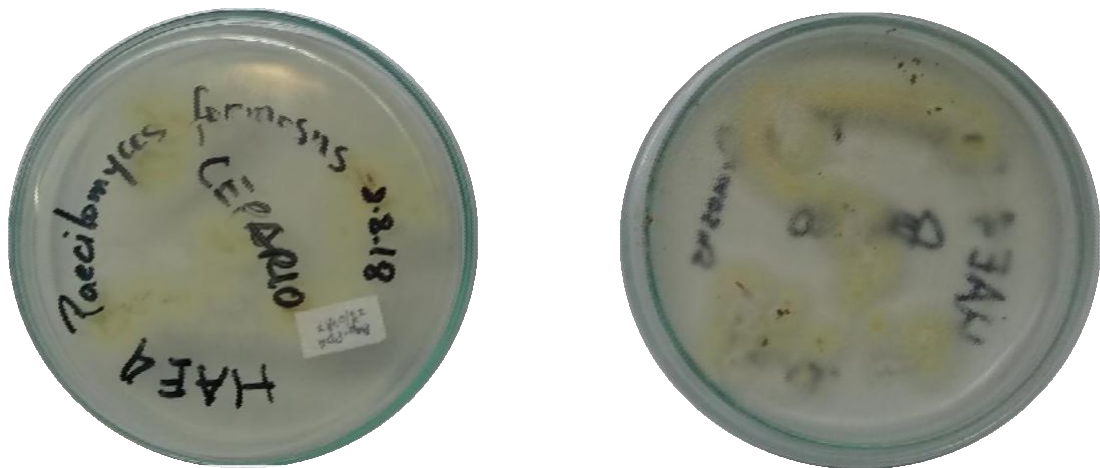


Figura 10. Cepa de *Paecilomyces formosus*.

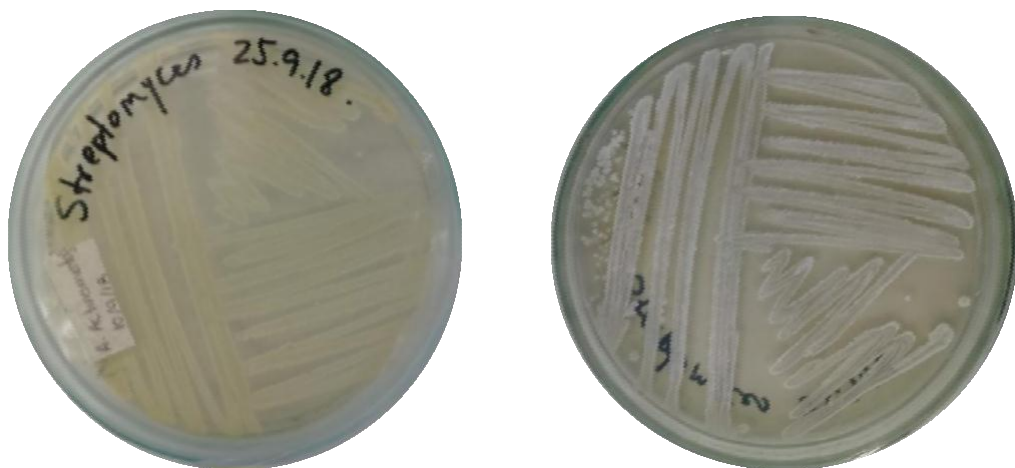


Figura 11. Cepa de *Streptomyces* sp.



Figura 12. Cepa de *Listeria innocua*.

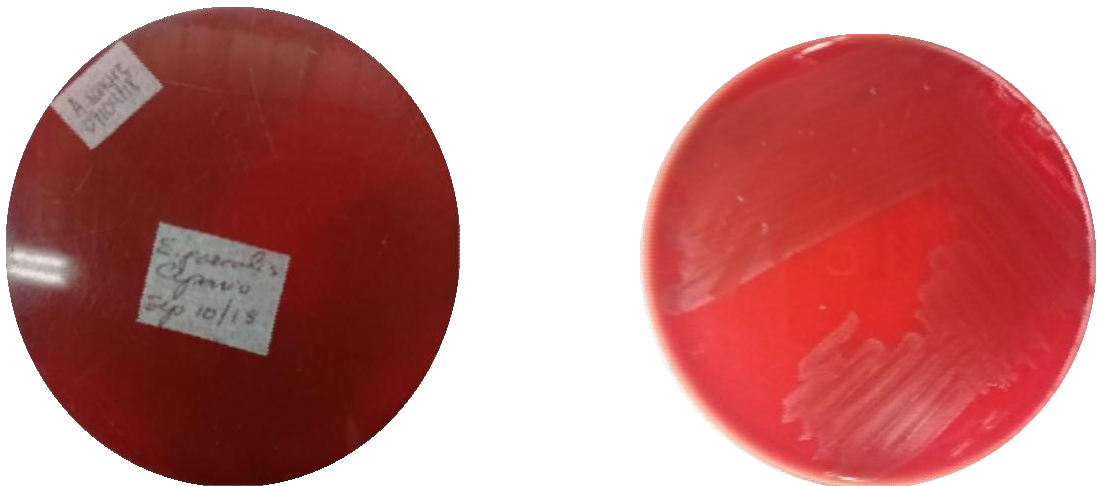


Figura 13. Cepa de *Enterococcus faecalis*.

- Análisis del crecimiento microbiano obtenido en el medio de cultivo

Las bacterias fueron incubadas durante 48 horas a 37°C mientras que los hongos estuvieron en incubación durante 8 días a 37°C, después de dicho tiempo se analizaron los resultados obtenidos, las cajas de Petri en donde hubo crecimiento de microorganismos fueron seleccionadas para proceder con una tinción para observar las estructuras microbianas bajo el microscopio, siendo la coloración de Gram para las colonias bacterianas y tinción con azul de lactofenol para las colonias de hongos, después se utilizaron dos paquetes de identificación microbiana BBL-Crystal para

microorganismos Gram positivos y Gram negativos para cerciorarse de haber aislado el mismo microorganismo del inóculo original, mientras que para los hongos mediante clave dicótoma de identificación se clasificó al microorganismo en su respectivo género.

FASE 3: Establecer un protocolo para la preparación del medio de cultivo

Con base a las anteriores fases se redactó un protocolo que incluía los componentes nutricionales y sus cantidades que fueron agregados al medio de cultivo.

4. RESULTADOS

FASE 1: Determinación de los componentes y preparación del medio

Gracias al proceso de la fase 1 se logró preparar un medio de cultivo el cual se puede observar a continuación

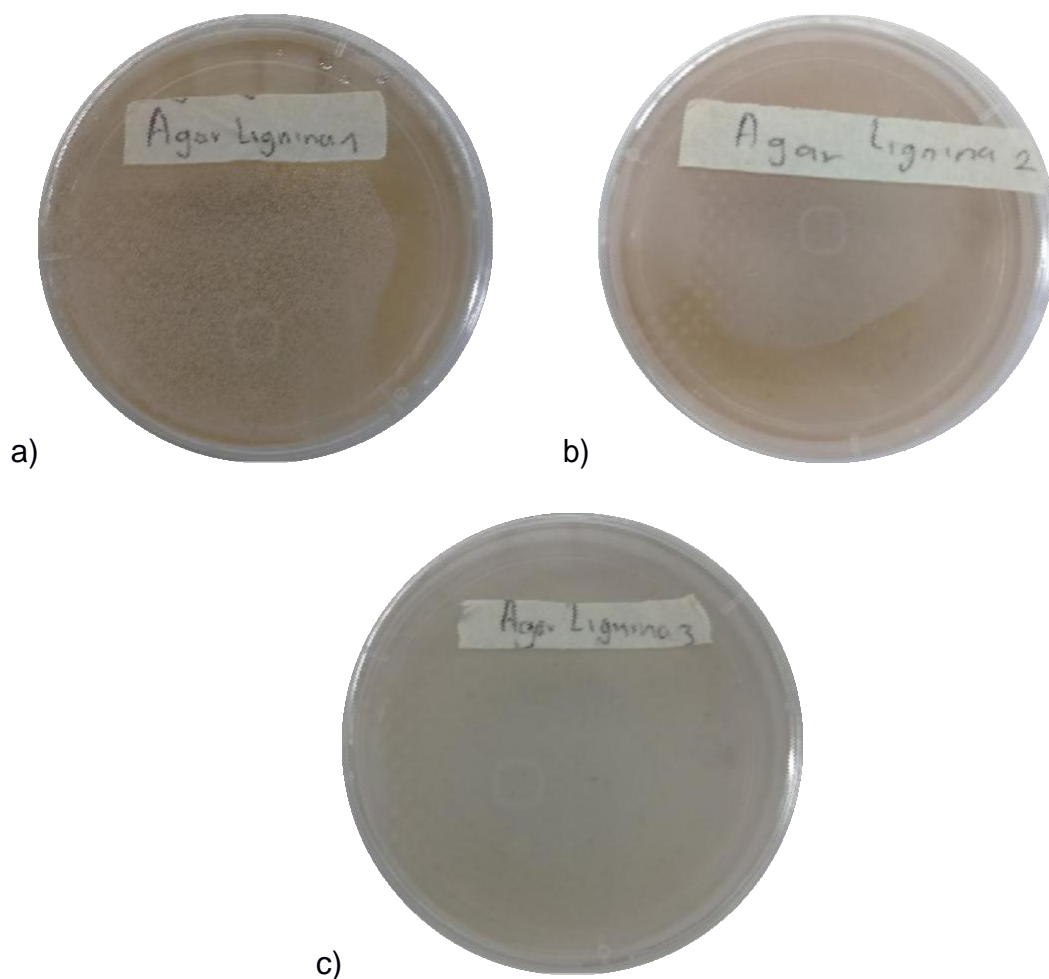


Figura 14. Medios de cultivos preparados a partir de las ligninas extraídas. **A)** Agar Lignina 1 proveniente de la lignina obtenida del aserrín de Pino; **B)** Agar Lignina 2 obtenido gracias a la extracción de lignina del aserrín de granadillo; **C)** Agar Lignina 3 desarrollado a partir de la lignina recolectada del aserrín de sajo

El test de esterilidad del medio fue exitoso ya que no hubo ningún crecimiento de flora contaminante sobre la superficie de los medios seleccionados para el test.

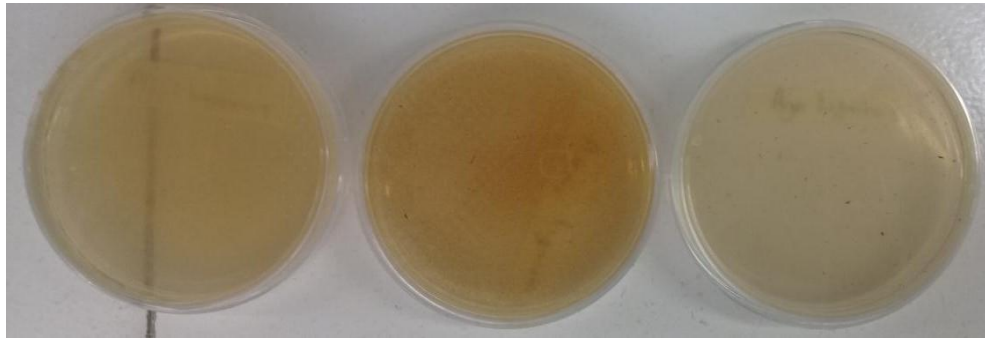


Figura 15. Prueba de esterilidad los medios de cultivo: de izquierda a derecha) Agar Lignina 1, Agar Lignina 2 y Agar Lignina 3.

FASE 2: Verificación de la capacidad del medio para el crecimiento de microorganismos ligninolíticos

- **Controles utilizados para verificar la funcionalidad del medio de cultivo**

Las cepas utilizadas como control positivo y negativo demostraron que los microorganismos que fueron capaces de crecer en el medio, es gracias a la fuente de carbono que se les proveía, es decir la lignina, esto se confirmó puesto que las cepas *Bacillus subtilis* y *Streptomyces* sp. (ambas especies bacterianas reconocidas como potenciales agentes ligninolíticos) crecieron sin problemas en el medio de cultivo desarrollado Ver figura 16. Por otro lado, los microorganismos que no poseen el arsenal enzimático necesario para degradar este biopolímero, no pueden crecer en el sustrato. Tal fue el caso de *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*, ambos agentes microbianos no producen las enzimas degradadoras, por lo cual no se desarrollaron en el medio Ver figura 17 y 18.

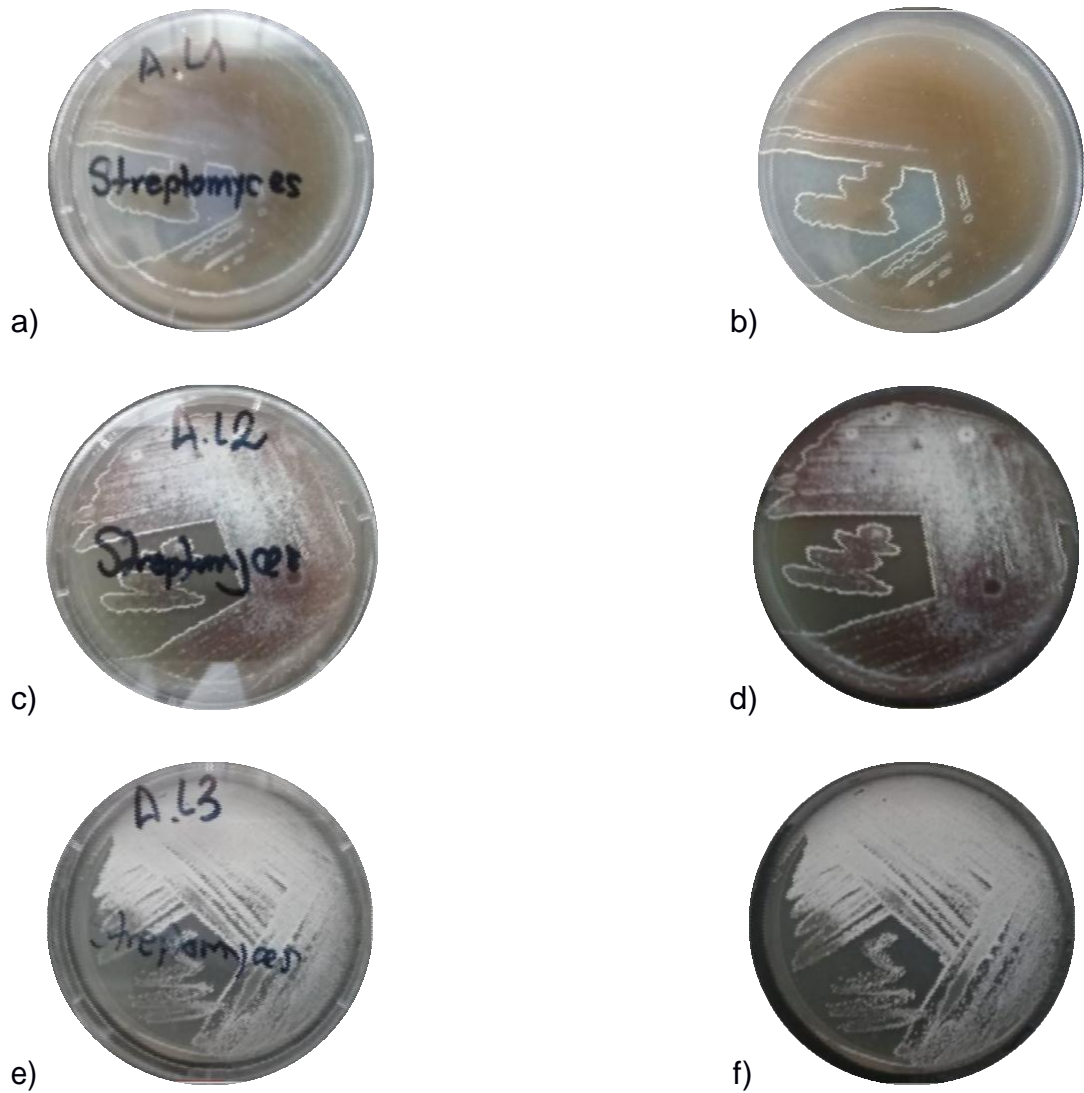


Figura 16. Crecimiento de *Streptomyces* sp. en Agar Lignina 1: **A y B**;
 Crecimiento de *Streptomyces* sp. en Agar Lignina 2: **C y D**; Crecimiento de
Streptomyces sp. en Agar Lignina 3: **E y F**



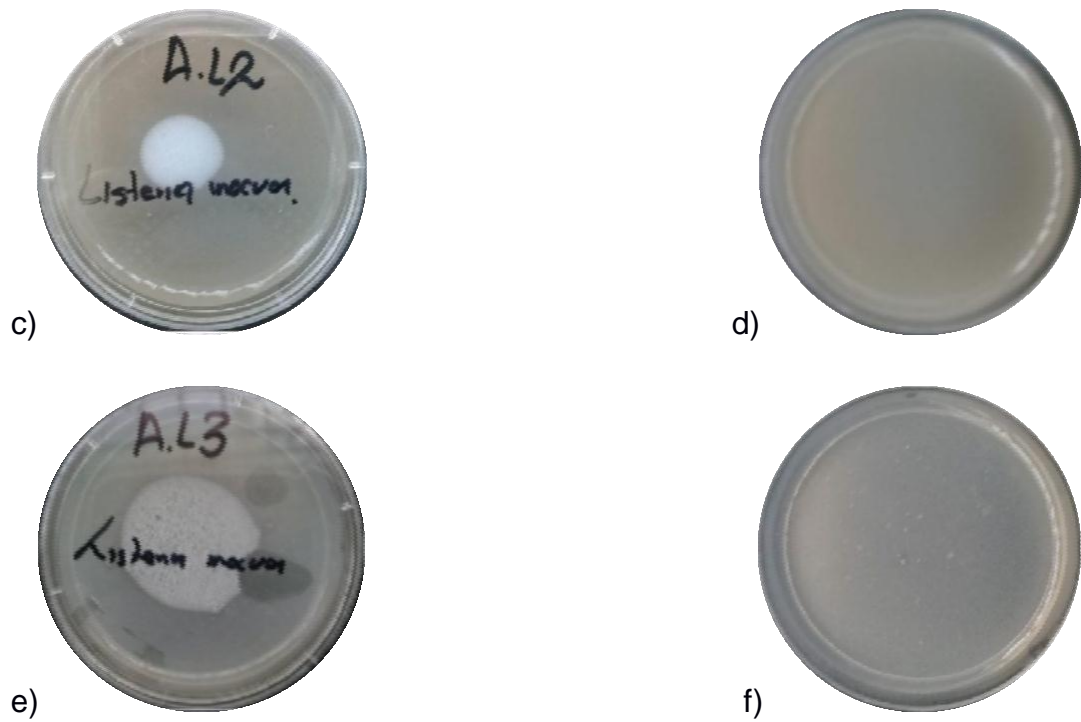


Figura 17. Ausencia de crecimiento de *Listeria innocua* en Agar Lignina 1: **A y B**; Ausencia de crecimiento de *Listeria innocua* en Agar Lignina 2: **C y D**; Ausencia de crecimiento de *Listeria innocua* en Agar Lignina 3: **E y F**

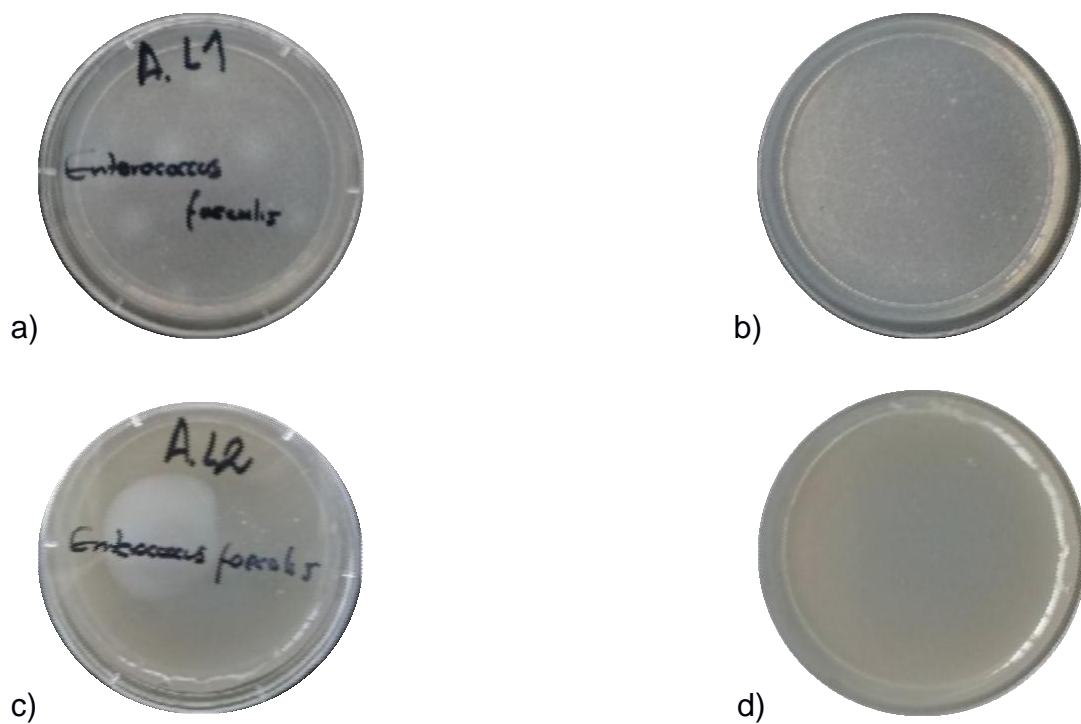




Figura 18. Ausencia de crecimiento de *Enterococcus faecalis* en Agar Lignina 1: **A y B**; Ausencia de crecimiento de *Enterococcus faecalis* en Agar Lignina 2: **C y D**; Ausencia de crecimiento de *Enterococcus faecalis* en Agar Lignina 3: **E y F**

- **Bacterias sembradas en el medio de cultivo preparado**

Luego de sembrar las bacterias por duplicado e incubarlas en los tres medios de cultivo durante 48 horas a 37°C hubo crecimiento positivo de las bacterias en todos los medios preparados, excepto por el Agar Lignina 3 en el cual el *Bacillus subtilis* (TB2) no se desarrolló.



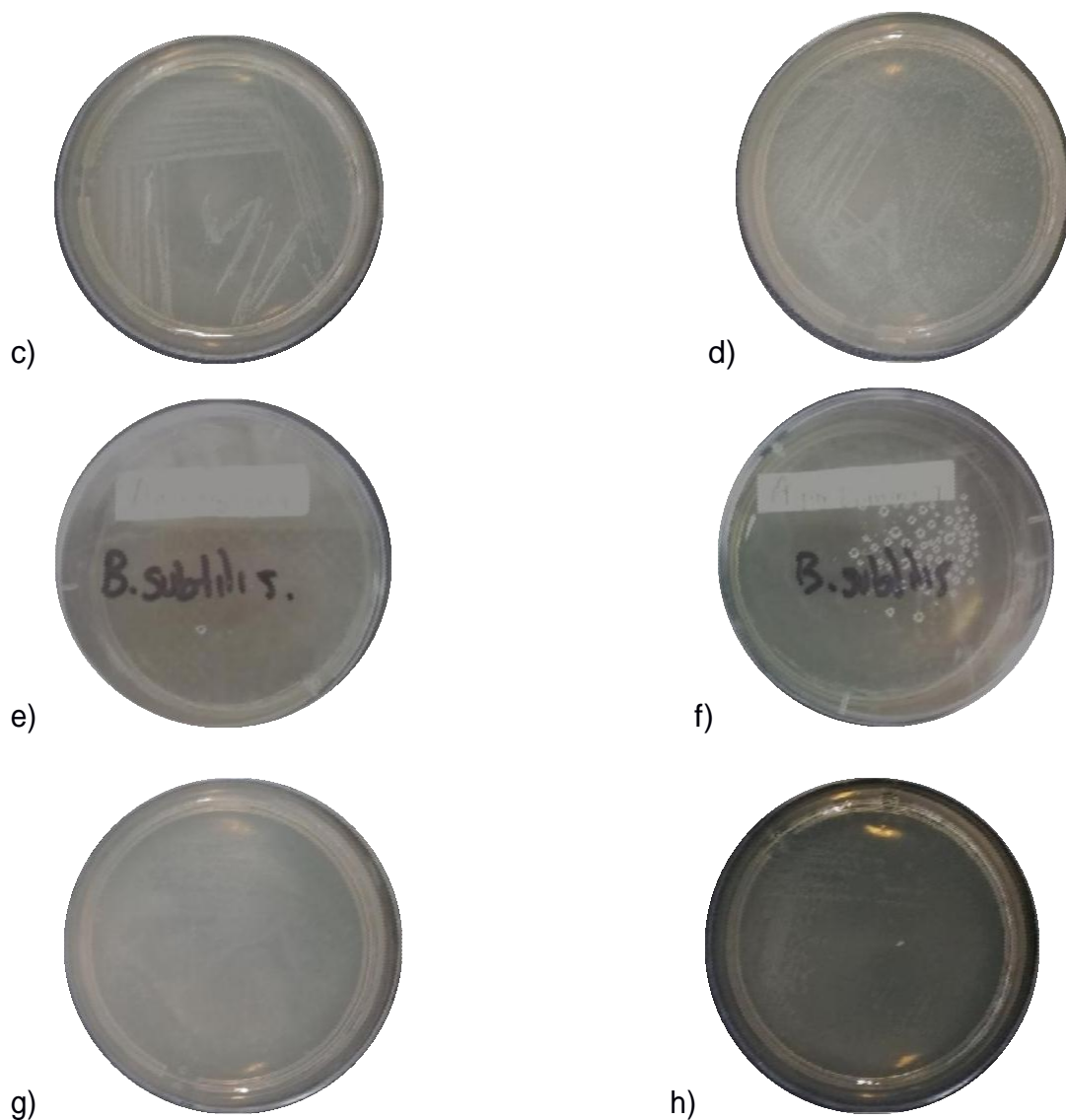


Figura 19. *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis* en Agar Lignina 1: **A y B** Agar Lignina 1 inoculado con *Serratia marcescens*; **C y D** Agar Lignina 1 colonias bacterianas de *Serratia marcescens*; **E y F** Agar Lignina 1 inoculado con *Bacillus subtilis* (TB2); **G y H** Agar Lignina 1 colonias de *Bacillus subtilis* (TB2)

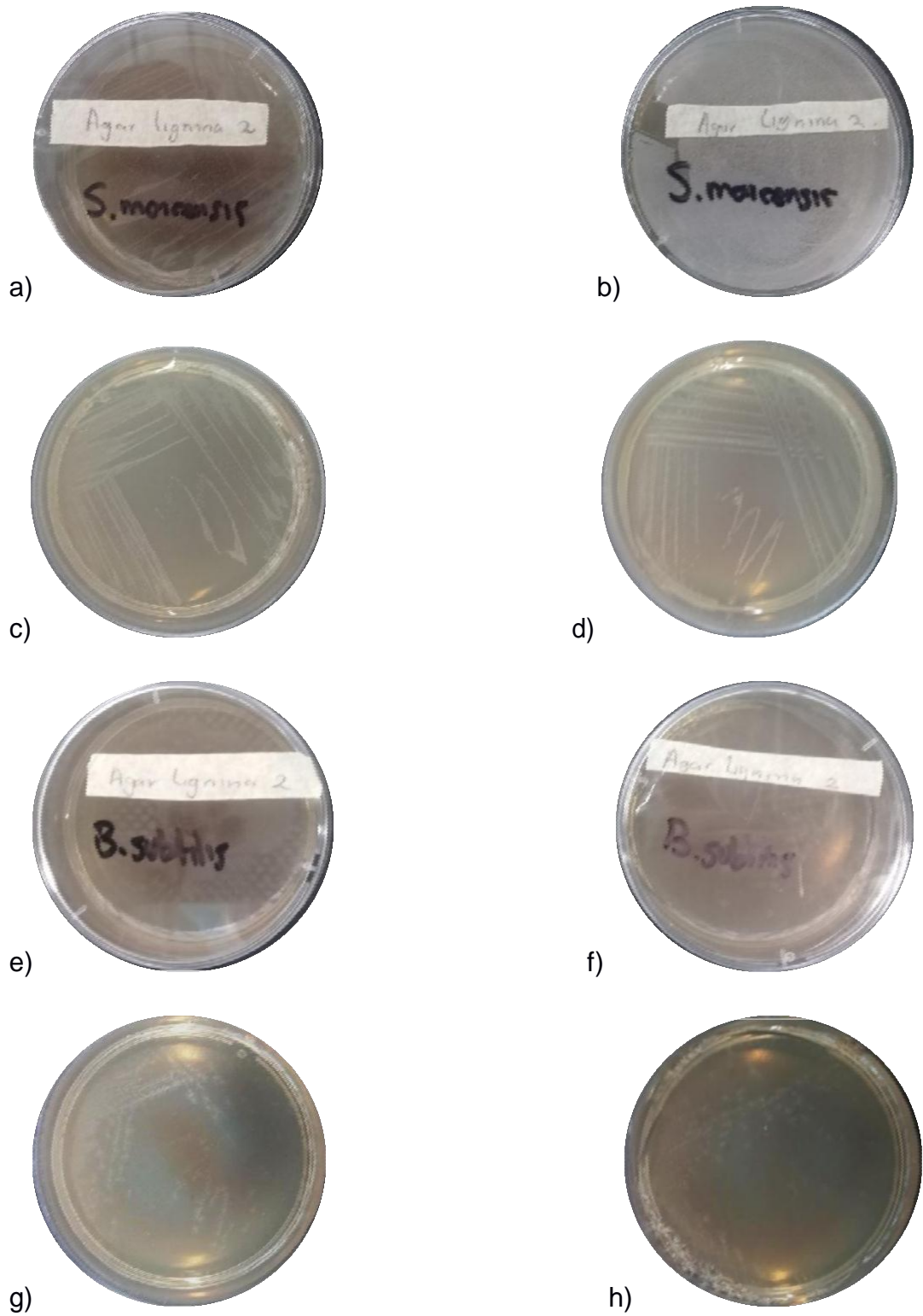


Figura 20. *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis* en Agar Lignina 2: **A y B** Agar Lignina 2 inoculado con *Serratia marcescens*; **C y D** Agar Lignina 2 colonias bacterianas de *Serratia marcescens*; **E y F** Agar Lignina 2 inoculado

con *Bacillus subtilis* (TB2); **G y H** Agar Lignina 2 colonias de *Bacillus subtilis* (TB2)

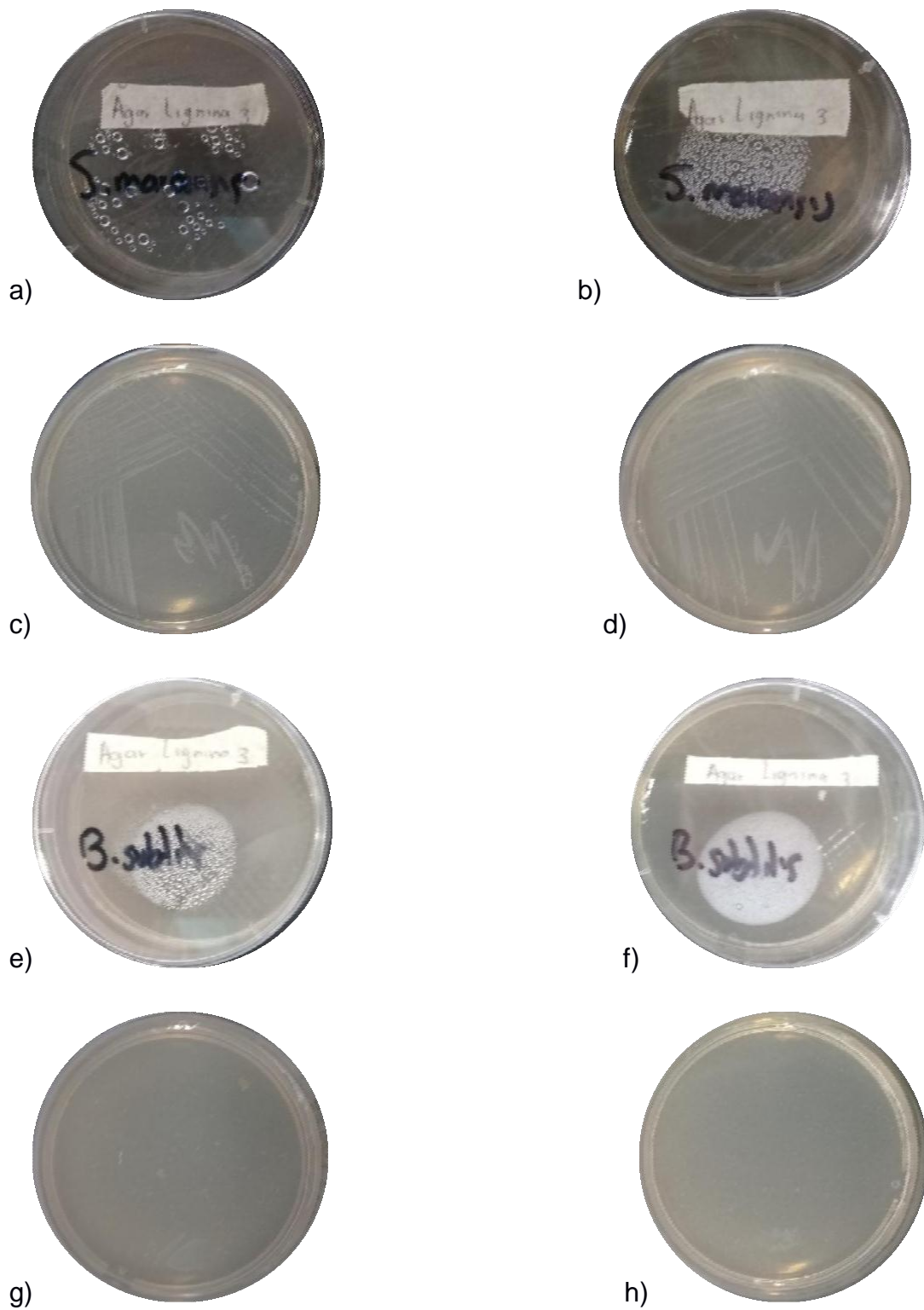


Figura 21. *Serratia marcescens* en Agar Lignina 3: **A y B** Agar Lignina 3 inoculado con *Serratia marcescens*; **C y D** Agar Lignina 3 colonias bacterianas de *Serratia marcescens*; **E y F** Agar Lignina 3 inoculado con *Bacillus subtilis* (TB2); **G y H** Agar Lignina 3 ausencia de colonias de *Bacillus subtilis* (TB2)

Estos fueron los resultados tras realizar la coloración de Gram a las colonias bacterianas de *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis* en los diferentes medios y ensayos.

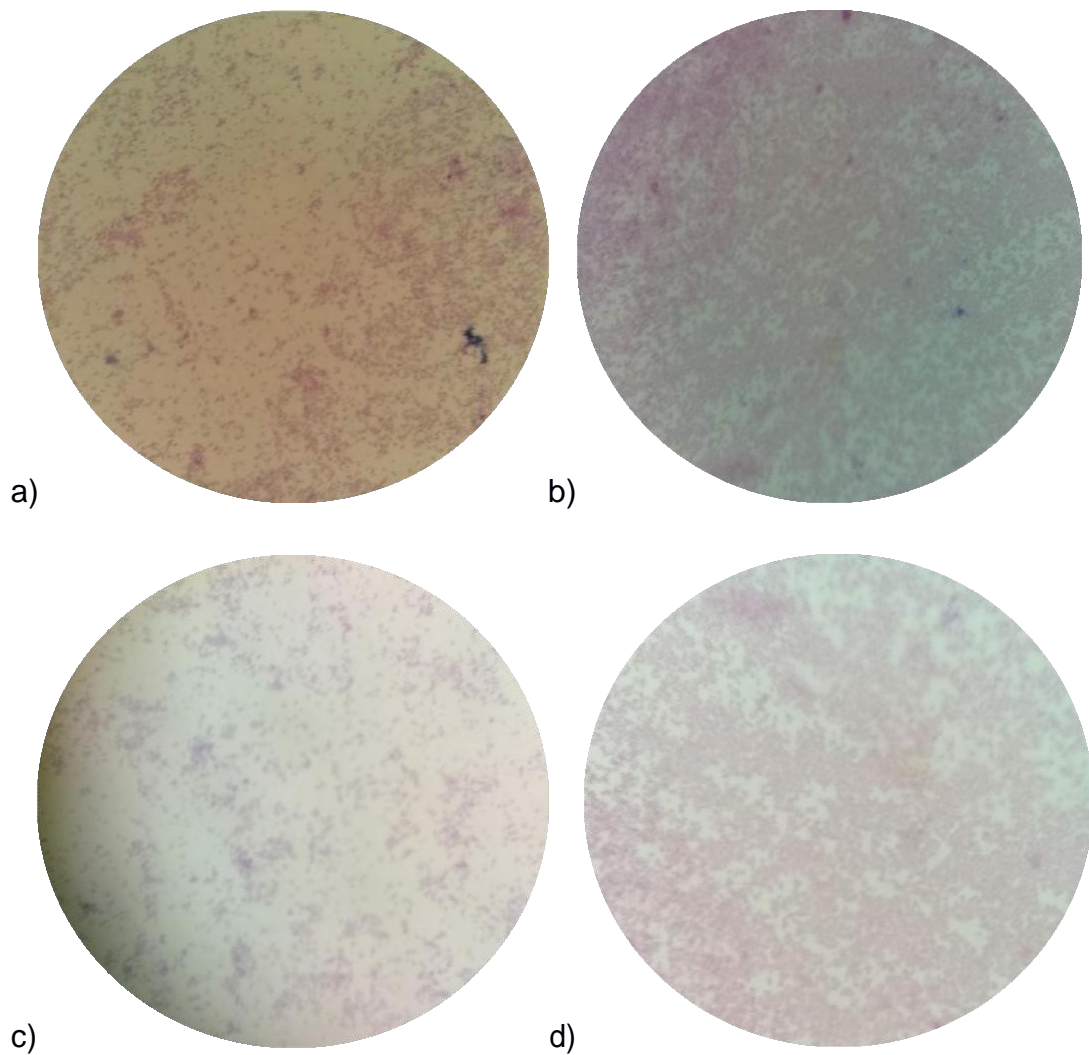


Figura 22. Coloración de Gram de *Serratia marcescens*: **A)** Gram de las colonias de *Serratia marcescens* del cepario de la Universidad Colegio

Mayor de Cundinamarca; **B)** Tincion de Gram de colonias bacterianas de *Serratia marcescens* provenientes del Agar Lignina 1; **C)** Tincion de Gram de colonias bacterianas de *Serratia marcescens* del Agar Lignina 2; **D)** Tincion de Gram de colonias bacterianas de *Serratia marcescens* del Agar Lignina 3.

La tincion demostro que la *Serratia marcescens* que habia crecido en los medios de cultivos preparados era la misma para los tres ensayos y concordaba con las características morfológicas del inoculo original, es decir, cocobacilos de afinidad Gram negativa (-) infiriendo asi que el microorganismo no crecio bajo algun tipo de estrés y que el medio de cultivo proveía los minerales y fuente de carbono necesarios para el buen desarrollo del microbio.

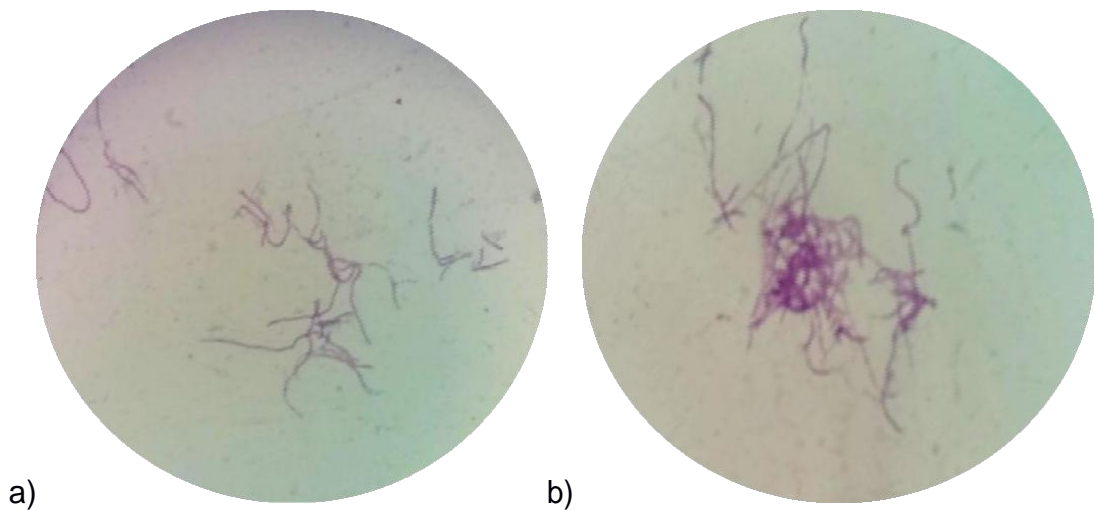




Figura 23. Coloración de gram de *Bacillus subtilis* (TB2): **A)** Gram de las colonias de *Bacillus subtilis* (TB2) del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; **B)** Tinción de Gram de colonias bacterianas de *Bacillus subtilis* (TB2) provenientes del Agar Lignina 1; **C)** Tinción de Gram de colonias bacterianas de *Bacillus subtilis* (TB2) del Agar Lignina 2.

En cuanto al *Bacillus subtilis* (TB2), también hubo resultados satisfactorios ya que las estructuras bacterianas observadas bajo el microscopio fueron las mismas para el inóculo original obtenido del cepario de la universidad, como las recuperadas en el medio de cultivo diseñado, morfología bacilar grande de afinidad Gram positiva (+), tanto en el inóculo original como en los medios desarrollados los bacilos mostraron tener una espora en su interior, indicando que el germen creció sin ninguna complicación.

Las pruebas BBL-Crystal de identificación microbiana confirmaron que las bacterias que se desarrollaron en el medio de cultivo eran las mismas del inóculo original, el score final de ambas pruebas coincidió con el género y especie bacteriano al que pertenecían ambas cepas utilizadas Ver figura 24 y 25.



Figura 24. Prueba BBL-Crystal para bacterias Gram Negativas, microorganismo aislado: *Serratia marcescens*.



a)



b)

Figura 25. Prueba BBL-Crystal para bacterias Gram Positivas, microorganismo aislado: *Bacillus subtilis*.

- **Hongos sembrados en el medio de cultivo preparado**

Al igual que las bacterias, los hongos seleccionados para testear el medio de cultivo preparado, fueron sembrados por duplicado e incubados durante 8 días a 37°C con el fin de que desarrollaran por completo sus estructuras fungicas. Hubo crecimiento positivo de los tres hongos en los tres medios de cultivo realizados.

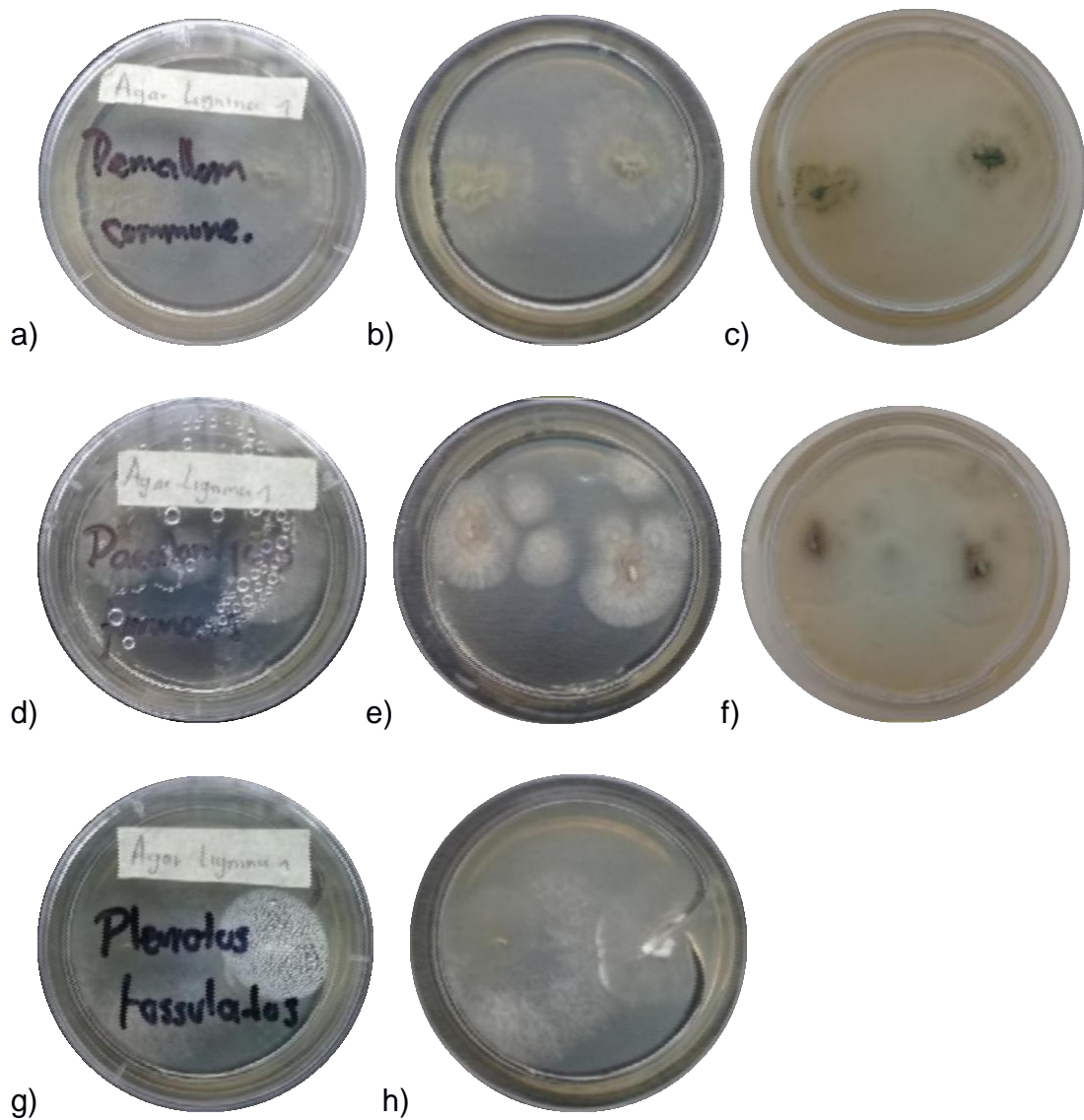


Figura 26. *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 1: **A,B y C** Colonias de *Penicillium commune* en Agar Lignina 1; **D,E y F** Colonias de *Paecilomyces formosus* en Agar Lignina 1; **G y H** Colonias de *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 1.

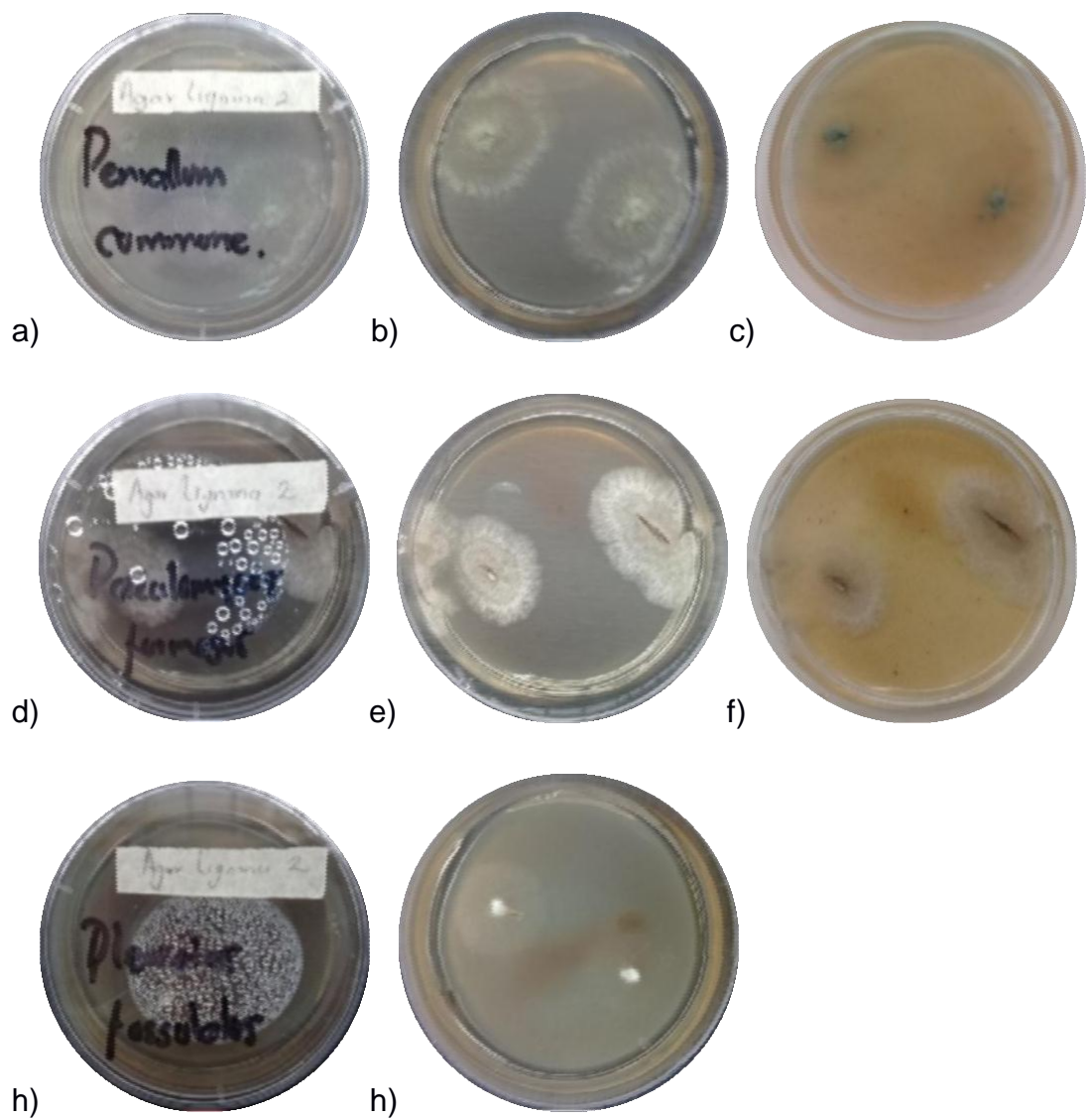


Figura 27. *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 2: **A,B y C** Colonias de *Penicillium commune* en Agar Lignina 2; **D,E y F** Colonias de *Paecilomyces formosus* en Agar Lignina 2; **G y H** Colonias de *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 2.

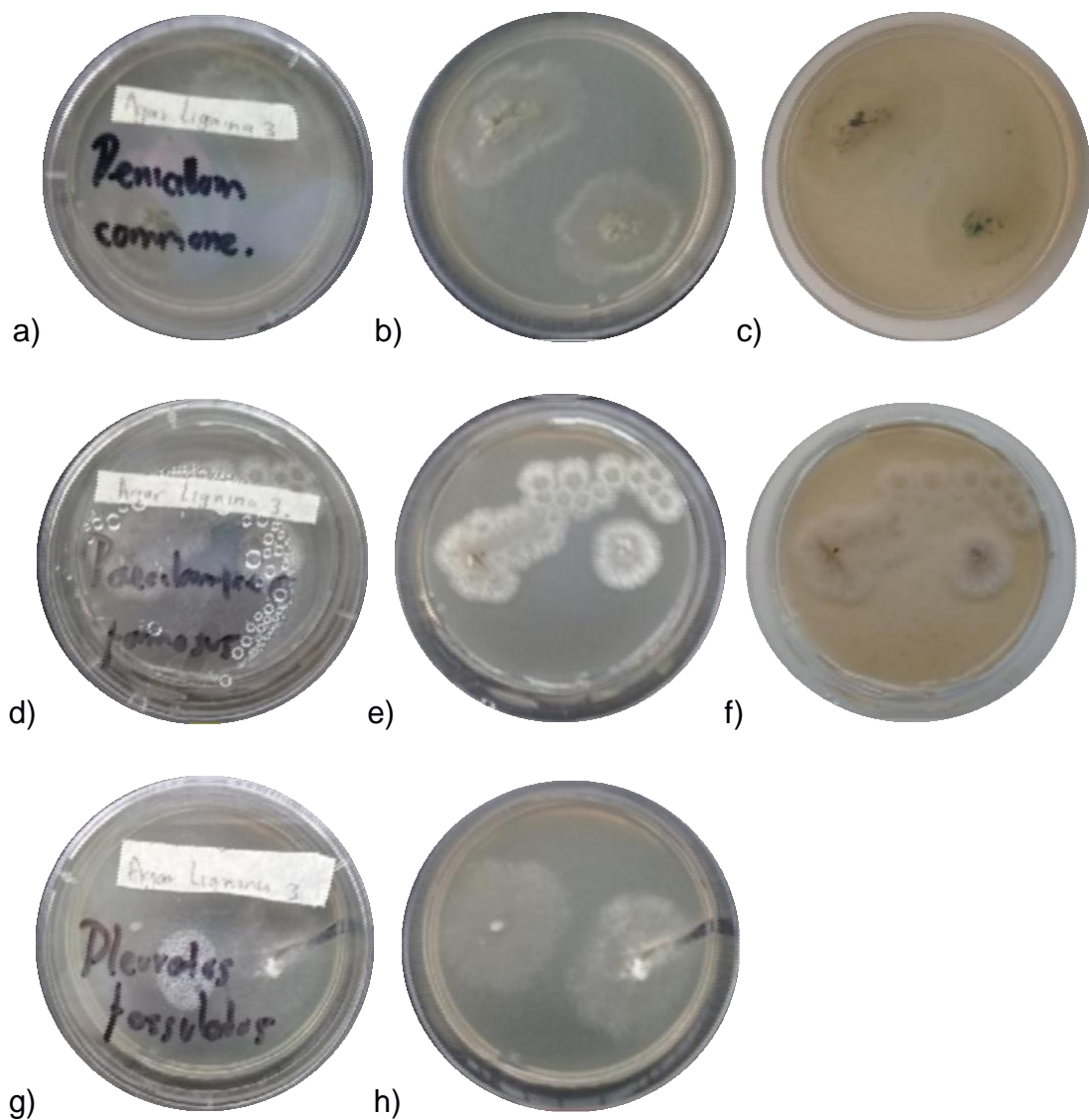


Figura 28. *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 3: **A,B y C** Colonias de *Penicillium commune* en Agar Lignina 3; **D,E y F** Colonias de *Paecilomyces formosus* en Agar Lignina 3; **G y H** Colonias de *Pleurotus fossulatus* en Agar Lignina 3.

El crecimiento de los tres hongos fue óptimo, *Pleurotus fossulatus* fue el hongo que menos creció debido a que solo se podía observar micelio aéreo en las colonias del agar lignina, aunque esto se debe a que tiene una tasa de crecimiento más lenta en comparación a *Penicillium commune* y

Paecilomyces formosus los cuales se desarrollaron con mejor rendimiento y velocidad en el medio de cultivo preparado.

La tinción seleccionada para el reconocimiento de estructuras fungicas fue con azul de lactofenol, tal cual como se realizó el procedimiento de comparacion de las colonias bacterianas del inóculo original y las colonias recuperadas en el medio de cultivo, se hizo el mismo método con los hongos, hacer un contraste entre las características morfológicas de los hongos para saber si era el mismo agente micótico.

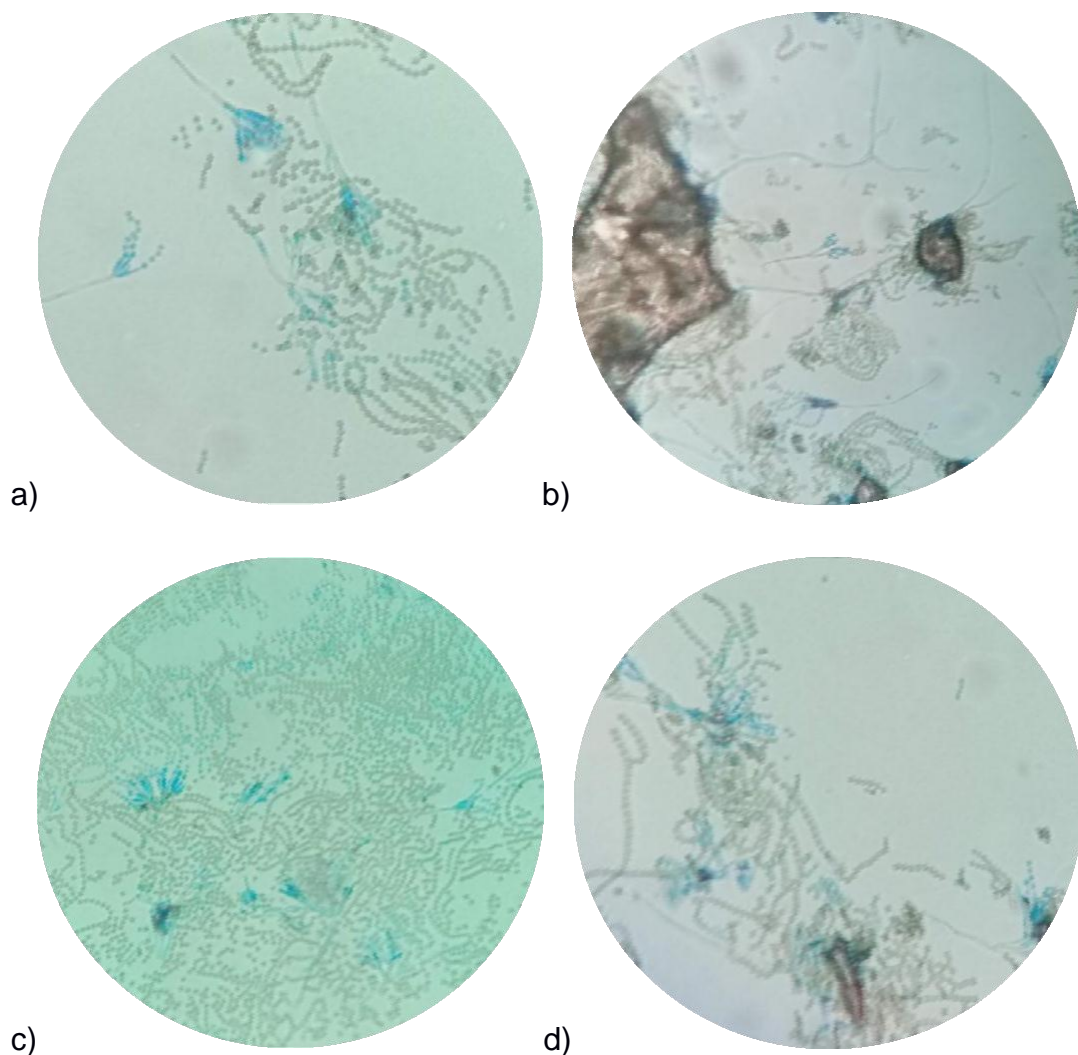


Figura 29. Tincion con azul de lactofenol de *Penicillium commune*: **A)** Tincion con azul de lactofenol de las colonias de *Penicillium commune* del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; **B)** Tincion con azul de lactofenol de colonias fungicas de *Penicillium commune* provenientes

del Agar Lignina 1; **C)** Tinción de colonias micóticas de *Penicillium commune* del Agar Lignina 2; **D)** Tinción de colonias de *Penicillium commune* del Agar Lignina 3.

Las colonias demostraron tanto macroscópica como microscópicamente las mismas características del inóculo original en comparación con las recuperadas gracias al agar preparado, colonias algodonosas con tintes verdosos en la periferia y en el centro de la misma, micelio septado hialino con fialides que producen conidias en cadenas, el hongo reconocido como ligninolítico no creció con ninguna dificultad en el medio de cultivo desarrollado.

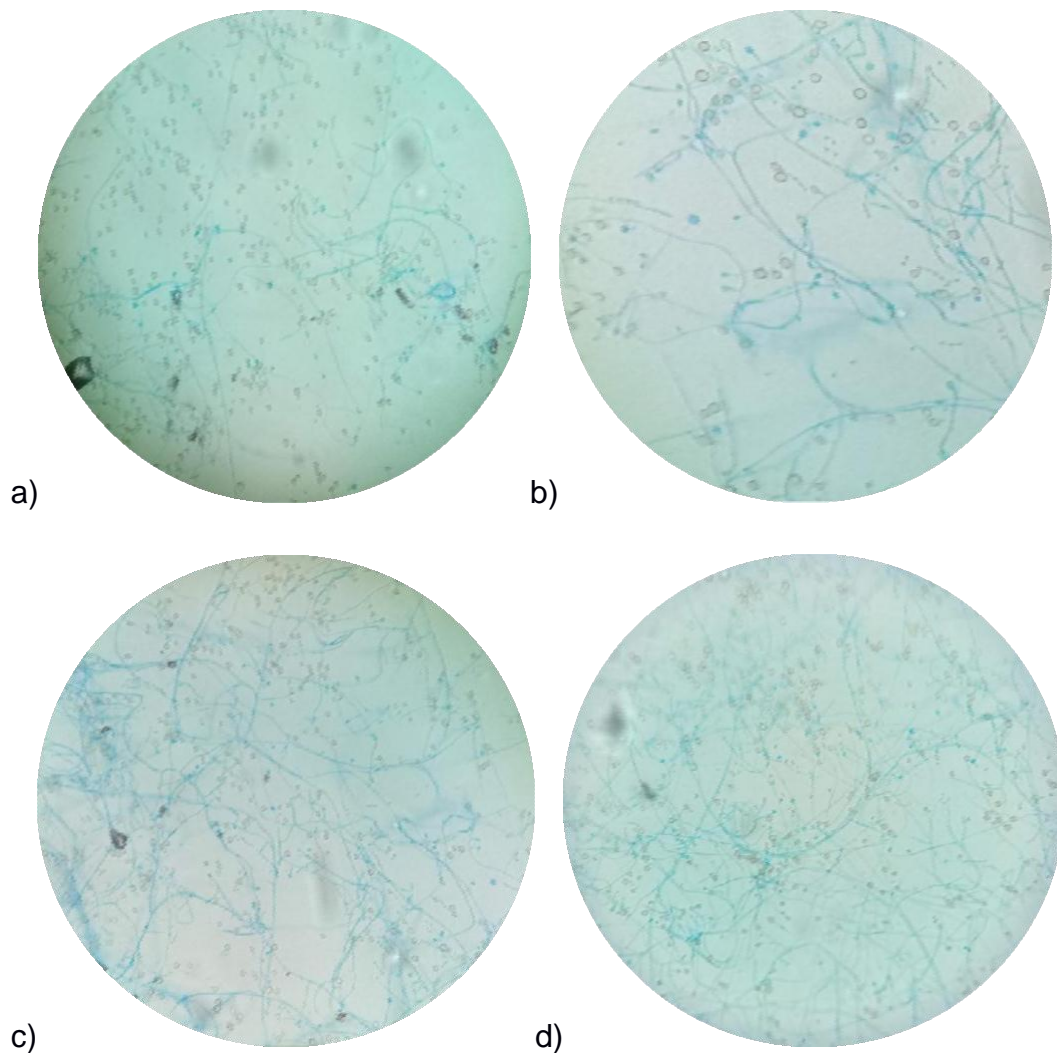
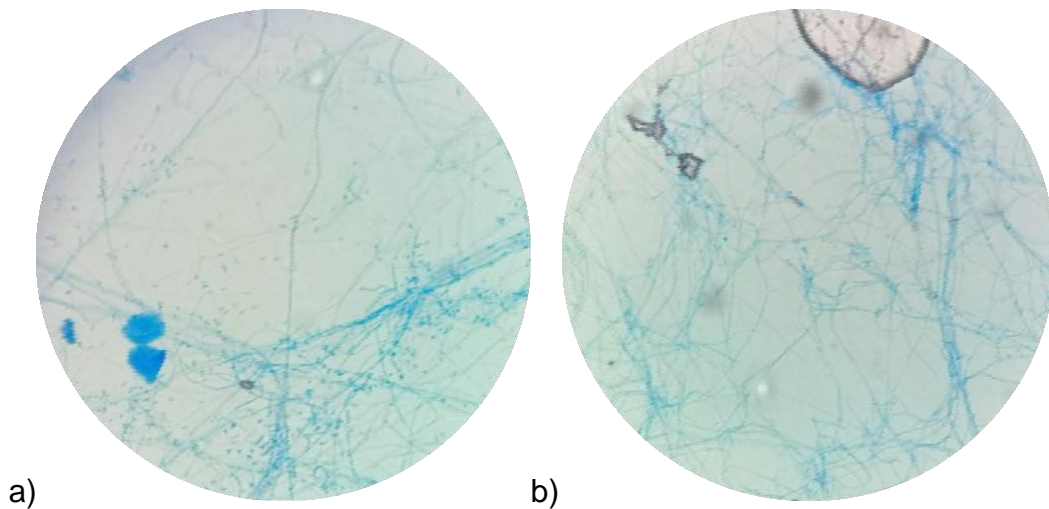


Figura 30. Tinción con azul de lactofenol de *Paecilomyces formosus* :**A)** Tinción con azul de lactofenol de las colonias de *Paecilomyces formosus* del

cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; **B)** Tincion con azul de lactofenol de colonias fungicas de *Paecilomyces formosus* provenientes del Agar Lignina 1; **C)** Tincion de colonias micoticas de *Paecilomyces formosus* del Agar Lignina 2; **D)** Tincion de colonias de *Paecilomyces formosus* e del Agar Lignina 3.

El *Paecilomyces formosus* demostró su capacidad de esporular en el medio de cultivo desarrollado, las características visuales de las colonias fueron similares a las del inóculo original, colonias grandes de aspecto algodonoso con una gran cantidad de esporas en su superficie, de color blanco con tonos beige y cafes en su centro, de igual forma las estructuras miceliales hialinas y septadas junto con sus conidios en cadena mostraban ser los mismos para los hongos recuperados en el medio de cultivo preparado como tambien en el inóculo original.



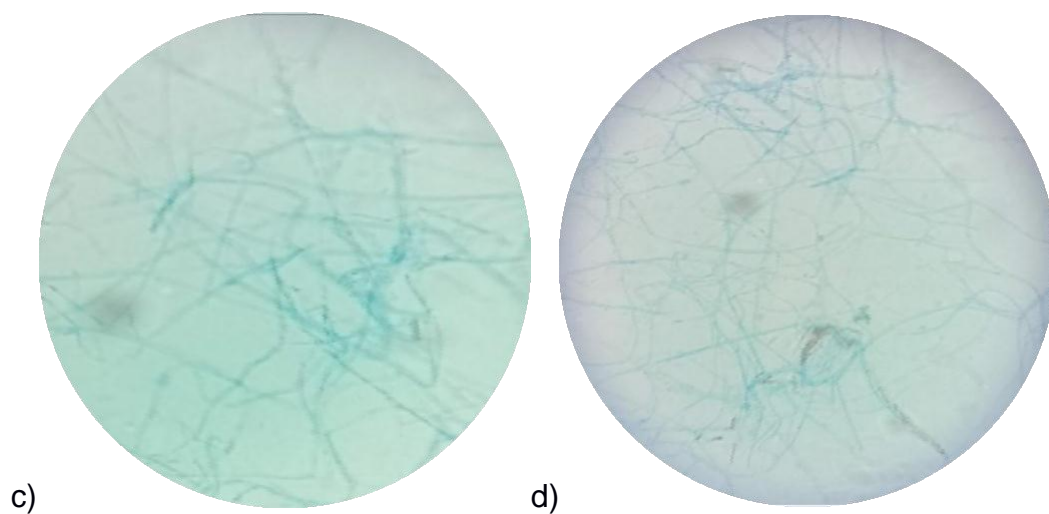


Figura 31. Tinción con azul de lactofenol de *Pleurotus fossulatus*: **A)** Tinción con azul de lactofenol de las colonias de *Pleurotus fossulatus* del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; **B)** Tinción con azul de lactofenol de colonias fungicas de *Pleurotus fossulatus* provenientes del Agar Lignina 1; **C)** Tinción de colonias micóticas de *Pleurotus fossulatus* del Agar Lignina 2; **D)** Tinción de colonias de *Pleurotus fossulatus* del Agar Lignina 3.

FASE 3: Establecer un protocolo para la preparación del medio de cultivo

- Extracción de lignina del material maderable
1. En caso de obtener una muestra que no esté aserrada del material vegetal maderable, se debe astillar hasta dejarlo como aserrín.
 2. Pesar 100g de aserrín
 3. Preparar 150 mL de soda caustica a una concentración de 4%: Tomar 6 g de perlas de Soda caustica (generalmente se encuentra en una presentación con 99% de pureza) y verter 150 mL de agua, dejar reposar esta solución 24 horas antes de su uso.
 4. En un recipiente que pueda ser puesto bajo fuego, agregar los 150 mL de soda caustica 4% y los 100 g de aserrín

5. Una vez comience la emisión de vapores mantener la mezcla en este estado durante 45 minutos
6. Pasar el residuo resultante de la cocción del aserrín a un embudo con papel filtro, con ayuda de un mortero presionar para extraer la mayor cantidad de líquido rico en lignina (Licor negro)
7. Este líquido recuperado debe ser traspasado a un envase de vidrio color ámbar y de no ser utilizado al instante, deberá ser refrigerado a 2-8°C

- Preparación del medio de cultivo

1. En una fiola de vidrio medir 1 litro de agua destilada
2. Con base la tabla de la cantidad de los componentes nutricionales, Ver Tabla 5, pesar y agregar dichos componentes a la fiola de vidrio con el agua destilada.
3. Agregar 20 g/L de Agar-Agar.
4. Mezclar hasta disolver por completo las sales minerales.
5. Tapar la fiola de vidrio con papel aluminio y poner una tira de cinta testigo a esta para asegurarse que el proceso de esterilización es exitoso.
6. Autoclavar el medio de cultivo a 121°C con 20 libras de presión durante 15 minutos.
7. Después del proceso de esterilización y de haber verificado que la cinta testigo demuestre una correcta esterilización, se debe servir el medio en cajas de Petri ya sea de vidrio o plástico.
8. Dejar reposar hasta que gelifique por completo el medio.
9. Guardar los medios en refrigeración durante 24 horas para su uso.

5. DISCUSION

La lignina, después de la celulosa, es el segundo biopolímero de mayor abundancia en la tierra que compone la pared celular de todas las células vegetales, junto con otros compuestos como la celulosa y hemi-celulosa¹. A este biopolímero, el cual es generado a partir de varios fenil-propanoides², se le ha encontrado en la actualidad varias utilidades a nivel industrial, como por ejemplo, la industria papelera, para producción de pesticidas, emulsificantes y secuestradores de metales pesados, entre otras³.

Debido a que este biopolímero se ha inmiscuido en problemas de contaminación ambiental por estar presente en los residuos de varios procesos industriales que utilizan solventes inorgánicos con el fin de eliminar este polímero de su materia prima, tal es el caso de la industria papelera, para la producción en masa de papel, se requiere de preparar la pulpa de celulosa, dicha pulpa es obtenida a través de diferentes métodos físicos y químicos que tienen como objetivo despojar de la lignina y otros componentes que no sean la celulosa el material maderable, como consecuencia este biopolímero de gran tamaño es liberado en los residuos de la fabricación del papel²⁵.

Esta es la importancia que resalta este trabajo de investigación, en desarrollar un medio de cultivo que permita el crecimiento de microorganismos que demuestren una capacidad para producir enzimas que les permitan degradar la lignina extraída de material maderable, dejando las puertas abiertas para futuras investigaciones, no solo con el medio desarrollado, sino también con los microorganismos recuperados ya que representan un gran horizonte de investigación para el campo de la biorremediación.

En la fase experimental se utilizaron tres tipos de variedades de material vegetal maderable que permitiera analizar el crecimiento y desarrollo de los microorganismos frente a distintos tipos de ligninas. Este componente de la pared celular es generado a partir de la oxidación de varios fenilpropanoides

y compuestos hidroxicinámicos; es el responsable de aportar a la planta rigidez y soporte junto con los demás componentes presentes en la pared^{1,3,13,21,22}. Debido a su capacidad de generar enlaces, aleatoriamente, durante su síntesis y a su gran tamaño, se posiciona como uno de los biopolímeros de origen natural más difíciles de degradar² ya que no todas las ligninas poseen la misma estructura.

Pino, granadillo y sajo fueron las variedades seleccionadas para el experimento ya que son pertenecientes al grupo de maderas blandas, estas maderas permiten extraer con mayor facilidad y con métodos menos sofisticados y costosos la lignina, como es el caso de la fase experimental en la que se realizó la extracción del biopolímero utilizando una solución de soda caustica 4%, maderas duras requieren otro tipo de extracción como el método de Kraft^{3,26,27,28}, a diferencia de otras investigaciones realizadas en las que se utilizaba el biopolímero, previamente extraído y purificado para preparar el sustrato de cultivo como el estudio de Thorn *et al* que en 1996 fueron los primeros en preparar un medio de cultivo que propiciara el sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos con capacidad ligninolítica, haciendo uso de sales minerales y lignina alcalina que es un producto de procesos de extracción y purificación³³ ó Abhay R. *et al* que utilizando como base el medio mínimo de sales (MSM) agregó lignina de Kraft para culminar con un sustrato rico en lignina que licencia el desarrollo de agentes microbianos ligninolíticos¹⁵; Como consecuencia de no poder utilizar un proceso más refinado para la extracción y tampoco se usó ningún método de purificación, cabe la posibilidad de que en el líquido rico en lignina obtenido de cada muestra maderable del presente estudio, queden trazas de otros componentes de la pared celular vegetal.

El proceso de extracción fue el mismo para las tres variedades maderables, suspendiendo 100 g del material vegetal en 150 mL de una solución de soda caustica 4%, durante 45 minutos en constante emisión de vapores, el producto resultante fue puesto en un embudo cubierto en su interior con papel filtro, con ayuda de un mortero se presionó el material vegetal para así

extraer la mayor cantidad de lignina, el Granadillo fue la variedad de la que menos se obtuvo líquido rico en lignina, mientras que fue del Pino de donde más se obtuvo dicho componente. Similar al proceso que realizó Tha Swe K. en su investigación en la cual agregó un extracto obtenido a partir de madera de abedul y salvado de trigo con el fin de favorecer la producción enzimática de los microorganismos en el medio de cultivo preparado⁴, Buitrago S. *et al* utilizó también extractos obtenidos a partir de aserrín para el sustrato que desarrolló en su investigación³⁴.

Los resultados muestran que ambas bacterias *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis* crecieron mejor en el Agar Lignina 2 el cual está compuesto por la lignina de Granadillo, esto puede ser debido a que en la composición química del Granadillo su porcentaje de cenizas (0.62-1.84%) es mayor a la del pino (0.3%)³⁰, sin embargo el porcentaje de lignina presente en la pared celular es menor en la madera de Granadillo (25.24-27.24%) que en la madera Pino (24.0-28.5%)²⁸, como las cenizas poseen un pH bastante alcalino, alteran en cierta medida el pH final del medio de cultivo, haciendo que este sea ligeramente más alcalino, lo cual favorece el crecimiento bacteriano, por otra parte el Agar Lignina 3 obtenido a partir de la madera de Sajo no permitió el crecimiento del *Bacillus subtilis*, esto puede ser debido a que tal como Weniger B. *et al* explicaron en su estudio, la madera de *Camposperma panamense* en su composición molecular posee un flavonoide, el cual tiene acción antiparasitaria, lo cual no excluye que este flavonoide sea capaz de ejercer un control frente a ciertos microorganismos de origen bacteriano³².

Lo anterior se correlaciona con los estudios realizados por Perestelo F. *et al* los cuales demostraron que *Serratia marcescens* tiene la capacidad de producir enzimas ligninolíticas de tipo lacasa, utilizando dicho microorganismo para degradar la lignina presente en muestras de lignina sintética, natural y semi-natural⁷¹. De igual modo utilizando lignina proveniente del proceso de extracción de Kraft y colorantes industriales Verma P. y Madamwar D. lograron comprobar que *Serratia marcescens* es

capaz de degradar cierta cantidad de lignina marcada con radioisótopos como también el colorante industrial⁷². Investigaciones realizadas por Hassan E. y Hanafy A. expusieron la capacidad ligninolítica de diferentes especies de *Bacillus* sp. revelaron que *Bacillus subtilis* no posee una capacidad ligninolítica tan elevada como *Bacillus megatarium* pero si una mayor en comparación a *B. thuringiensis* y *B. axarquiensis*⁷³.

Los hongos *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatus* crecieron en los tres medios de cultivo preparados sin ningún problema, aunque *Pleurotus fossulatus* fue el hongo que más tardó en crecer en los tres ensayos del sustrato preparado, mientras que *Penicillium commune* fue el hongo que creció con mayor velocidad, el Agar Lignina 1 preparado a partir de la lignina extraída de la madera de Pino, fue el medio en donde los tres hongos presentaron mayor crecimiento y capacidad esporulativa, mientras que el Agar Lignina 2 fue el medio donde el crecimiento micótico fue menor, lo anterior puede ser debido al porcentaje de lignina presente en la pared celular del Pino la cual es mayor con respecto a la del sajo y aun más en comparación a la del Granadillo, además debido a que el pH de la madera de pino oscila entre 4.0 y 4.4 el pH del sustrato de cultivo preparado es ligeramente ácido, favoreciendo de notable modo el crecimiento fungico²⁸.

En comparación a estudios como los realizados por Yu H. *et al* en los que utilizando una cepa de *Penicillium simplicissimum* degradaron la lignina presente en muestras de lignina procedentes de extracciones⁷⁴, o la investigación realizada por Rodríguez A. *et al* en que analizan la capacidad de *Penicillium chrysogenum* de producir enzimas ligninolíticas de tipo lacasas en un medio de cultivo preparado a partir de lignina extraída y purificada⁷⁵, igualmente Rodríguez A. *et al* en otra publicación continúa la investigación con *Penicillium chrysogenum* y cuantifica la cantidad de lignina degradada por el hongo, esto realizado por métodos de espectrofotometría⁷⁶, Yang Y., Yuan H., Wang H. y Chen W. utilizan un medio de cultivo preparado a partir de extracto de malta y de levadura para el crecimiento de una cepa

de *Penicillium decumbens* para caracterizar molecularmente las enzimas ligninolíticas de tipo peroxidasas y lacasas producidas por dicho hongo⁷⁷; en el presente trabajo también se comprobó la capacidad ligninolítica de *Penicillium commune* y se determinó que crece mejor en la lignina obtenida a partir de pino en comparación al crecimiento obtenido en la madera de Granadillo y Sajo.

Paecilomyces sp. es un género de hongos deuteromicetos que han demostrado en varias de sus especies la capacidad de producir enzimas de tipo lacasas, lignino y manganeso peroxidasas, Kluczek B., Tuomela M., Hatakka A. y Hofrincher M. aislaron de muestras de compost de suelo y aguas residuales de la fabricación de pulpa de celulosa con ayuda de un medio de cultivo preparado a partir de lignina extraída y purificada dos especies de hongos posteriormente identificadas como *Paecilomyces inflatus* las cuales manifestaron su facultad ligninolítica, además determinaron que las enzimas de tipo lacasa se producen más en temperaturas alrededor de 30°C y pH de 4.5–5.5⁷⁸. Las enzimas de tipo peroxidasas fueron el centro de estudio en el que Singh P., Jain P., Verma R. y Jagadish S. caracterizaron molecularmente dichas enzimas producidas por hongos del género *Paecilomyces* sp. y *Phanerochaete* sp. las cuales tenían el potencial de degradar no solo la lignina sino también productos residuales de la decoloración de la pulpa de celulosa, residuos del proceso de fabricación del papel⁷⁹. En contraste a las muestras recolectadas normalmente de suelo, Ameen F., Moslem M., Saefaraz H. y Al-Sabri A. utilizaron un medio de cultivo suplementado con MgSO₄, FeSO₄ 7H₂O, ZnSO₄ 7H₂O, MnSO₄, CuSO₄, NH₄Cl, KCl, CaCl₂, NaCl y KH₂PO₄ sales minerales similares a las que se usaron para preparar el sustrato de crecimiento en el presente trabajo; dichas sales hacen parte de la composición de un medio de cultivo que fue utilizado para recuperar hongos provenientes de muestras de agua de mar, aislaron 28 microorganismos capaces de crecer en el medio, de los cuales ocho (8) tenían la habilidad de crecer en el medio de cultivo suplementado con lignino-celulosa, dichas cepas fueron identificadas como: *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*,

Cladosporium sphaerospermum, *Geosmithia pallida*, *Paecilomyces formosus*, *Eupenicillium hirayamae*, *Byssochlamys spectabilis* y *Eupenicillium rubidurum*⁸⁰.

Finalmente el ultimo microorganismo de origen fungico utilizado para probar la funcionalidad y viabilidad del medio de cultivo preparado, fue *Pleurotus fossulatus*. Este hongo es proveniente de uno de los generos reconocidos como potencialmente ligninoliticos, el principal representante de este genero es *Pleurotus ostreatus*, el cual ha sido catalogado como capaz de producir enzimas con capacidad ligninolitica en diversos estudios como los realizados por Eggert C., Temp U. y Eriksson K. en 1997 en el que, utilizando un sustrato de cultivo suplementado con malta y analizando las enzimas posteriormente con espectrofotometria, establecieron que dicho hongo era capaz de producir enzimas de tipo lacasas, lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa⁸¹. Das N., Chowdhury P., Adhikari D. y Naskar S. utilizaron arroz seco como sustrato principal para elaborar un medio de cultivo que les permitiera recuperar una cepa de *Pleurotus fossulatus*, posteriormente se realizaron ensayos para identificar la produccion de enzimas ligninoliticos⁸². En Mexico, Salmones D. y Mata G. prepararon un sustrato utilizando extracto de malta, levadura y residuos de derivados solubles de lignina obtenidos a partir del proceso de pulpeo de Kraft, para poder cultivar especies de *Pleurotus* sp⁸³.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo lignina a partir del aserrín de las tres variedades vegetales maderable seleccionadas, pino, granadillo y sajo. El granadillo fue el aserrín de donde se obtuvo una menor cantidad de líquido rico en lignina en comparación a la cantidad obtenida con las otras dos variedades.
- Se comprobó la actividad enzimática ligninolítica de *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatos* ya que crecieron en los medios de cultivo desarrollados los cuales ofrecían como única fuente principal de energía, la lignina.
- Se estableció un protocolo de preparación del medio de cultivo el cual incluía la metodología propuesta para la extracción de la lignina del material vegetal maderable, las sales minerales y sus respectivas cantidades que serían agregadas al sustrato de cultivo
- Los microorganismos de origen bacteriano requieren para su desarrollo ambientes con pH ligeramente alcalino, maderas que tengan alto contenido en cenizas o que posean un pH alcalino como el Granadillo *Dalbergia granadillo*, proporcionan el ambiente que dichos microorganismos con capacidad ligninolítica requieren para su crecimiento., por lo tanto el medio de cultivo Agar Lignina 2 es más propicio para el desarrollo de bacterias ligninolíticas.
- Los hongos por su parte tienden a preferir sustratos que tengan pH ligeramente ácidos, para esto es recomendado el uso de ligninas extraídas de árboles cuyo pH o componentes de la pared celular permitan virar el pH del medio para que este tenga más iones hidrogeniones y se torne más ácido, en este caso la madera de Pino *Pinus* sp, doto al medio de cultivo Agar Lignina 1 como el más apto para crecimiento de hongos.
- Los hongos de la división *Basidiomycota* crecen más lento que los provenientes de la división *Ascomycota*, lo anterior se infiere debido a

que *Pleurotus fossulatus* creció más lento que *Penicillium commune* y *Paecilomyces formosus*.

- La madera de Sajo *Camptosperma panamense* tiene la facultad de inhibir el crecimiento de la cepa de *Bacillus subtilis* (TB2) proveniente del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca esto puede ser por la presencia de flavonoides en su corteza.
- Se desarrolló un medio de cultivo a partir de ligninas extraídas de tres variedades vegetales maderables, el cual permitió a los microorganismos de origen bacteriano y fúngico la producción de enzimas con capacidad ligninolítica

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fagerstedt k. Y kärkönen a. The plant cell wall. Revista journal of Integrative plant biology journal [internet]. 2015 [citado 17 abr 2017]; Volumen 57 (4): pp: 328-329. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jipb.12351/pdf>
2. Weng JK. Y Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. Revista New Phytologist tansley reviews [Internet]. 2010 [Citado 17 Abr 2017]; Volumen 187: pp: 273-285. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x/epdf>
3. Chávez M. Y Domine M. Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Revista Avances en Ciencias e Ingeniería [Internet]. 2015 [Citado el 18 Abr 2017]; Volumen 4(4): pp: 15-46. Disponible en: http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf
4. Buitrago S., Sánchez E. Y Guerrero H. Aislamiento de microorganismos Amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. Revista SENNOVA [Internet]. 2014 [Citado el 18 Abr 2017]; Volumen 1(1): pp148-155. Disponible en: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/89/101>
5. Dávila G. Y Vázquez R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para Fines ambientales. Revista Mensaje Bioquímico [Internet]. 2006 [Citado 18 Abr 2017]; Volumen 6: pp: 29-55. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_Davila-Vazquez/publication/259781277_enzimas_ligninoliticass_para_fines_ambientales/links/0f31752dd6945ab733000000/enzimas-ligninoliticass-fungicas-para-fines-ambientales.pdf

6. Pérez M. Y Aquiahuatl M. Manual de prácticas del laboratorio de Microbiología general. Iztalapa, Mexico: Editorial Casa Abierta al Tiempo; 2004
7. Sasikumar V., Priya V., Shankar C. Y Sekar S. Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes. Revista Journal of Academia and Industrial Research (JAIR) [Internet]. 2014 [Citado 20 Abr 2017]; Volumen 3(3): pp: 291-294.
Disponibile en:
<http://jairjp.com/november%202014/10%20sasikumar.pdf>
8. Gao H., Wang Y., Zhang W., Wang W. Y Mu Z. Isolation, identification and Application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. Revista African Journal of Biotechnology [Internet]. 2011 [Citado 20 Abr 2017]; Volumen 10(20) pp: 4166-4174.
Disponibile en:
<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93601/83025>
9. Alarcon L. Y Olivas E. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición. Ciudad de Juarez, México: Editorial UACJ; 2001
10. Pachon D. Aislamiento, identificación, y serotipificación de Enterobacterias del genero *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la facultad de ciencias - Universidad nacional de Colombia en Villavicencio – Meta. Trabajo de grado para optar por el título de Microbióloga agrícola y veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, 2009.
11. Garcia J. Y Silva C. Manual del Tecnico Superior de Laboratorio de Analisis Clinicos, Modulo II Microbiologia, Enzimologia e Inmunologia. Sevilla, España: Editorial MAD; 2004
12. Thorn G. Adinarayana C. Harris D. y Eldor P. Isolation of saprophytic

basidiomicetes from soil. Revista Applied and Environmental Microbiology [internet] 1996 [citado el 28 Abr 2017] Volumen 62 (11): pp: 4288- 4292. Disponible en:
[Https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388993/pdf/hw4288.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388993/pdf/hw4288.pdf)

13. Arora D. y Sandhu D. Survey of some Indian soils for laccase producing fungi and their lignin degrading ability. Revista Proceedings: Plant Sciences [internet] 1985 [Citado el 29 Abr 2017] Volumen: 94(4): pp: 567-574. Disponible en:
[Https://link.springer.com/article/10.1007/BF03053224](https://link.springer.com/article/10.1007/BF03053224)
14. Raj A., Reddy M., Chandra R., Purohit H. y Kapley A. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill. Revista: Biodegradation [internet] 2007 [citado el 29 Abr de 2017] Volumen: 18 (6): pp: 783-792. Disponible en:
[Https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10532-007-9107-9](https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10532-007-9107-9)
15. Arias E. Y Piñeros P. Aislamiento e identificación de hongos Filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de grado presentado para optar por el título de microbióloga Industrial Pontificia Universidad Javeriana, 2008.
16. Saenz M. Evaluación del papel de los microorganismos Lignocelulolíticos sobre los residuos vegetales en suelos rizosfericos de papa criolla *Solanum phureja* en municipios de Cundinamarca. Tesis presentada para optar por el título de Magister en Ciencias Microbiologicas. Universidad Nacional de Colombia. 2009.
17. Ortiz M. y Uribe D. Determinación de la actividad lignocelulolitica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. Revista Ci. SUELO (Argentina) [Internet] 2010 [citado el 30 Abr 2017] Volumen 28(2): pp: 169-180. Disponible en:
[Http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v28n2/v28n2a05.pdf](http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v28n2/v28n2a05.pdf)

- 18.** Kyi Tha S. Screening of potential lignin-degrading microorganisms and evaluating their optimal enzyme producing culture conditions. Tesis presentada para optar por el título de Magister en ciencias. Departamento de Ingeniería química y biológica, Biotecnología industrial, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden 2011
- 19.** Abdul Rahman N., Abdul Rahman A., Abd S. y Ali M. Production of ligninolytic enzymes by newly isolated bacteria from palm oil plantations soils. *Revista BioResources* [internet] 2013 [citado el 01 May 2017] Volumen: 8(4): pp: 6136-6150. Disponible en: https://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_08/BioRes_08_4_6136_Rahman_RAH_Prod_Lininolytic_Enzymes_Bacteria_Oil_Palm_4395.pdf
- 20.** Jadhav P., Bholay A. y Shindikar M. Bacterial Lignin Peroxidase in Biobleaching of Lignin-mimicking indicator Dyes. *Revista International Journal of Pure & Applied Bioscience* [internet] 2016 [citado el 03 May 2017] Volumen: 4(4): pp: 84-92. Disponible en: <Http://www.ijpab.com/form/2016%20Volume%204,%20issue%204/IJPAB-2016-4-4-84-92.pdf>
- 21.** Valenciaga D. y Chongo B. La pared celular. Influencia de su naturaleza en la degradación microbiana ruminal de los forrajes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* [internet] 2004 [citado el 20 Oct 2017] Volumen: 38 (4): pp: 343-350. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193017793001.pdf>
- 22.** Ochoa M., Aispuro E., Vargas I. y Martinez MA. Plant cell Wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. *Revista INTECH*. DOI: 10.5772/46094. [Internet] 2012 [citado el 20 Oct 2017]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/38901/InTech->

Plant_cell_wall_polymers_function_structure_and_biological_activity_of_their_derivatives.pdf

23. Showalter A. Structure and function of plant cell wall proteins. Revista The Plant Cell [internet] 1993 [Citado el 22 Oct 2017] Volumen: 5, pp: 9-23. Disponible en:
<http://www.plantcell.org/content/plantcell/5/1/9.full.pdf>
24. Paz F. Determinación de la Composición Química de la Madera obtenida del primer clareo en Arboles de melina (gmelina arborea roxb.), de una plantación proveniente del departamento de Izabal. 2008 [Internet] Composición Química de Madera, Celulosa: Marco teórico (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería San Carlos, Guatemala. Recuperado de
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1090_Q.pdf
25. Presa J. Bases de conocimiento Estructura, composición y clasificación de la madera. Revista Albura, Cedria [Internet] 2015 [Citado el 29 Ago 2018] Volumen: 1, pp: 1-5. Disponible en: <http://blog.cedria.es/wp-content/uploads/2015/04/ALBURA-N1-ESTRUCTURA-COMPOSICION-Y-CLASIFICACION-DE-LA-MADERA.pdf>
26. Garcia P. y Belmonte J. Pinos *Pinus*. Revista Polinosis Polen y Alegria, [Internet] 2002 [Citado el 29 Ago 2018] pp: 139-142. Disponible en:
http://lap.uab.cat/aerobiologia/general/pdf/menarini/4_4_pinus.pdf
27. Maldonado M. Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (pinus maximinoi h. e. moore) procedente de la finca río frío, tactic, alta verapaz. [Internet] 2006 [Citado el 29 Ago 2018] Disponible en:
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0992_Q.pdf

- 28.** Bernabe S., Avila L. y Ruitaga J. Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Revista Madera y Bosques*. Xalapa, [Internet] 2013[Citado el 29 Ago 2018] Volumen 19. pp:21-35. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712013000200002&lng=es&nrm=iso
- 29.** Cervantes M., La conservación del Granadillo en México, una carrera contra el tiempo. *Revista CONABIO Biodiversitas*. [Internet] 2016 [Citado el 29 Ago 2018]. Volumen 128. pp: 6-11. Disponible en:
<http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/12765.pdf>
- 30.** Rutiaga J., Pedraza F. y Lopez P. Componentes químicos principales de la madera de *Dalbergia granadillo* Pittier y de *Platymiscium lasiocarpum* Sandw. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, Chapingo*. [Internet] 2010 [Citado el 29 Ago 2018]. Volumen: 16(2). pp: 179-186. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-40182010000200008
- 31.** Rodríguez Y. y Ibáñez L. Aproximación de valores comerciales para árboles maderables.caso de estudio: diez especies maderables. [Tesis] Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá D.C. [Internet] 2018 [Citado el 29 Ago 2018].
- 32.** Weniger B. *et al.* Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Revista Phytomedicine*. [Internet] 2006 [Citado el 29 Ago 2019]. Volumen: 13(3). pp: 176-180. Disponible en:
<https://eurekamag.com/pdf/004/0044408698.pdf>

- 33.** El Mansouri NE. Despolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas. Tesis para optar por el título de doctor en Ingeniería química y de procesos. Universitat Rovira i Virgili 2006
- 34.** Rencoret J. Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de la pasta de papel. Tesis para optar por el título de doctor en ciencias químicas. Universidad de Sevilla 2008.
- 35.** Torres R. y Coronado M. Determinación del contenido energético de lignina obtenida a partir de vara de algodón del valle de Mexicali, México. Revista Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química [internet] 2015 [Citado el 25 Oct 2017] pp: 2089-2094. Disponible en; https://www.researchgate.net/profile/Gisela_Montero/publication/282329380_Determinacion_del_contenido_energetico_de_lignina_obtenida_a_partir_de_vara_de_algodon_del_Valle_de_Mexicali_Mexico/links/560c40f108aed543358d2a3b/Determinacion-del-contenido-energetico-de-lignina-obtenida-a-partir-de-vara-de-algodon-del-Valle-de-Mexicali-Mexico.pdf
- 36.** Torres R. y Pelayo L. Lignina obtenida de residuos agrícolas como Biocombustible de tercera generación. Revista Ciencia y Tecnología [internet] 2015 [citado el 26 Oct 2017]. Volumen: 15 pp: 151-164. Disponible en: http://www.palermo.edu/ingenieria/pdf2015/15/CyT_15_11.pdf
- 37.** Madigan T. Michael, Martinko M. John, Parker Jack. "Biología de los Microorganismos". 10ª Edición. PEARSON. Prentice Hall. Capítulo 1. Disponible en: <http://es.slideshare.net/Hernanrf/biologa-de-losmicroorganismos-brock-10ed>
- 38.** Rivera M. "Prácticas De Laboratorio-Identificación Bacteriana".

Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina.
Departamento de Microbiología. Disponible en:
http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIANA%20I%2014.pdf

- 39.** López L. y Torres C. “Medios de Cultivo”. Universidad Nacional del Nordeste. FACULTAD DE AGROINDUSTRIAS. Microbiología General- Carrera Farmacia. Trabajo Práctico N° 4. 2006. Disponible en:
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
- 40.** Morris AJ, Wilson SJ, Marx CE, Wilson ML, Mirrett S, Reller LB. “Clinical impact of bacteria and fungi recovered only from broth cultures.” . Revista:Journal Clinical Microbiology.[internet] 1995 [citado el 30 Oct 2017] ; Volumen 33(1): pp:161-165. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7699035>
- 41.** J.Espinosa. “Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* Bajo condiciones anaerobias”. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. 2005. Disponible en:
<http://www.ibt.unam.mx/alfredo/JoelEspinosa.pdf>.
- 42.** Dossi M. *et al.* *Serratia marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. Revista Chil Infect. [Internet] 2002 [Citado el 29 Ago 2018]. Volumen: 19(4). pp: 262-266. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v19n4/art07.pdf>
- 43.** Correa R. *et al.* La caracterización fenotípica y genotípica de *Serratia marcescens* proveniente de la Unidad de Neonatología de Referencia de Belém, Pará, Brasil. Revista Pan-Amaz Saude. [Internet] 2010 [Citado el 29 Ago 2018]. Volumen 1(1). pp: 101-106. Disponible en:
http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n1/es_v1n1a15.pdf

44. Ledermann G., Donoso E., Jacob M. y Bustos E. Infecciones intra-hospitalarias por *Serratia marcescens*. Revista Chilena Pediatría. [Internet] 1974 [Citado 29 Ago 2018]. Volumen: 45(3). pp: 233-237. Disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcp/v45n3/art08.pdf>
45. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana. [Internet] 2010 [Citado el 29 Ago 2018].
46. Realpe M., Hernández C. y Agudelo C. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Revista Imágenes en Biomedicina. [Internet] 2002 [Citado el 29 Ago 2018] pp: 106-109. Disponible en:
<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1148/1263>
47. Márquez M. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. [Tesis]. Universidad Austral de Chile. [Internet] 2007 [Citado el 29 de Ago 2018]
48. Izurieta I., Borja C. y Andrade A. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. Revista Colombiana de biotecnología. [Internet] 2015 [Citado el 29 Ago 2018]. Volumen: 17(2). pp: 140-148. Disponible en:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54291/54120>
49. Baron S. Medical microbiology. 4th edition. Galveston. University of Texas Medical Branch at Galveston 1996. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>.

50. Alanis E. y Guerrero I. *Pseudomonas* en biotecnología. Revista Biotecnología [Internet] 2000 [citado el 01 Nov 2017] Volumen: 9(1): pp: 26-37. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2004_1/Pseudomonas.pdf
51. Ospina S., Atehortúa S. y Zapata J. Bacteremia por *Ochrobactrum anthropi* en paciente con obstrucción de la vía biliar. Revista INFECTIO [internet] 2009 [citado el 01 Nov 2017]. Volumen: 13(4): pp: 293-295. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v13n4/v13n4a07.pdf>
52. Morais P., Romeu F., Branco R., Chung P. y Costa M. *Leucobacter chromiireducens* sp. nov, and *Leucobacter aridicollis* sp. nov, Two new species isolated from chromium contaminated environment. Revista Systematic And Applied Microbiology [internet] 2004 [Citado el 05 Nov 2017]. Volumen 27: pp: 646-652. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202005703040>
53. *Penicillium* spp., Revista B-DataBio. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. [Internet] 2016 [Citado el 29 Ago 2018]. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Penicillum%20spp%202017.pdf>
54. Carrillo L. *Penicillium*. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad de Salta. [Internet] 2003 [Citado el 29 Ago 2018]. pp: 61-69. Disponible en: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5penicilios.pdf>
55. Bardon A. y Cartagena E. *Penicillium commune* metabolic profile as a promising source of antipathogenic natural products. Revista Natural Product Research. [Internet] 2015 [Citado el 30 Ago

2018] Volumen 29(23). pp: 2181-2187. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/272188018/download>

- 56.** Pionitelli E. Notas micológicas XI: *Tritirachium oryzae*, *Paecilomyces formosus* y alcances en la Sección *Fumigati* de *Aspergillus* con énfasis en el complejo *Aspergillus viridinutans*. Revista Boletín Biológico. [Internet] 2013 [Citado el 30 de Ago 2018]. Volumen: 28(2). pp: 58-70. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Pionitelli_Eduardo/publication/318715848_Notas_micologicas_XITritirachium_oryzae_Paecilomyces_formosus_y_alcances_en_la_Seccion_Fumigati_de_Aspergillus_con_énfasis_en_el_complejo_Aspergillus_viridinutans/links/5988b35f45851560584f90a7/Notas-micologicas-XITritirachium-oryzae-Paecilomyces-formosus-y-alcances-en-la-Seccion-Fumigati-de-Aspergillus-con-énfasis-en-el-complejo-Aspergillus-viridinutans.pdf
- 57.** Bilal S. *et al.* Endophytic *Paecilomyces formosus* LHL10 Augments Glycine max L. Adaptation to Ni-Contamination through Affecting Endogenous Phytohormones and Oxidative Stress. Revista Frontiers in Plant Science. [Internet] 2017 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen 8. pp: 1-17. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/317590188_Endophytic_Paecilomyces_formosus_LHL10_Augments_Glycine_max_L_Adaptation_to_Ni-Contamination_through_Affecting_Endogenous_Phytohormones_and_Oxidative_Stress/fulltext/597293720f7e9b4016944ab4/317590188_Endophytic_Paecilomyces_formosus_LHL10_Augments_Glycine_max_L_Adaptation_to_Ni-Contamination_through_Affecting_Endogenous_Phytohormones_and_Oxidative_Stress.pdf?origin=publication_detail
- 58.** Gutierrez A. *et al.* Patogenicidad de *Paecilomyces lilacinus* y *Metarhizium anisopliae* sobre termitas *Microcerotermes* sp. (Isoptera: Termitidae). Revista Colombiana de Entomología.

[Internet] 2005 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 31(1). pp: 9-14. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v31n1/v31n1a03.pdf>

59. Hernández R. y López C. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. [Tesis.] Pontificia Universidad Javeriana.[Internet] [Citado el 30 Ago 2018].
60. Prakash T. Selenium uptake and associated anti-oxidant properties in *Pleurotus fossulatus* cultivated on wheat straw from seleniferous fields. Revista Acta Alimentaria. [Internet] 2014 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 43(2). pp:280-287. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Tejo_Prakash_Nagaraja/publication/261360903_Selenium_uptake_and_associated_anti-oxidant_properties_in_Pleurotus_fossulatus_cultivated_on_wheat_straw_from_seleniferous_fields/links/5623896d08aea35f268656c2/Selenium-uptake-and-associated-anti-oxidant-properties-in-Pleurotus-fossulatus-cultivated-on-wheat-straw-from-seleniferous-fields.pdf?origin=publication_detail
61. Das N., Chowdhury P. y Pasman B. Cultivation Practice of *Pleurotus fossulatus* on rice Straw. Revista Journal of Life Sciences. [Internet] 2010 [Citado el 30 Ago 2018]. Disponible en:
https://www.academia.edu/810242/Cultivation_Practice_of_Pleurotus_Fossulatus_on_Rice_Straw
62. Díaz R. Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo ligninolítico *Coriolopsis rigida* en el alpeorajo. [Memorias para optar por el título de Doctora en Ciencias Biológicas]. [Internet] 2010 [Citado el 30 Ago 2018]
63. Rodríguez E. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: Expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. [Tesis

- doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. [Internet] 2006 [Citado el 30 Ago 2018].
- 64.** Preussler C., Shimizu E., Villalba L. y Zapata P. Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisei. *Revista Ciencia y Tecnología*. [Internet] 2009 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 11(12). pp: 9-16. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/recyt/n12/n12a02.pdf>
- 65.** Quintero J., Feijoo G. y Lema J. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Revista VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín*. [Internet] 2006 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 13(2). pp: 61-67. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a08.pdf>
- 66.** Ruiz F. Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. [Internet] 1998 [Citado el 30 Ago 2018].
- 67.** Córdoba R. y Cultid G. Estudio comparativo de la actividad enzimática de Lacasa (Lac), Lignina peroxidasa (LiP) y Manganeso peroxidasa (MnP) de *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos lignocelulosicos de Raquis de Palma de Aceite, bagazo de fique y pulpa de café. [Tesis]. Univeridad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Química. [Internet] 2015 [Citado el 30 de Ago 2018].
- 68.** Montoya S. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia. [Internet] 2008 [Citado el 30 de Ago 2018].
- 69.** Sandoval N. y Ospina X. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana. [Internet] 2008 [Citado el 30 Ago 2018].

70. Lopez E. Fabricación de pasta de celulosa aspectos técnicos y contaminación ambiental. Revista Ciencia y Tecnología. Universidad de Palermo, Facultad de ingeniería. [Internet] [Citado el 30 Ago 2018]. pp: 37-46. Disponible en: <https://www.palermo.edu/ingenieria/downloads/CyT6/6CyT%2005.pdf>
71. Perestelo F. *et al*/ Limited degradation of industrial, synthetic and natural lignins by *Serratia marcescens*. Revista Biotechnology Letters. [Internet] 1994 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 16(3). pp: 299-302. Disponile en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00134629>
72. Verma P. y Madamwar Datta. Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. Revista World Journal of Microbiology and Biotechnology. [Internet] 2003 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 19(6). pp: 615-618. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025115801331>
73. Hassan A. y Amr H. Lignin Biodegradation with Ligninolytic Bacterial Strain. Revista American-Eurasian Journal of Agriculture & Enviromental science.[Internet] 2009 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen 5(1). pp: 39-44. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Amr_EI_Hanafy/publication/274074703_Lignin_Biodegradation_with_Ligninolytic_Bacterial_Strain/links/5514a9ac0cf2eda0df33c162/Lignin-Biodegradation-with-Ligninolytic-Bacterial-Strain.pdf
74. Yu Hy., Zeng G., Huang G., Huang D. y Chen Y. Lignin degradation by *Penicillium simplicissimum*. Revista Europe PMC. [Internet] 2005 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 26(2). pp: 167-171. Disponible en: <https://europepmc.org/abstract/med/16004322>
75. Rodriguez A. *et al* Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. Revista Applied Microbiology and Biotechnology.[Internet] 1996 [Citado el 30 Ago 2018].

Volumen: 45(3). pp: 399-403. Disponible en:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530050702>

- 76.** Rodriguez A. *et al.* Effect of *Penicillium chrysogenum* on Lignin Transformation. Revista Applied And Enviromental Microbiology. [Internet] 1994 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 60(8). pp: 2971-2976. Disponible en:
<https://aem.asm.org/content/aem/60/8/2971.full.pdf>
- 77.** Yang JS., Yuan HL., Wang H. y Chen W. Purification and characterization of lignin peroxidases from *Penicillium decumbens* P6. Revista World Journal of Microbiology & Biotechnology. [Internet] 2005 [Citado el 30 Ago 2018] Volumen: 21. pp: 435-440. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Yuan_Hongli/publication/25242625_Purification_and_characterization_of_lignin_peroxidases_from_Penicillium_decumbens_P6/links/541842b50cf203f155ada2f3/Purification-and-characterization-of-lignin-peroxidases-from-Penicillium-decumbens-P6.pdf#page=50
- 78.** Kluczek B., Tuomela M., Hatakka A. y Hofrichter M. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. Revista Applied Microbiology and Biotechnology. [Internet] 2003 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 61(4). pp: 374-379. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1272-0>
- 79.** Singh P., Jain P., Verma R. y Jagadish R. Characterization of lignin peroxidase from *Paecilomyces* species for decolorisation of pulp and paper mill effluent. Revista Journal of Scientific & Industrial Research. [Internet] 2016 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 75. pp: 500-505. Disponible en:
<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/35155/1/JSIR%2075%288%29%20500-505.pdf>

- 80.** Ameen F., Moslem M., Saefaraz H. y Al-Sabri A. Biodegradation of cellulosic materials by marine fungi isolated from south cornice of Jeddah, Saudi Arabia. *Revista Journal Of Pure And Applied Microbiology*. [Internet] 2014 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 8(5). pp: 3617-3626. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Sarfraz_Hadi/publication/283774470_Biodegradation_of_cellulosic_materials_by_marine_fungi_isolated_from_south_corniche_of_Jeddah_Saudi_Arabia/links/588463904585150dde430657/Biodegradation-of-cellulosic-materials-by-marine-fungi-isolated-from-south-corniche-of-Jeddah-Saudi-Arabia.pdf
- 81.** Eggert C., Temp U. y Eriksson K. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Revista Federation of European Biochemical Societies FEBS*. [Internet] 1997 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 407. Pp:89-92. Disponible en:
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/S0014-5793%2897%2900301-3>
- 82.** Das N., Chowdhury P., Adhikari D. y Naskar S. Concomitant Production of Sporeless Fruiting Bodies and Laccase Release During Submerged Fermentation Practice of *Pleurotus Fossulatus*. *Revista New York Science Journal*. [Internet] 2011 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 4(8). pp: 27-32. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/260136283_Concomitant_Production_of_Sporeless_Fruiting_Bodies_and_Laccase_Release_During_Submerged_Fermentation_Practice_of_Pleurotus_Fossulatus
- 83.** Dulce S. y Mata G. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de*

Micología.[Internet] 2005 [Citado el 30 Ago 2018]. Volumen: 21.
pp: 63-69. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/883/88302111.pdf>

8. ANEXOS

ANEXO 1. HOJAS DE VIDA DE LO MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA
DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO
SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN

CODIGO 043

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	CARMEN ROSA GALLEGO
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	SECRETARIA DE SALUD BOGOTA
DIRECCIÓN	Calle 13 No 32-69
TELEFONO	3649090
E-MAIL	www.saludcapital.gov.co
FORMA DE ADQUISICIÓN	DONACIÓN POR CONVENIO

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Serratia marcescens</i>
GENERO	<i>Serratia</i>
ORIGEN – HABITAT	P Cepas confirmadas por Secretaria de Salud Bogotá-Sección Microbiología
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	1996
PROCEDIMIENTO INICIAL	Microorganismo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-20°C Caldo leche y Temperatura ambiente en B.A.B recto e inclinado
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Aislamiento primario en Mac Conkey y EMB TSI, LIA, Citrato, fenilalanina, urea, motilidad, RMVP, fermentación de carbohidratos, deaminación de aminoácidos, reducción de nitrosos Sistema rápido de identificación BBL CRYSTAL

Consecutivo	Código	Grupos Taxonómicos Representados				Identificación Molecular	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS CONSERVACION - 70°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION Nitrógeno líquido -180°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION AGUA DESTILADA ESTERIL 2 - 8°C
		MICROORGANISMOS	Porcentaje de Identificación por categoría taxonómica FENOTIPIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUIMICAS Sistema rápido BBL Crystal						
			Familia	Genero	Especie				
73	043	<i>Serratia marcescens</i> (SS)	100%	100%	99%	-----	8	5	0

**COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS – CCM-UCMC
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA
DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO
SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN**

CODIGO 100

DATOS DEL DEPOSITANTE	
DEPOSITANTE	CARMEN ROSA GALLEGO
ENTIDAD A LA QUE PERTENECE	SECRETARIA DE SALUD BOGOTA
DIRECCIÓN	Calle 13 No 32-69
TELEFONO	3649090
E-MAIL	www.saludcapital.gov.co
FORMA DE ADQUISICIÓN	DONACIÓN POR CONVENIO

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Bacillus subtilis</i>
GENERO	<i>Bacillus</i>
ORIGEN – HABITAT	Cepas confirmadas por Secretaria de Salud Bogotá-Sección Microbiología
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	2001
PROCEDIMIENTO INICIAL	Microorganismos a -70°C con subcultivo en Agar sangre
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido Caldo BHI con 10% de glicerol
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Pruebas bioquímicas

Consecutivo	Código	Grupos Taxonómicos Representados				Identificación Molecular	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS CONSERVACION - 70°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION Nitrógeno líquido -180°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION AGUA DESTILADA ESTERIL 2 - 8°C
		MICROORGANISMOS	Porcentaje de Identificación por categoría taxonómica FENOTIPIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUIMICAS Sistema rápido BBL Crystal						
			Familia	Genero	Especie				
15	100	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	100%	98%	-----	8	5	0

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO
SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN

CODIGO

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Penicillium commune</i>
GENERO	<i>Penicillium</i>
ORIGEN – HABITAT	Cepas obtenidas de muestras de suelo de un taller de mecanica
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	
PROCEDIMIENTO INICIAL	Microorganismos aislados a partir de caldo nutritivo
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido caldo Saboreaud
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Clave dicotoma

Consecutivo	Código	Grupos Taxonómicos Representados				Identificación Molecular	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS CONSERVACION - 70°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION Nitrógeno líquido -180°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION AGUA DESTILADA ESTERIL 2 - 8°C
		MICROORGANISMOS	Porcentaje de Identificación por categoría taxonómica FENOTIPIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUIMICAS						
			Familia	Genero	Especie				
15		<i>Paecilomyces formosus</i>	100%	100%	98%	-----	-----	-----	0

Codigo GenBank: [gi1233034756|MF671952.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi1233034756|MF671952.1)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO
SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN

CODIGO

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Paecilomyces formosus</i>
GENERO	<i>Paecilomyces</i>
ORIGEN – HABITAT	
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	
PROCEDIMIENTO INICIAL	Microorganismos aislados a partir de caldo nutritivo
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido caldo Saboreaud
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Clave dicotoma

Consecutivo	Código	Grupos Taxonómicos Representados				Identificación Molecular	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS CONSERVACION - 70°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION Nitrógeno líquido -180°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION AGUA DESTILADA ESTERIL 2 - 8°C
		MICROORGANISMOS	Porcentaje de Identificación por categoría taxonómica FENOTIPIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUIMICAS						
			Familia	Genero	Especie				
10		<i>Paecilomyces formosus</i>	100%	100%	99%	-----	-----	-----	0

Codigo GenBank: [gi1137656094|KY549810.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi1137656094|KY549810.1)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO
LABORATORIO CENTRAL – AREA CEPARIO
SISTEMA DE DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
FICHA DE IDENTIFICACIÓN

CODIGO

IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
MICROORGANISMO	<i>Pleurotus fossulatus</i>
GENERO	<i>Pleurotus</i>
ORIGEN – HABITAT	
LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DEL AISLAMIENTO	Bogotá
FECHA / HORA DE AISLAMIENTO	
PROCEDIMIENTO INICIAL	Microorganismos aislados a partir de caldo nutritivo
NIVEL DE SEGURIDAD	1
CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO	-70°C y -180°C en nitrógeno líquido caldo Saboreaud
PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACION	Características de las colonias. Clave dicotoma

Consecutivo	Código	Grupos Taxonómicos Representados				Identificación Molecular	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS CONSERVACION - 70°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION Nitrógeno líquido -180°C	NUMERO DE EJEMPLARES CATALOGADOS PRESERVACION AGUA DESTILADA ESTERIL 2 - 8°C
		MICROORGANISMOS	Porcentaje de Identificación por categoría taxonómica FENOTIPIFICACIÓN CON PRUEBAS BIOQUIMICAS						
			Familia	Genero	Especie				
15		<i>Pleurotus fossulatus</i>	100%	99%	99%	-----	-----	-----	0

Codigo GenBank: [gi|1182627315|KY962503.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/gi/1182627315|KY962503.1)