



**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA EN MACROHONGOS DE BOSQUE
HÚMEDO TROPICAL, CHOCÓ, COLOMBIA**

VALENTINA FERNÁNDEZ BARRETO

ASESORA INTERNA

MARTHA LUCIA POSADA BUITRAGO, Ph.D EN MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C. OCTUBRE DE 2022

Agradecimientos

Uno de los resultados más significativos que me deja el desarrollo de este trabajo de grado es la experiencia vivida a lo largo de la realización del mismo. Agradezco a El Chocó y a su cálida población por el amable recibimiento en sus territorios y en su cultura, llevo en el corazón a quienes fueron de apoyo para que el trabajo se llevara a cabo. A Mirna y a Guillermo, la hospitalidad de su hogar en Panguí se les agradece inmensamente. A Camilo, Daniel, Zamir y Servelio, su experiencia, diligencia y enseñanza hizo posible un entendimiento holístico de las problemáticas en Lloró. A Clara Lucía Sierra, por hacer posible el contacto y salida de campo. A mis padres les agradezco inmensamente por apoyarme en el desarrollo de mi vida académica y profesional, agradezco su cariño, su comprensión y responsabilidad, su apoyo fue indispensable en esta etapa de mi vida. A Richard, por acompañarme, apoyarme y aportar incalculablemente en este trabajo. Valentina Garzón, una gran amiga a quien le agradezco por su ayuda, apoyo infinito y compañía desde el primer momento. A la profesora Martha Lucía, le agradezco por su desempeño como asesora, por compartir sus conocimientos, experiencias y momentos.

Tabla de contenido

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	10
General.....	10
Específicos.....	10
ANTECEDENTES.....	11
MARCO REFERENCIAL.....	17
Generalidades de los macrohongos.....	17
Caracterización taxonómica y molecular de macrohongos.....	18
Compuestos recalcitrantes.....	19
Lignina	19
Colorantes	20
Pesticidas	20
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	20
Metales pesados	21
Dioxinas.....	21
Biorremediación	21
Biorremediación enzimática de la lignina	22
Enzimas modificadoras de la lignina.....	22
Enzimas auxiliares de degradación de la lignina.....	24
Madera blanda y madera dura	24
DISEÑO METODOLÓGICO	26
Tipo de investigación y nivel	26
Técnicas y procedimientos	26
Área de estudio	26
Recolección de especímenes.....	27
Aislamiento primario	27

Identificación molecular	28
Identificación taxonómica	30
Crecimiento en medio modificado con extracto de sustrato leñoso.....	30
Producción de enzimas ligninolíticas	31
RESULTADOS.....	32
Recolección de especímenes	32
Aislamiento primario	33
Crecimiento en medio modificado con extracto de sustrato leñoso.....	33
Producción de enzimas ligninolíticas.....	34
Identificación molecular y caracterización taxonómica	35
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	48
SOCIALIZACIÓN EN EVENTOS Y PRODUCCIÓN ACADÉMICA	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	

Índice de figuras

Figura 1. Registro de publicaciones sobre biorremediación en Colombia.

Figura 2. Ciclo de vida de macrohongos.

Figura 3. Esquema del cluster de genes del ADNr fúngico.

Figura 4. Mapa político que denota los municipios de Nuquí y Lloró en Chocó, Colombia.

Figura 5. Recorridos de recolección de hongos macrohongos.

Figura 6. Hongos macrohongos en sustrato leñoso en los municipios de Lloró y Nuquí, Chocó.

Figura 7. Hongos aislados en medios de cultivo PDA y agar avena.

Figura 8. Medio modificado con extracto de sustrato leñoso de urapán y pino.

Figura 9. Medios modificados con colorantes Azure B y Rojo fenol.

Figura 10. Visualización de los productos de la PCR de la región ITS con los *primers* ITS1-ITS4.

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre las propiedades de MnP, LiP, Lcc y peroxidasa decolorante de tinte (DyP).

Tabla 2. Composición química de la madera blanda y la madera dura.

Tabla 3. *Primers* para la amplificación de genes de ADN ribosomal fúngico.

Tabla 4. Preparación de PCR para la amplificación de la región ITS.

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS.

Tabla 6. Registro y distribución de los aislamientos que presentaron actividad ligninolítica.

Tabla 7. Homología de las secuencias de la región ITS del ADNr de hongos aislados que presentaron actividad ligninolítica.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA EN MACROHONGOS DE BOSQUE
HÚMEDO TROPICAL, CHOCÓ, COLOMBIA

RESUMEN

Colombia es un país biodiverso que se ha visto azotado por la minería ilegal, la deforestación indiscriminada y la producción comercial de madera, entre otras; por lo tanto, resulta fundamental explorar mecanismos de biodegradación de los residuos lignocelulósicos de dichas actividades para contribuir con el mantenimiento y la sostenibilidad del ambiente. Es por ello que, aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación han tomado fuerza ya que representa una alternativa sostenible, económica para el tratamiento de ambientes afectados; para ello, se ha puesto la mirada en el potencial biorremediador de los hongos, capaces de producir complejos enzimáticos que degradan compuestos químicos recalcitrantes y generalmente tóxicos. En este contexto, surge la necesidad de determinar la producción de enzimas oxidantes tales como lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas para identificar su potencial biotecnológico y biorremediador. En este trabajo se recolectaron macrohongos de sustrato leñoso del bosque húmedo tropical de los municipios de Lloró y Nuquí del Chocó biogeográfico, estos fueron aislados en el laboratorio mediante técnicas de cultivo convencional. Posteriormente, se determinó el crecimiento de los hongos aislados en medio modificado con extracto de sustrato leñoso de urapán (*Fraxinus* sp.) y pino (*Pinus* sp.), y con los que crecieron en sustrato leñoso se evaluó cualitativamente la actividad enzimática de los macrohongos en medios de cultivo modificados con colorantes Azure B y Rojo. Se observó potencial en la producción enzimática de lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas en especies de los géneros *Trametes* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinus* sp., *Rigidoporus* sp., *Dacryopinax* sp., *Pycnoporus* sp. y *Mycena* sp.

Palabras Clave: Macromicetos, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA EN MACROHONGOS DE BOSQUE
HÚMEDO TROPICAL, CHOCÓ, COLOMBIA

ABSTRACT

Colombia is a biodiverse country that has been afflicted by illegal mining, indiscriminate deforestation, and commercial production of wood, among others; therefore, it is essential to explore mechanisms of biodegradation of lignocellulosic residues from these activities to contribute to the maintenance and sustainability of the environment. That is why biotechnological applications such as bioremediation have gained strength since it represents a sustainable, economical alternative for the treatment of affected environments. To do this, the focus has been on the bioremediation potential of fungi, capable of producing enzyme complexes that degrade recalcitrant and generally toxic chemical compounds. In this context, there is a need to determine the production of oxidizing enzymes such as lignin peroxidases and manganese peroxidases to identify their biotechnological and bioremediation potential. In this work, macrofungi from woody substrate were collected from the tropical humid forest of the municipalities of Lloró and Nuquí at the biogeographic region of Chocó, which were isolated in the laboratory using conventional cultivation techniques. Subsequently, the growth of the fungal isolates in modified medium with woody substrate extract of urapán (*Fraxinus* sp.) and pine (*Pinus* sp.) was determined, and with those that grew in woody substrate, the enzymatic activity of the macrofungi was qualitatively evaluated in culture media modified with Azure B and Red dyes. Potential in the enzymatic production of lignin peroxidases and manganese peroxidases was observed in species of the genera *Trametes* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinus* sp., *Rigidoporus* sp., *Dacryopinax* sp., *Pycnoporus* sp. and *Mycena* sp.

Keywords: Macromycetes, lignin peroxidase, manganese peroxidase.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país megadiverso y la gran diversidad de hongos no es la excepción, encontrándose cerca de 7273 (1), especies de las descritas a nivel mundial y sin contar las zonas inexploradas(2). Dicha biodiversidad hoy se ve afectada por actividades antrópicas como la deforestación, contaminación de cuerpos de agua, suelo y el cambio climático (3). Asimismo, hay un gran desconocimiento de la diversidad y del potencial biotecnológico de las especies fúngicas que habitan en zonas de difícil acceso, como el departamento del Chocó; en consecuencia, resulta vital profundizar en el estudio del potencial biotecnológico de la funga colombiana.

Gracias a los avances científicos se ha puesto la mirada en el potencial biorremediador de los hongos que se caracterizan por producir complejos enzimáticos como las enzimas oxidantes manganeso peroxidasas (MnP), lignina peroxidasas (LiP) y lacasas (Lcc) que les permiten degradar un extenso número de compuestos orgánicos recalcitrantes (4), como lo es la lignina y otros compuestos con alta estabilidad química, tales como los tintes industriales, compuestos organoclorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos que, sin el manejo adecuado o un riguroso tratamiento, se vierten en los cuerpos de agua y suelos generando contaminación y deterioro de la diversidad del ecosistema.

Por lo tanto, es fundamental explorar mecanismos de biodegradación de estos residuos lignocelulósicos e industriales para contribuir con el mantenimiento y la sostenibilidad del ambiente. De tal modo que, el fin de este estudio es evaluar la producción de estas enzimas oxidantes a partir de hongos nativos del bosque tropical húmedo del Chocó, para establecer su potencial biotecnológico y biorremediador para mitigar el efecto contraproducente de estos compuestos en el medio ambiente. Adicionalmente, se espera contribuir con la transferencia de conocimiento científico de los hongos y llevar a la comunidad valiosa información para generar conciencia sobre la biodiversidad de estos organismos e influir en su conservación.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad enzimática ligninolítica de macrohongos de bosque tropical húmedo de los municipios de Lloró y Nuquí, Chocó, Colombia y su potencial biotecnológico.

Objetivos específicos

- Identificar macrohongos del bosque tropical húmedo de los municipios de Lloró y Nuquí, Chocó, Colombia por análisis molecular y claves taxonómicas.
- Determinar el crecimiento de los macrohongos frente a medios modificados con compuestos lignocelulósicos.
- Evaluar la producción enzimática de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa de los macrohongos mediante el crecimiento en medios modificados con colorantes.

3. ANTECEDENTES

La magnitud global de especies del reino Fungi mayormente aceptada es la de Hawksworth *et al.* (5) quien estima un aproximado de 1.5 millones de especies, sin embargo, en estimaciones más recientes y menos conservativas, Hawksworth y Lücking (6) hablan de un rango entre 2,2 a 3,8 millones, con 120.000 especies actualmente aceptadas, donde el 8 %- 3 % están nombradas.

Gaya *et al.* (1) afirman que en Colombia se han reportado 7.273 especies de hongos en donde se encuentran grupos como macrohongos, hongos liquenizados, carbonos, royas y levaduras, entre otros. Por otro lado, mencionan que muchos de los saprótrofos (alrededor del 29%) son descomponedores de madera (al menos 400 especies), y desempeñan un papel importante en el ciclo de nutrientes de los ecosistemas, ya que reciclan grandes cantidades de biomasa.

Ahora bien, como menciona IDEAM *et al.* (7), dentro de la regulación de procesos climatológicos en los territorios es necesario contemplar: “el ciclo anual y la distribución espacial de la temperatura, la humedad, el viento, la precipitación y de los fenómenos extremos” (7). En este caso, cuando se habla del Océano Pacífico, la migración de la Zona de Confluencia Intertropical aporta humedad al sector sur de la vertiente occidental de la Cordillera Occidental; asimismo, en el sector norte del Pacífico colombiano un sistema cuasipermanente dirige la humedad hacia la misma cordillera. Es por tales condiciones, que esta región el país es una de las zonas más lluviosas, adicionalmente, hay influencia en la variación del Océano Pacífico por los periodos extremos de El Niño y La Niña. Dentro de las zonas más lluviosas del Pacífico se encuentran los departamentos del Cauca y del Chocó; en dichas zonas la precipitación anual sobrepasa los 10.000 milímetros al año.

López-Quintero *et al.* (8). en su investigación mencionan que gran parte de la biodiversidad fúngica mundial, inexplorada, se encuentra en regiones tropicales, donde la diversidad de hongos puede ser mayor que en las regiones templadas, debido a condiciones ambientales más favorables durante todo el año, una mayor diversidad de plantas vasculares que crean nichos, microhábitats de hongos, y la presencia de muchos ecotonos. Estos autores concluyen que la presencia de esporocarpos de macrohongos está fuertemente influenciada por la estacionalidad. La mayor producción de esporocarpos se observó en troncos y suelo, y el sustrato del tronco produjo los

macrohongos más diversos y productivos.

Según la Lista Roja Mundial de Hongos publicada por Mueller *et al.*(9) los bosques albergan en gran parte los hongos evaluados y mejorados; dentro de las amenazas se encuentra principalmente la pérdida y degradación del hábitat, sobre todo por las actividades agrícolas, la deforestación, la silvicultura intensificada; así mismo, el cambio climático constante y acelerado contribuye a la pérdida del hábitat. También, actividades antrópicas con impactos directos e indirectos de incendios, especies invasoras, contaminación y cambio climático. Con ese registro, los autores resaltan lo imprescindible de tomar acciones y establecer las políticas necesarias específicas antes que estas y otras especies se extingan y las consecuencias ecológicas resultantes.

Lodge *et al.* (10) enfatizan en la planificación de proyectos, que debe incluir una investigación bibliográfica de antecedentes sobre la vegetación y la geología del área de estudio, así como, sobre los taxones de hongos que probablemente se encontrarán, las técnicas para recolectar, documentar especímenes y datos. También, proporcionan algunas ideas para monitorear poblaciones de macrohongos.

Por otro lado, Gaitán-Hernández *et al.* (11), mencionan dos técnicas de aislamiento, por fragmento del hongo o por esporas. En la primera, el hongo se corta longitudinalmente y los fragmentos del micelio se colocan en el medio de cultivo. Cuando son hongos silvestres, el autor recomienda lavar con una solución de hipoclorito de sodio al 5% el fragmento. En la segunda técnica, la esporada se obtuvo colocando el carpóforo del hongo con las lamelas hacia abajo sobre papel estéril por un tiempo de 6 a 8 horas, se retira el hongo del papel que tiene las esporas, se seca en una incubadora, se corta un 1 cm², se introduce en agua destilada estéril fría, y se agita para mantener las esporas en el líquido para luego colocarlas en el medio de cultivo. Es fundamental evitar la contaminación por bacterias y hongos, por ello, se les puede aplicar antibióticos a los medios de cultivo del aislamiento.

Con relación a los sustratos y técnicas de identificación a tener en cuenta, Chanagá *et al.* (12) . identificó, por morfología y filogenia, hongos de residuos celulolíticos del Valle de Aburrá con potencial degradación de tintes industriales. Los aislamientos fueron purificados a partir de

cultivos mono hifales. La identificación molecular la realizaron mediante la amplificación y secuenciación de las regiones ITS del ADNr (ITS1 e ITS4) y 5' del ADNr 28S. La cepa con mejor capacidad de decoloración de tintes sintéticos, *Leptosphaerulina americana*, fue sometida a análisis por RAPDs, para su genotipificación.

En cuanto a la evaluación de actividades enzimáticas ligninolíticas, Montoya *et al.* (13), plantean que los métodos cualitativos son una alternativa para rastrear enzimas lignocelulósicas. Para detectar ligninasas emplearon reactivos que las óxido-reductasas pueden degradar y midieron por espectrofotometría. Para la detección de LiP utilizaron Azure B y la detección de lacasa mediante la reacción oxidativa con el reactivo ABTS; lo anterior con el objetivo de determinar el mayor potencial para degradar celulosa y lignina de diez especies de hongos.

Fonseca *et al.* (14), mencionan que enzimas como la LiP son capaces de oxidar directamente unidades no fenólicas, mientras que la MnP y Lcc oxidan preferiblemente compuestos fenólicos, aunque las unidades no fenólicas pueden eventualmente degradarse en presencia de mediadores. Evaluaron el potencial en la producción de enzimas ligninolíticas en hongos de pudrición blanca, originarias de la Provincia de Misiones en Argentina, y categorizaron las cepas más prometedoras para futuras aplicaciones biotecnológicas en conversión de biomasa. Entre las conclusiones y aporte a la investigación cabe destacar la capacidad demostrada de degradación del licor Kraft lograda por algunos hongos probados a lo largo de 14 días de cultivo, por lo cual sugirieron su uso potencial para la biorremediación de los efluentes de la industria de la fabricación de pasta. Además, las enzimas oxidativas secretadas por estos hongos pueden mitigar el impacto ambiental de los procesos industriales y la fabricación de productos químicos durante la conversión de biomasa, entre otras aplicaciones. También, Pollegioni *et al.* (15), centraron su revisión sobre enzimas degradadoras de lignina en la expresión de enzimas heterólogas y estudios de ingeniería de proteínas que tienen como objetivo mejorar su uso práctico. Además, de enfocarse en las tendencias recientes de la biotecnología verde ligninolítica para sugerir la aplicación potencial (industrial) de enzimas ligninolíticas, las perspectivas futuras podrían incluir la sinergia entre enzimas naturales de diferentes fuentes y otros métodos de pretratamiento que pueden ser necesarios para obtener resultados óptimos en tecnologías basadas en enzimas y respetuosas con el medio ambiente.

Chaparro *et al.*(16) evaluaron la actividad ligninolítica de lacasa y celobiosa deshidrogenasa con pruebas semicuantitativas en hongos recolectados de un bosque subandino; seleccionaron los hongos con mejor actividad enzimática según el nivel de descomposición del tronco donde se hallaban, como *Cookeina sulcipes*, *Xylaria polymorpha* y *Earliella* sp.; también observaron que el aumento de la descomposición era proporcional al incremento de la producción de celobiosa deshidrogenasa.

Quintero *et al.* (17), realizaron cultivos en fase sólida empleando por separado los residuos lignocelulósicos; viruta de madera, carozo de maíz y compost de jardinería y determinaron por espectrofotometría la producción de las enzimas manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa para los hongos *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium*. Se observó que la viruta de madera permitió mayores títulos de la enzima MnP, mientras que en carozo de maíz hay mejor actividad de LiP. En cuanto a los hongos ambientales, no fue posible determinar la presencia de enzimas ligninolíticas y en los cultivos sobre suelo con hongo inmovilizado con carozo de maíz, se detectó muy baja actividad ligninolítica.

En 2016, Chan-Cupul *et al.*(18), aislaron macrohongos nativos del estado de Veracruz, México y evaluaron su actividad enzimática ligninolítica. El aislamiento de los hongos se realizó en placas con agar PDA suplementado con cloranfenicol y benomyl (3 ppm). Las actividades lacasa, MnP y contenido de proteína fueron cuantificadas espectrofotométricamente. Para la actividad lacasa se midió la oxidación del ABTS. La actividad MnP se determinó por el método de Glenn y Gold y, el contenido de proteína total en fermentación líquida se cuantificó con el método de Bradford.

En 2019, Carrillo (19) determinó el potencial ligninolítico de macrohongos en un bosque alto andino en Tabio, Cundinamarca. Para ello, sembró fragmentos de hongos en agar PDA con cloranfenicol a 25°C por 8 días, después realizó una nueva siembra a partir de ese aislamiento. Para evidenciar la actividad enzimática ligninolítica realizó su estudio según la metodología previamente mencionada por Chan-Cupul *et al.* (18). Asimismo, para calcular una medida semicuantitativa en la producción enzimática se dividió el halo de oxidación en el halo de crecimiento de la colonia para calcular el índice de potencia (IP). En los resultados se encontró que ninguno de sus hongos produjo la enzima LiP, ya que no oxidaron el reactivo Azure B,

mientras que para lacasa el que mejor potencial de producción lo tuvo *Auricularia sp.*H12 y *Ganoderma sp. H161* para MnP.

Falade *et al.* (20) analizaron el potencial de las enzimas ligninolíticas en la eliminación de disruptores endocrinos (EDC) en aguas residuales, y propusieron un nuevo esquema de tratamiento enzimático para la eliminación de EDC de las aguas residuales, que implica el uso de enzimas extracelulares ligninolíticas inmovilizadas en lugar del cultivo celular completo, como una alternativa idónea, ya que aumenta la estabilidad y funcionamiento de la enzima.

Agrawal *et al.* (21) aislaron *Ganoderma lucidum* y encontraron que este hongo era capaz de degradar el 99,65 % del fenantreno y el 99,58 % del pireno después de 30 días de incubación a 27°C en caldo de sales minerales. Este hongo también produjo cantidades significativas de enzimas ligninolíticas, es decir, lacasa, LiP y MnP. Su estudio concluyó que *G. lucidum* puede ser un potente degradador de fenantreno y pireno en un ambiente contaminado. Además, en la industria textil, Sudiana *et al.* (22) también utilizaron una especie de *Ganoderma* para la degradación de los colorantes azo sintéticos y remazol negro B con gran potencial para el tratamiento de aguas residuales textiles. Los autores evidenciaron que la eliminación del color del remazol negro B era más efectiva utilizando las enzimas ligninolíticas de *Ganoderma sp.* que usando el hongo *Ganoderma sp.*

Lee *et al.* (23) seleccionaron las cepas *Peniophora incarnata*, *Peniophora nuda*, *Phanerochaete sordida* y *Mycoaciella bispora* para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno en medio líquido siendo las cepas *Peniophora incarnata* y *Mycoaciella bispora* las que presentaron mejor degradación de los PAHs, y con ellas se realizó la biorremediación del suelo contaminado con creosota. En este estudio presentó mejor resultado la cepa de *Peniophora incarnata*, mostrando su potencial para la degradación de PAHs y compuestos xenobióticos.

El-Din *et al.* (24), aislaron y seleccionaron cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* con alto contenido de lignina peroxidasa para utilizarlas como pretratamiento para el despulpado (biopulpado) de paja de arroz. Se determinó que el pretratamiento con la cepa de *Pl.*

ostreatus obtuvo mayor pérdida de la producción de pulpa y mayor degradación de la lignina, que es deseada en el proceso de despulpado de la paja de arroz.

Camacho-Morales *et al.* (25) evaluaron la degradación del herbicida paraquat, para ello aislaron 54 macrohongos del sureste de México; diez de estas cepas fueron capaces de crecer en un medio de cultivo sólido en presencia de 200 ppm de paraquat que luego fueron sembradas en medio líquido; de las 20 cepas, tres presentaron los mayores niveles de degradación del compuesto, *Trametes pavonia* (54,2%), *Trametes versicolor* (54,1%) e *Hypholoma dispersum*, siendo potenciales degradadores del herbicida paraquat.

Rentería-Arango *et al.* (26) reportan que no hay registro de publicaciones relacionadas con la biorremediación en el departamento del Chocó (Figura 1).



Figura 1. Registro de publicaciones sobre biorremediación en Colombia.
Hechos Microbiol, Rentería-Arango *et al.* (26).

Este estudio determinó que las metodologías mayormente empleadas son la fitorremediación, la bioestimulación y la bioaumentación. También, que los estudios de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos constituyen un 68 % (40/59); mientras que los estudios de biorremediación de aguas conforman un 20 % (12/59), los de aguas residuales un 6,8 % (4/59), y los de biorremediación en lixiviados un 3,4 % (2/59).

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Generalidades de los macrohongos

Pertencen a los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*, por lo general, los macrohongos terrestres son saprobios o simbioses micorrízicos, pero algunos son patógenos de plantas, animales u hongos (10). El conjunto de hifas forma el micelio que en las condiciones nutricionales adecuadas se transforma en pequeños grumos que van aumentando de tamaño hasta formar la típica seta (Figura 2); cuando ésta ha madurado forma esporas para reproducirse, en su ciclo de vida es necesaria la formación de esporangios sexuales (11). En la subdivisión *Ascomycotina* se nombran ascas, y éstas generan esporas conocidas como ascosporas. La unión de ascas conforma los ascocarpos de los ascomicetos (27) (Figura 2). En la subdivisión *Basidiomycotina* se representan hongos que en su ciclo de vida forman esporas conocidas como basidiosporas, las cuales a su vez son desarrolladas en los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos, conocidos como basidiocarpos (4,27) (Figura 2).

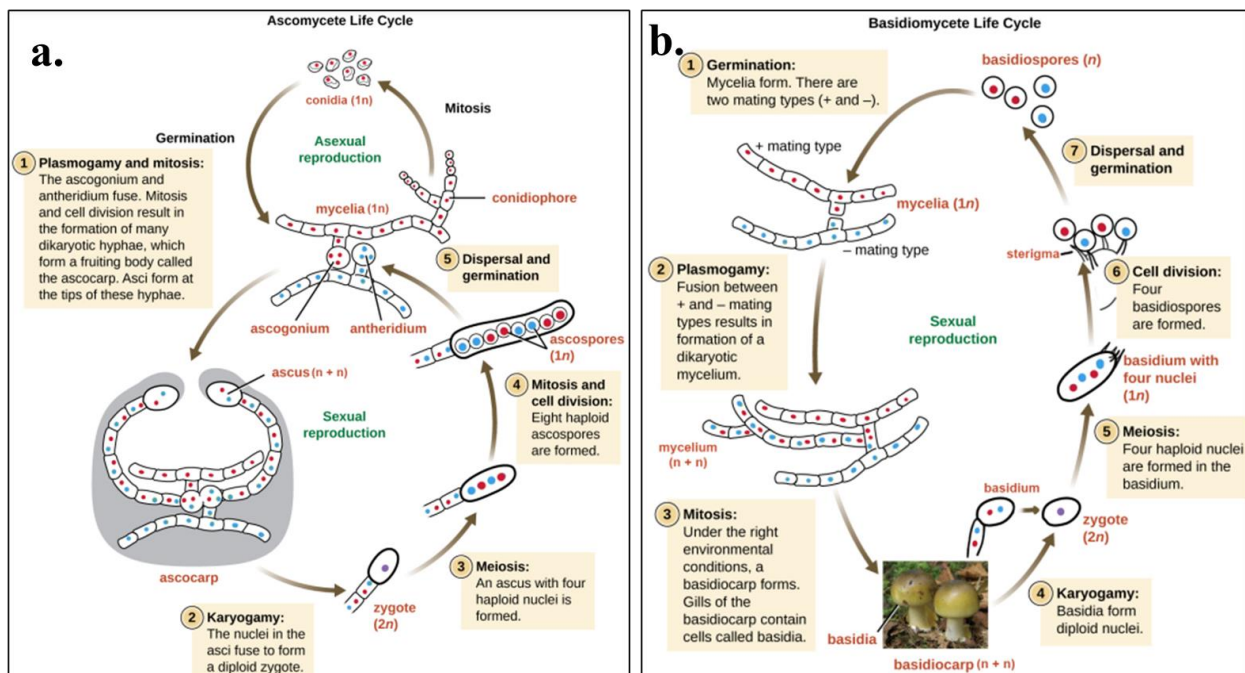


Figura 2. Ciclo de vida de macrohongos. **a.** Ciclo de vida de un ascomiceto. **b.** Ciclo de vida de un basidiomiceto. Modificado de Morrow y Algiers (27).

Ramírez y Arango (28) resaltan la importancia de estos microorganismos en la naturaleza, ya que actúan en el ciclo biogeoquímico del carbono, tienen beneficios medicinales y son eficaces en la degradación de material recalcitrante gracias a la producción de enzimas antioxidantes y enzimas

ligninolíticas; referente a la producción enzimática, esta adicionalmente tiene aplicación en la medicina por ser ricas en β -D glucanos, proteoglicanos, terpenos, compuestos fenólicos y en la industria alimentaria por ser excelente fuente de nutrientes, bajos en calorías y libres de colesterol.

4.2 Caracterización taxonómica y molecular de macrohongos

La identificación de los hongos ha evolucionado con el tiempo, gracias a la incorporación de técnicas moleculares es que se ha podido complementar métodos convencionales como la taxonomía basada en la morfología y conocer así la diferenciación entre especies. El pilar de los métodos de identificación convencionales es el análisis visual de los cuerpos fructíferos que, junto a las claves dicotómicas de las especies, se basan tanto en la macroscopía del basidioma y los himenóforos, como en la microscopía del micelio, los órganos del himenio y las estructuras reproductivas como las esporas. El inconveniente que presentan estos métodos convencionales es que requieren experticia en el tema para dar una con buena identificación. Además, los métodos de diagnóstico basados en análisis y pruebas de cultivos puros requieren mucho tiempo y, a menudo, no son adecuados para diferenciar especies cercanas; asimismo, el aislamiento de estos hongos es complejo y a menudo no es práctico, aun así se haga uso de medios selectivos y por la posible presencia de contaminantes fúngicos de crecimiento rápido.(29)

Sin embargo, técnicas moleculares como la PCR, han revolucionado la identificación de hongos por ser específicas, sensibles y rápidas, ya que con estas se pueden seleccionar marcadores moleculares tanto en regiones codificantes como no codificantes del ADN del genoma nuclear y mitocondrial, donde el polimorfismo de la secuencia de nucleótidos de estas regiones puede proporcionar una gran cantidad de caracteres de diagnóstico adecuados para la identificación de hongos en diferentes niveles taxonómicos. Hoy día se mantiene como referencia el protocolo para la amplificación de ADN ribosomal en la identificación de hongos establecido por White *et al.* (30), en 1990, en donde describen los pares de primers diseñados en su estudio para amplificar varios segmentos de los genes del ADNr nuclear y mitocondrial de los hongos, es importante resaltar que utilizar ADNr tiene como ventajas que se utilizar pequeñas cantidades para la amplificación, se pueden secuenciar ambas cadenas del gen y el método es compatible con gran variedad equipos para la secuenciación de ADN. (30)

La longitud aproximada de la región ITS es de 500 pb \pm 100 pb, y contiene dos espaciadores variables, ITS-1 e ITS-2, que están separados por el gen 5.8S rRNA altamente conservado. La región ITS está flanqueada por el gen 18S rRNA en el extremo 5'- del espaciador ITS-1 y por el gen 28S rRNA en el 3' del espaciador ITS-2 (Figura 3). Los genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S son altamente conservados y permiten el diseño de "primers universales" para amplificar ITS-1, ITS-2 o toda la región ITS en la gran mayoría de los hongos. (30)

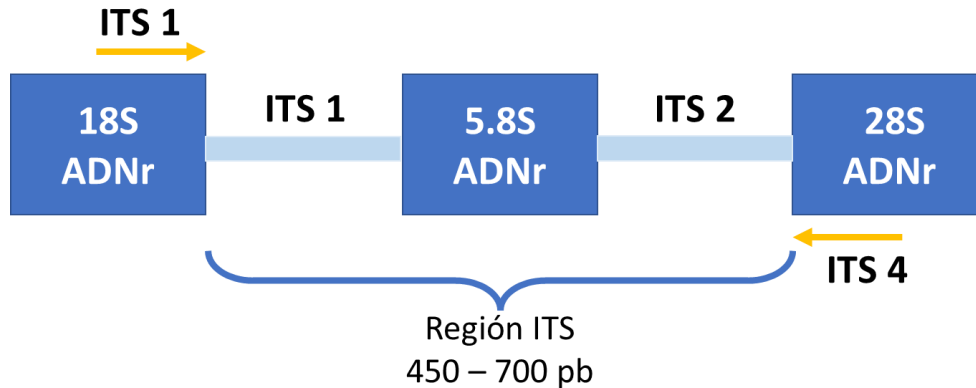


Figura 3. Esquema del cluster de genes del ADNr fúngico. Los espacios transcritos internos ITS 1 e ITS 2, separan los genes que codifican las subunidades de ARNr 18S, 5.8S y 28S. Las ubicaciones aproximadas de los primers utilizados (ITS 1-F e ITS 4-R) para la amplificación y secuenciación del ADN indicado bajo las flechas y generando un fragmento específico que oscila entre 450 y 700 pb.

4.3 Compuestos recalcitrantes

Son compuestos con lenta o nula biodegradación que persisten en el ambiente por mucho tiempo, muchos de estos son compuestos xenobióticos, es decir, sustancias químicas artificiales como medicamentos, pesticidas, cosméticos, saborizantes, aditivos alimentarios, productos químicos industriales y compuestos derivados del petróleo, o compuestos naturales como la lignina (31–33).

4.3.1 Lignina

La lignina es un polímero tridimensional amorfo compuesto por subunidades fenilpropanoides, es el segundo polímero en abundancia después de la celulosa, constituye cerca del 15% de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera, donde se encuentra en una proporción del 20 al 35%; actúa como un material aglutinante y participa en el entrecruzamiento de la celulosa que proporciona resistencia, rigidez y dureza adicionales a la pared celular, como también protege a las células vegetales de la hidrólisis enzimática y otras condiciones de estrés ambiental. El 98% de

este polímero renovable se quema como fuente de energía en la industria de la celulosa y el papel (34).

4.3.2 Colorantes

Los tintes se utilizan ampliamente en las industrias textil, de impresión de papel, fotografía en color, cosmética, farmacéutica y del cuero. Son compuestos orgánicos coloreados utilizados para impartir color a un sustrato como tela, papel, plástico, etc. Un cromógeno sin auxocromo nunca puede actuar como colorante. Algunos cromóforos importantes son de los grupos funcionales azo, nitrilo, nitroso y tio (35). El colorante debe contener no sólo un grupo cromóforo sino también otro grupo que imparta al compuesto la propiedad de disociación electrolítica. Dichos grupos auxiliares se conocen como auxocromos, algunos son -OH, -NH, -NHR, -COOH, -SOH y -NR. Las ineficiencias en el proceso de teñido y algunos problemas técnicos pueden dar como resultado la descarga de colorantes en las aguas residuales durante el procesamiento de textiles que, finalmente, terminan en el medio ambiente. Globalmente, se calcula que entre el 5 y el 10 % de los tintes se pierden en el efluente durante el proceso de teñido y afectan los ecosistemas (36).

4.3.3 Pesticidas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los pesticidas se han definido como un compuesto químico que se utiliza para controlar la población de insectos, plagas, roedores y enfermedades de las plantas (33). Los principales países consumidores de pesticidas incluyen a China, Estados Unidos, Argentina, India, Japón, Canadá, Brasil, Francia, Italia y Tailandia (37). Los impactos ambientales asociados a los pesticidas se deben principalmente a la recalcitrancia de estos, ya que la disolución depende de la naturaleza del compuesto, las técnicas de aplicación de pesticidas y los factores climáticos; varios de estos no se degradan fácilmente, se acumulan en los suelos o se movilizan de un sitio a otro en forma de productos degradados, con toxicidad desconocida para la salud humana y animal (38).

4.3.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) son sustancias químicas que se encuentran naturalmente en el carbón, el petróleo crudo y la gasolina (39), es decir, se forman debido a la combustión parcial de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno; además, son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos (36). Ejemplos de estos incluyen naftaleno,

acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno (B[a]P), indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[g,h,i]perileno y dibenzo[a,h]antraceno (40).

4.3.5 Metales pesados

Los metales pesados son elementos y metaloides que se encuentran en la naturaleza con alta densidad o peso atómico que pueden considerarse un riesgo grave para la salud humana y el medio ambiente, como Pb, Cr, Hg, U, Se, Zn, As, Cd, Ni, etc. (41). En investigaciones actuales, la biorremediación de metales pesados apunta a emplear sistemas microbianos como un método atractivo porque tales técnicas son rentables y compatibles con el medio ambiente (36).

4.3.6 Dioxinas

Las dioxinas y furanos hacen parte de los compuestos más peligrosos por su altísima toxicidad. Estos compuestos son los principales subproductos de varios procesos industriales como la preparación de pesticidas, el blanqueo de papel y pulpa, la incineración de desechos, y conservantes de la madera, como por ejemplo PCP, tetraclorofenol y triclorofenol (36).

4.4 Biorremediación

La etimología del término biorremediación se compone por “bios” que significa vida y “remediar” que es resolver un problema. En pocas palabras, la biorremediación es una herramienta para restaurar ambientes contaminados y recuperar el ecosistema (42). Varias especies de arqueas, bacterias, algas y hongos han demostrado tener capacidad para biorremediar (43).

Según el lugar en donde se lleve a cabo el proceso se puede hablar de dos tipos de biorremediación: *In Situ* y *Ex Situ*, la primera hace referencia al tratamiento que se realiza en el lugar propio donde sucedió la contaminación, es un método muy efectivo y con menor costo; la segunda hace referencia al tratamiento que se lleva a cabo aquí tiene lugar en algún lugar fuera del sitio de contaminación, asimismo se puede clasificar según la metodología a emplear, donde principalmente se hace la distinción entre usar el microorganismo y los metabolitos que este sintetice, como las enzimas (43).

4.5 Biorremediación enzimática de la lignina

Las enzimas relacionadas con procesos de biorremediación, se encargan de catalizar reacciones bioquímicas involucradas en las vías de degradación de los contaminantes, es decir, disminuyen la energía de activación de las moléculas al aumentar la velocidad de reacción (43). Como se mencionó anteriormente, la lignina es un compuesto recalcitrante que cuenta con una estructura muy estable y compleja, lo que complica su degradación. Sin embargo, algunos hongos son capaces de degradarla gracias a los complejos enzimáticos que producen, estas se pueden dividir en dos grupos principales: enzimas modificadoras de la lignina (LME) y enzimas auxiliares de degradación de la lignina (LDA).(44)

4.5.1 Enzimas modificadoras de la lignina

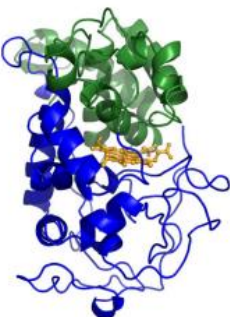
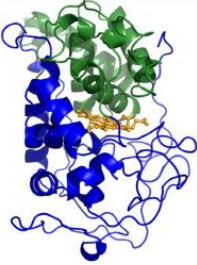
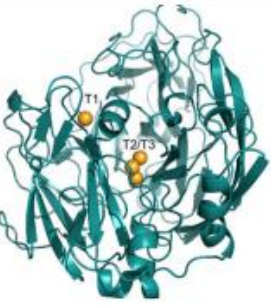
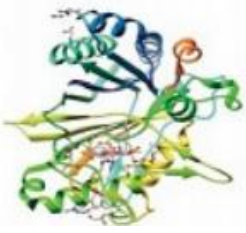
En este grupo se encuentran las lacasas y las peroxidasas que contienen grupos hemo, es decir, lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP) y peroxidasa decolorante de colorantes (DyP) (Tabla1). Las enzimas de las cuales se tratará son las siguientes:

- **LiP, EC 1.11.1.14:** es una enzima glicosilada que contiene proteína hemo con un grupo prostético de protoporfirina de hierro que requiere peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para catalizar un grupo prostético de protoporfirina de hierro que requiere peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para catalizar la oxidación de unidades no fenólicas de lignina y mineralizar los compuestos aromáticos recalcitrantes. La oxidación de la lignina tiene lugar a través de la transferencia de electrones, rupturas no catalíticas de varios enlaces y apertura del anillo aromático.(34)
- **MnP (E.C. 1.11.1.13)** es una glicoproteína ácida y su estructura molecular es similar en un 43% a la LiP (45). Generalmente, MnP oxida compuestos fenólicos como fenoles simples, colorantes, aminas, así como la estructura de lignina y sus derivados. Para sustratos no fenólicos, MnP requiere un segundo mediador (tioles como el glutatión) para el proceso de oxidación. El ciclo catalítico de MnP es similar al de LiP, sin embargo, el manganeso actúa como mediador durante la actividad enzimática de MnP (34), además, el potencial redox del sistema MnP es menor que el de la LiP y ha mostrado capacidad para oxidar preferentemente sustratos fenólicos *in vitro* (46).
- **Lcc (1.10.3.2)** es una enzima extracelular que contiene cobre y consta de glicoproteínas monoméricas, dimericas y tetraméricas (47). Se encuentra en múltiples isoformas

producidas por diversas especies de bacterias, hongos, insectos y plantas (43). La secreción de lacasas se considera como una de las respuestas fúngicas básicas a la presencia de condiciones antagónicas: otros microorganismos, xenobióticos, metales, toxinas y compuestos biológicamente activos (48).

Tabla 1. Comparación entre las propiedades de MnP, LiP, Lcc y peroxidasa decolorante de tinte (DyP).

E.C.	LiP 1.11.1.14	MnP 1.11.1.13	Lcc 1.10.3.2	DyP 1.11.1.19
Estructura	Monómero, glicoproteína hasta 15	Monómero, glicoproteína	Mono-, di- o tetramero, glicoproteína	Dímero
Grupo prostético	Hemo	Hemo	Cuatro átomos de Cu por unidad de proteína activa	Hemo
Glicosilación	N-	N-	N-	N-acetil-glucosamina y manosa
Isoformas	Monómeros; hasta 15	Monómeros; hasta 11	Mono-, di-, tetrameros; varios	Estructura de barril dimérica $\alpha + \beta$
Rango pH	2.0-5.0	2-6	2.0-8.5	3.2 (óptimo)
Escisión C-C	A menudo	A menudo	No	Sí
H₂O₂ regulada	Sí	Sí	No	Sí
Estabilidad	Baja	Inmensa	Inmensa	Altamente
Mediadores naturales	Mediadores desconocidos	Mn ²⁺ ; Mn ³⁺	Ácido 3-hidroxi-antranílico	Mn ²⁺
Especificidad	Amplio, aromáticos, incluido no fenólicos	Mn ²⁺	Amplio, fenólicos	No fenólicos, fenólicos, alcohol veratrílico
Centro catalítico	Fe-protoporfirina	Fe-protoporfirina	Cuatro átomos de cobre	Fe-protoporfirina
Mediadores	NO	Tioles, ácidos grasos insaturados, ácidos orgánicos como quelantes, Mn ³⁺ .	Hidroxibenzotriazol o ABTS, HBT _o , siringaldazina, 3-HAA, RBB.	Mn ³⁺ quelado
Cofactor	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	O ₂ -	H ₂ O ₂
Sustrato	Compuestos fenólicos	Lignina y otros	Orto- y para-difenoles,	Fenoles, hidroquinonas,

	halogenados, compuestos aromáticos policíclicos	compuestos fenólicos	aminofenoles, polifenoles, poliaminas, ligninas y arilaminas	colorantes, aminas, alcoholes aromáticos y xenobióticos.
Estructura tridimensional				

Modificado de Pollegioni *et al.*, Datta *et al.* (15,34).

4.5.2 Enzimas auxiliares de degradación de la lignina

Las enzimas LDA no pueden degradar la lignina por sí mismas, ya que requieren una participación enzimática adicional para una degradación completa. En este grupo se encuentra una gran diversidad de enzimas como glioxal oxidasa (GLOX; EC 1.2.3.5), aril alcohol oxidasas (AAO; EC 1.1.3.7), piranosa 2-oxidasa (POX; EC 1.1.3.10), celobiosa deshidrogenasa (CDH; EC 1.1.99.18) y glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) (44).

4.6 Madera blanda y madera dura

Al hablar de la estructura y composición de la madera, nace la diferencia entre madera blanda y madera dura. La madera blanda es de gimnospermas como las coníferas, mientras que la madera dura es de angiospermas como los caducifolios, asimismo difieren en sus componentes (Tabla 1); por un lado, en la madera blanda se encuentran porcentajes más altos de hemicelulosa y lignina, en donde el galactoglucomanano es el principal componente de la hemicelulosa de las paredes celulares secundarias, y la fracción de lignina de guayacilo es más alta; por otro lado, en la madera dura el glucuronoxilano acetilado es el principal polímero de la hemicelulosa y la fracción de la lignina de guayacilo-siringilo es más alta. Con ello, la recalcitrancia de la lignocelulosa de la madera blanda se ha atribuido a su mayor contenido de lignina, tamaño de poro más pequeño y menos grupos acetilo derivados de la hemicelulosa en comparación con la madera dura. (44,48)

Tabla 2. Composición química de la madera blanda y la madera dura.

Material vegetal	Composición química (% peso seco)					
	Celulosa	Lignina	Hemicelulosas			
			Galactoglucomanano	Arabinoglucoronoxilano	Glucuronoxilano	Glucomanano
Madera blanda	33–42	27–32	5–18	7–14		
Madera dura	38–51	21–31			15–35	2–5

Modificado de *Janusz et al.*(44).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de investigación y nivel

Es de tipo mixta, con sus niveles de investigación exploratorios, descriptivo y experimental: el nivel exploratorio en la medida en que los macrohongos del bosque tropical húmedo de Chocó de los municipios de Lloró y Nuquí han sido poco estudiados y no se han realizado investigaciones acerca de su producción de enzimas ligninolíticas; el nivel descriptivo porque es necesario identificar los macrohongos, caracterizar la producción de enzimas ligninolíticas y establecer sus aplicaciones biotecnológicas; finalmente, el nivel experimental, ya que la identificación molecular y la determinación de actividad ligninolítica se realiza en el laboratorio y, gracias al patrocinio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se realizó este proyecto de investigación.

Universo: Macrohongos en sustratos leñosos del bosque tropical húmedo de Colombia.

Población: Macrohongos en sustratos leñosos del bosque tropical húmedo de Chocó, Colombia.

Muestra: Macrohongos en sustratos leñosos de los municipios de Lloró y Nuquí del bosque tropical húmedo de Chocó, Colombia.

Técnicas y procedimientos

Área de estudio

La recolección de los macrohongos se realizó en un ecosistema de bosque tropical húmedo primario localizado en los municipios de Nuquí y Lloró del departamento del Chocó en Colombia, con una altura promedio de 5 y 70 msnm, respectivamente (49). En julio, según registros, la precipitación oscila entre 667 y 1000 mm, la humedad relativa está entre 89% y 91 %, con un promedio de 90 %, la temperatura media es de 23 a 29°C con un clima cálido super húmedo (29,50).



Figura 4. Mapa político que denota los municipios de Nuquí y Lloró en Chocó, Colombia. Mapa realizados por la autora con base en Earthstar Geographics- ArcGIS (Esri TM, USA).

5.1 Recolección de especímenes

Se realizó en el mes de julio del 2021 durante 4 días en cada municipio con una metodología de muestreo oportunístico con transectos lineales de aproximadamente 2 km, para un total de 8 muestreos. Como parámetros de recolección se tuvo en cuenta que el hongo estuviera en un sustrato leñoso, es decir, ramas, arbustos, árboles en pie y árboles caídos; además, se tuvo en cuenta que fueran diferentes fenotípicamente. Se recolectaron los hongos con ayuda de una navaja, incluyendo parte del sustrato, ya que era necesario tomar un poco del mismo para el análisis preliminar; cada muestra fue debidamente rotulada en código con el nombre de la zona y la fecha, adicionalmente, se tomó registro fotográfico y de la ubicación geográfica del lugar donde se recolectó el macrohongo, se envolvieron en papel parafinado y cuanto antes se refrigeraron.

5.2 Aislamiento primario

Previo a la siembra, los carpóforos (cuerpo fructífero) de los hongos recolectados fueron cortados en fragmentos ($\pm 1.0 \text{ cm}^2$), y la desinfección de los fragmentos se realizó empleando un lavado en agua destilada, luego en hipoclorito de sodio al 3%, nuevamente en agua destilada, posteriormente en etanol (70%) y, finalmente, dos lavados en agua destilada, por un minuto en cada paso; los fragmentos desinfectados fueron depositados en los medios de cultivo PDA y agar avena (Anexo 1), durante 8 a 20 días a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

5.3 Identificación molecular

Las cepas aisladas fueron cultivadas en caldo PDB (Potato Dextrose Broth) (Anexo 1) durante 8-10 días a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, el micelio de cada hongo fue recuperado mediante filtración al vacío con el equipo KGS-47TF Glass microanalysis holder S/S Support 47mm (ADVANTEC®, Japón) con papel de filtro Whatman® Grado 1 de $11\mu\text{m}$ de poro (GE Healthcare-Whatman, USA), y fue conservado en sobres de papel aluminio estériles a -80°C .

Para la extracción del material genético del micelio se emplearon dos técnicas: la primera fue extracción del ADN genómico con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2); la segunda fue por un método de extracción mecánico y químico descrito por Frederick et. al, 2002 (51) (Anexo 3).

La cuantificación del ADN se realizó en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia con el equipo EzDrop 1000 (Blue-Ray Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se tomó agua desionizada ultrapura como blanco.

La amplificación de la región ITS del ADNr se realizó con los primers ITS1 e ITS4 (Macrogen, Corea) (Tabla 3) y, se utilizaron dos cócteles de reacción de PCR listos; el primero, OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, USA) y, el segundo, AccuStart™ II PCR ToughMix® (2X) (Quantabio, USA), el volumen inicial para la reacción, ajustes a la cantidad de ciclos y temperatura adecuados para la reacción que se llevó a cabo en el termociclador (Tabla 4, Tabla 5).

Tabla 3. Primers para la amplificación de genes de ADN ribosomal fúngico.

Nombre	Secuencia	Concentración	Referencia
ITS_1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3'	25 nmol	White <i>et al.</i> (52)
ITS_4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	25 nmol	White <i>et al.</i> (52)

Tabla 4. Preparación de PCR para la amplificación de la región ITS.

	Volumen pruebas iniciales	Volumen para secuenciación
AccuStart™ II PCR ToughMix® (2X) o OneTaq® Quick-Load® 2X-MasterMix with StandardBuffer	6,25µL	25µL
ITS 1 (10µM)	0,25µL	1µL
ITS 4 (10µM)	0,25µL	1µL
ADN muestra	0,4µL	5µL
H ₂ O ultrapura desionizada	5,0µL	18µL
Total	12,5 µL	50µL

Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS.

Etapas	Ciclos	Tiempo	Temperatura
Inicio	1 ciclo	5 min	94°C
Desnaturalización	30 ciclos	30 seg	94°C
Anillaje		1 min	55°C
Extensión		1 min	68°C
Elongación Final	1 ciclo	5 min	68°C

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de la amplificación, con un voltaje de 80 V durante 40 minutos y se observó con el sistema de documentación Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation System y el Bio-Rad Quantity One® software (Bio-Rad, USA) y el marcador de peso molecular utilizado fue 100 bp plus DNA ladder ready-to-use (BIORON). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por el servicio de secuenciación tipo sanger de Macrogen (Corea).

Las secuencias obtenidas se editaron con el software Chromas 2.6.6 (Technelysium, Australia); luego, se evaluó la identidad preliminar de las secuencias por comparación con bases de datos moleculares en el programa BLASTn (BLAST®, National Center for Biotechnology Information - NCBI, USA).

5.4 Identificación taxonómica

En el momento de la recolección de los macrohongos se tomó nota de las características macroscópicas tales como píleo, fragmentos de velo, contexto del píleo, himenóforo, lamelas, tubos, anillo, estípite, contexto del estípite y volva (53). La otra parte se llevó a cabo en el laboratorio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, con características macroscópicas y microscópicas relevantes al momento de usar las claves taxonómicas, tales como las esporas para compararlas con claves taxonómicas, entre ellas están Franco-Molano *et al.* (53), Lodge *et al.* (10), Fergus (54), Largent *et al.* (55,56), Noordeloos *et al.* (57), Ryvarden (58), Mata (59,60), entre otras. Adicionalmente, se realizó la búsqueda en la plataforma de ColFungi (<https://colfungi.org/>), la cual permite conocer si la especie se encuentra registrada o no, ubicación de los registros y también las utilidades que se le han atribuido.

5.5 Crecimiento en medio modificado con extracto de sustrato leñoso

Se utilizó el medio propuesto por Puerto (61) compuesto por sales minerales tales como MgSO₄, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NH₄NO₃ y FeSO₄(7H₂O) y como fuente de carbono se emplea extracto de corteza y madera aserrada de urapán (*Fraxinus* sp.) y pino (*Pinus* sp.) con el fin de obtener lignina tipo soda. Los hongos se incubaron durante 10 a 20 días a 25°C±1°C en oscuridad. (Anexo 1). Los ensayos se hicieron por triplicado.

5.6 Producción de enzimas ligninolíticas

La evaluación cualitativa de la producción de enzimas ligninolíticas se realizó en el medio de cultivo propuesto por Rubilar (Anexo 1) (62) con la adición del colorante. Para evaluar la actividad de la LiP y de la MnP, se agregó el colorante heterocíclico Azure B en una concentración de 50 µM y el reactivo rojo de fenol, respectivamente. Sobre estos medios con colorante, se sembraron plugs de micelio de las cepas aisladas en PDA y/o Agar avena y, fueron incubadas entre 10 a 25 días a 25°C±1°C en oscuridad. Los ensayos se hicieron por triplicado.

En el momento que el micelio cubrió la superficie del medio, se realizó la evaluación bajo los siguientes criterios:

- Crecimiento y degradación del colorante.
- Crecimiento y no degradación del colorante.
- No crecimiento.

Finalmente, con los hongos que presentaron potencial de producción de las enzimas LiP y MnP, se realizó una revisión bibliográfica para profundizar en el potencial biotecnológico y biorremediador hasta ahora registrado.

6. RESULTADOS

6.1 Recolección de especímenes

La recolección de los macrohongos se realizó mediante ocho recorridos de 2 km aproximadamente, cuatro en el municipio de Lloró (05 - 08 de julio de 2021) y cuatro en el municipio de Nuquí (11-14 de julio de 2021) (Figura 5). Por las características de la zona no fue posible hacer rápidamente la deshidratación de los cuerpos fructíferos por lo que algunos debieron ser descartados.

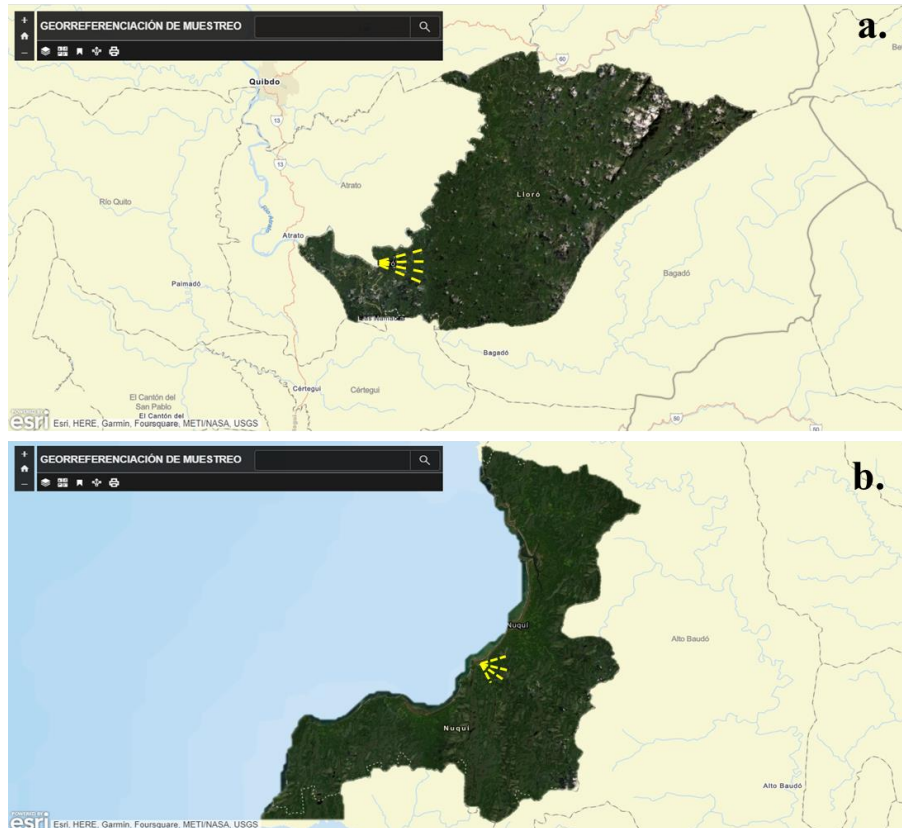


Figura 5. Recorridos de recolección de hongos macrohongos. **a.** Recorridos de recolección en el municipio de Lloró. **b.** Recorridos de recolección en el municipio de Nuquí. Mapas realizados por la autora con base en Earthstar Geographics- ArcGIS (Esri TM, USA).

Los hongos macrohongos fueron recolectados de sustrato leñoso, 37 en Lloró y 33 en Nuquí, para un total de 70 macrohongos (Anexo 4). La figura 6 muestra algunos de los hongos recolectados en su hábitat natural.



Figura 6. Hongos macrohongos en sustrato leñoso en los municipios de Lloró y Nuquí, Chocó.

6.2 Aislamiento primario

Se logró aislar 40 hongos en los medios de cultivo PDA y agar avena, 24 de Lloró y 16 de Nuquí (Figura 7, Anexo 4).

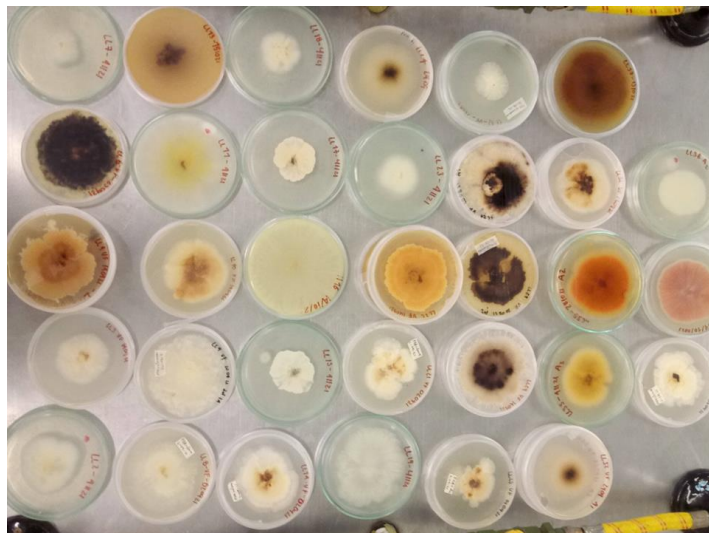


Figura 7. Hongos aislados en medios de cultivo PDA y agar avena.

6.3 Crecimiento en medio modificado con extracto de sustrato leñoso

Los 40 hongos aislados se sembraron en los medios con extracto de sustrato leñoso de urapán y pino, donde crecieron solamente 29 de ellos, 20 crecieron en ambos medios (LL2, LL4, LL6, LL7,

LL8, LL9, LL11, LL17, LL20, LL25, LL29, LL32A2, LL37, N3, N12, N18, N20, N31, N33, N33A1), 9 crecieron solo en el medio con extracto de urapán (LL22, LL24, LL32A1, LL35, LL38, N11, N19, N21, N23) y ninguno de los aislamientos creció solo en medio con extracto de pino. (Figura 8, Anexo 5).

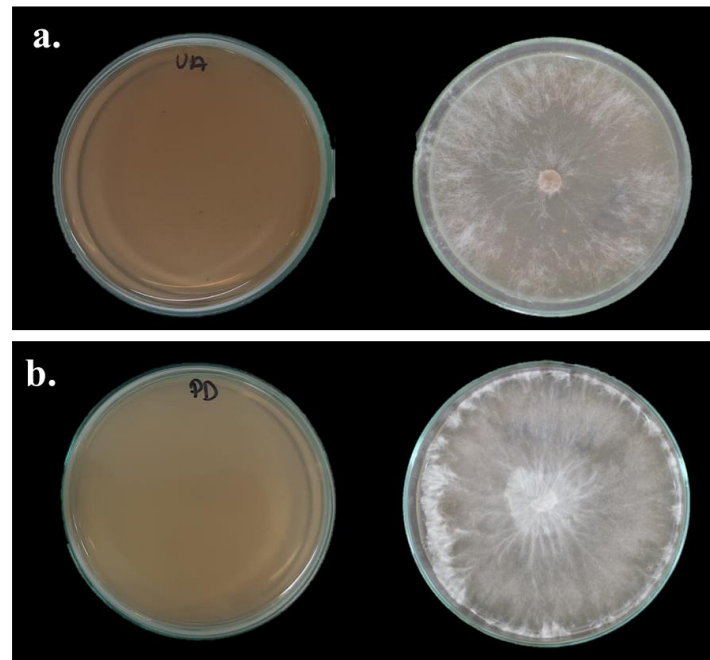


Figura 8. Medio modificado con extracto de sustrato leñoso de urapán y pino. izq. a der. **a.** Medio con extracto de sustrato leñoso de urapán sin crecimiento a la izquierda y con crecimiento de micelio a la derecha. **b.** Medio con extracto de sustrato leñoso de pino sin crecimiento a la izquierda y con crecimiento de micelio a la derecha.

6.4 Producción de enzimas ligninolíticas

Los 29 aislamientos que crecieron en medio modificado con extracto de sustrato leñoso fueron sembrados en los medios modificados con los colorantes para evaluar cualitativamente su actividad ligninolítica. 20 aislamientos presentaron actividad ligninolítica de la siguiente manera: 8 mostraron actividad lignina peroxidasa (LL6, LL8, LL25, LL32, LL37, N11, N18 y N20), 6 actividad manganeso peroxidasa (LL11, LL17, LL38, N12, N21 y N23) y, por último, 6 presentaron las dos actividades enzimáticas (LL4, LL9, LL29, N3, N19 y N33) (Figura 9, Tabla 7 y Anexo 5).

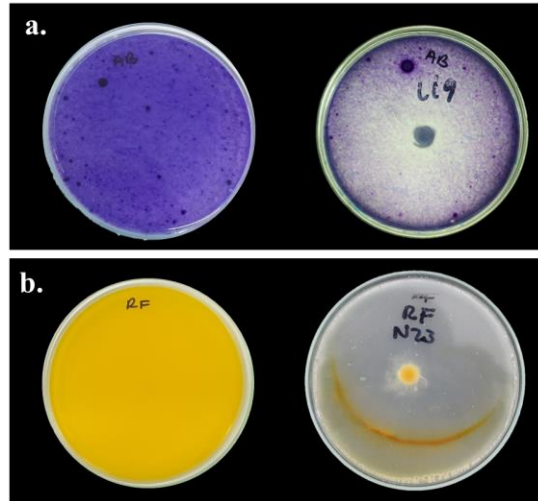


Figura 9. Medios modificados con colorantes Azure B y Rojo fenol. izq. a der. **a.** Medio modificado con Azure B sin crecimiento a la izquierda y con crecimiento y degradación del colorante a la derecha. **b.** Medio modificado con Rojo fenol sin crecimiento a la izquierda y con crecimiento y degradación del colorante a la derecha.

6.5 Identificación molecular y caracterización taxonómica

Se utilizaron dos métodos de extracción para obtener el ADN genómico de los 40 hongos aislados en medio de cultivo. Se realizó PCR de la región ITS con los *primers* ITS1-ITS4 a los 40 aislamientos. Sin embargo, solo se logró la amplificación de 26, utilizando una enzima especial (AccuStart™ II PCR ToughMix® (2X)). Los productos obtenidos de la amplificación se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa, algunas de las amplificaciones se muestran a continuación (Figura 10).

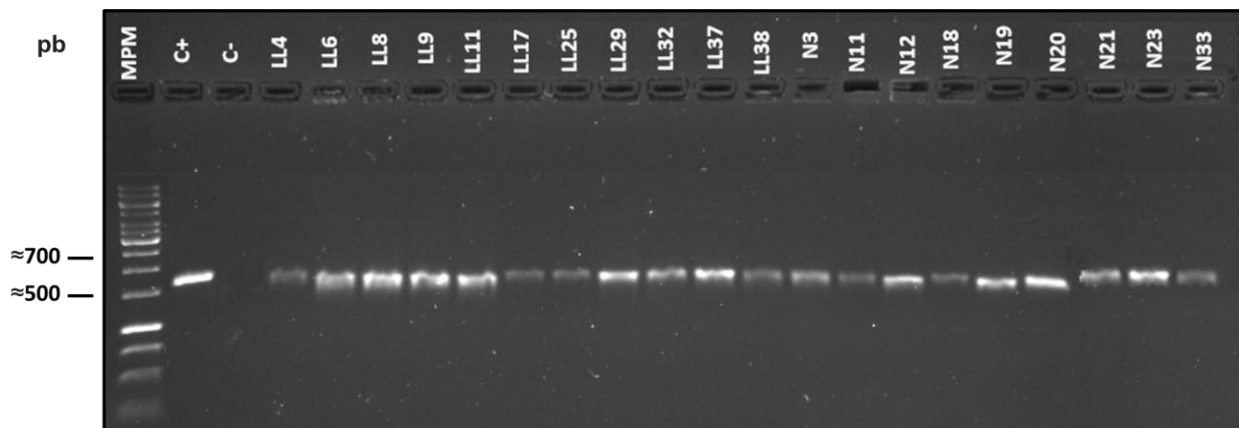


Figura 10. Visualización de los productos de la PCR de la región ITS con los *primers* ITS1-ITS4. Electroforesis en gel de agarosa (TAE 1X, agarosa al 1% a 80V). MPM:100 bp plus DNA ladder ready-to-

use (BIORON); Control positivo (C+): *A. niger*. Ll: Aislamientos provenientes del municipio de Lloró, Chocó; N: Aislamientos provenientes del municipio de Nuquí, Chocó

Los 26 amplicones fueron enviados al servicio de secuenciación tipo Sanger de MacroGen (Corea) y las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Chromas 2.6.6 (Technelysium); los 26 hongos fueron identificados molecularmente y por comparación con claves taxonómicas hasta el nivel de género, coincidiendo en todos los casos (Tabla 7 y Anexo 6), mientras que 12 hongos fueron identificados solamente por comparación con claves taxonómicas hasta el nivel de género, puesto que no fue posible su aislamiento en medios de cultivo, lo cual impidió su identificación molecular (Anexo 7).

De los 26 hongos identificados sólo uno es Ascomiceto, el hongo LL29 del orden Xylariales (*Xylaria* sp.), los restantes son Basidiomicetos de la clase Agaricomycetes de los órdenes Polyporales con 17 aislamientos (7 *Trametes* sp., 3 *Ganoderma* sp., 2 de *Hexagonia* sp., y uno de *Amauroderma* sp., *Rigidoporus* sp., *Earliella* sp., *Lentinus* sp., *Pycnoporus* sp.), Agaricales con cuatro aislamientos (*Mycena* sp., *Volvariella* sp., *Oudemansiella* sp., y *Morganella* sp. (sinónimo *Apioperdon* sp.), Auriculariales con tres aislamientos de *Auricularia* sp. y, por último, el orden Dacrymycetales con un solo aislamiento del hongo *Dacryopinax* sp.

La tabla 7 muestra la identificación molecular mediante BLASTn de los 20 hongos que presentaron actividad ligninolítica en los medios modificados con colorantes, las 6 identificaciones restantes se encuentran en el anexo 6.

Tabla 7. Homología de las secuencias de la región ITS del ADNr de hongos aislados que presentaron actividad ligninolítica.

	Código	Homología en GenBank	Taxonomía	Pudrición	Urapán	Pino	LiP	MnP	Número de acceso	Identidad %	Valor e
1	LL4	<i>Trametes</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	3	2	OK210319.1	99%	0.0
2	LL6	<i>Trametes</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	2	0	LR759930.1	98%	0.0
3	LL8	<i>Mycena</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Agaricales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	1	0	OP345124.1	95%	0.0
4	LL9	<i>Trametes</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	3	1	OL604355.1	100%	0.0
5	LL11	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	0	2	MN191580.1	99%	0.0
6	LL17	<i>Amauroderma</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	2	2	0	3	OK643861.1	96%	0.0
7	LL25	<i>Trametes</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	1	0	KY688213.1	99%	0.0

8	LL29	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Filo: Ascomycota</i> <i>Clase: Sordariomycetes</i> <i>Orden: Xylariales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	2	1	MH268161.1	100%	0.0
9	LL32	<i>Volvariella</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Agaricales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	3	3	2	0	MK018999.1	99%	0.0
10	LL37	<i>Morganella</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Agaricales</i>	<i>Marrón</i> <i>(Madera blanda)</i>	2	1	1	0	AB811851.1	97%	0.0
11	LL38	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	2	0	0	2	MH290278.1	98%	0.0
12	N3	<i>Trametes</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	2	2	3	2	OL604342.1	99%	0.0
13	N11	<i>Auricularia</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Auriculariales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	1	0	3	0	MW554097.1	100%	0.0
14	N12	<i>Rigidoporus</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	2	1	0	1	OK643811.1	99%	0.0
15	N18	<i>Earliella</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota</i> <i>Clase: Agaromycetes</i> <i>Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca</i> <i>(Madera dura)</i>	2	2	3	0	MW940759.1	100%	0.0

16	N19	<i>Auricularia</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota Clase: Agaromycetes Orden: Auriculariales</i>	<i>Blanca (Madera dura)</i>	3	0	3	2	JX065162.1	99%	0.0
17	N20	<i>Lentinus</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota Clase: Agaromycetes Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca (Madera dura)</i>	3	3	1	0	MH708513.1	100%	0.0
18	N21	<i>Pycnoporus</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota Clase: Agaromycetes Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca (Madera dura)</i>	2	0	0	1	FJ750267.1	100%	0.0
19	N23	<i>Dacryopinax</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota Clase: Dacrymycetes Orden: Dacrymycetales</i>	<i>Marrón (Madera blanda)</i>	2	0	0	3	MW795369.1	100%	0.0
20	N33	<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Filo: Basidiomycota Clase: Agaromycetes Orden: Polyporales</i>	<i>Blanca (Madera dura)</i>	3	3	2	2	MT012164.1	99%	0.0

NOTA: (0) indica sin crecimiento; (1) indica bajo crecimiento, y degradación ligera del colorante; (2) crecimiento moderado, y degradación moderada del colorante; (3) crecimiento abundante, y degradación alta del colorante.

7. DISCUSIÓN

Los macrohongos son de vital importancia en la naturaleza, estos actúan en el ciclo biogeoquímico del carbono, tienen propiedades medicinales y son eficaces en la degradación de material recalcitrante gracias a la producción de enzimas antioxidantes y enzimas ligninolíticas (28). Colombia cuenta con una gran biodiversidad de especies de macrohongos, favorecida por las condiciones ambientales en regiones tropicales con una mayor diversidad de plantas vasculares que crean nichos, microhábitats de hongos, y la presencia de muchos ecotonos, como también con diversos estudios que se han realizado con el fin de conocer la diversidad de la funga, así como sus utilidades, potencial biotecnológico y ecología.

Se recolectaron 70 macrohongos, de los cuales se logró aislar tan solo 40 hongos, 24 de Lloró y 16 de Nuquí, con el método convencional de siembra de fragmentos del carpóforo sobre los medios de cultivo PDA y agar avena, los cuales permanecerán en conservación en el cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Este método de aislamiento no resultó totalmente eficiente, ya que el aislamiento de algunos macrohongos en laboratorio es limitado por la falta de nutrientes específicos y de las condiciones ambientales propias del ecosistema, como en este caso particular que las condiciones ambientales del bosque húmedo tropical favorecen al crecimiento de gran variedad de macrohongos en sustrato leñoso. Algunos autores refieren otras técnicas tales como recuperar y sembrar la esporada (11), ya que requiere menor manipulación y facilita la preservación a largo plazo, que se puede realizar a -80°C , además de sembrarlos en otro tipos de medios de cultivo, como medios en fase líquida (63) o medios en fase sólida con diversos elementos como carozo de maíz, viruta de madera, compost de jardinería, tusas de maíz y demás sustratos orgánicos que puedan suplir con mayor grado los nutrientes necesarios para el crecimiento *in vitro* de los hongos. (17,64)

Para la identificación molecular, en este trabajo se realizó la amplificación de la región ITS del rDNA que ha sido aceptada como el gen de código de barras para hongos (67) con los primers ITS1/ITS4, y se logró obtener producto de amplificación de tan solo 26 de los 40 hongos aislados, debido a las dificultades presentadas con los ADN genómicos que conservaron algunos inhibidores de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), puesto que se utilizaron como patrón ADN obtenidos mediante extracción cruda (66).

Hay inhibidores de la PCR que interfieren o impiden que el proceso de amplificación del ADN se produzca correctamente como los presentes en la madera, los extractos de la madera y los hongos filamentosos, especialmente los macrohongos, como los polifenoles, los taninos, los ácidos resínicos y los polisacáridos. Por lo tanto, el proceso de extracción de ADN como la enzima ADN polimerasa o el kit comercial que la contenga deben propender por evitar la presencia de estos contaminantes inhibidores y superar la inhibición causada por la eventual presencia de ellos, respectivamente (29).

Para superar las dificultades en la realización de la PCR con la primera enzima ADN polimerasa escogida para realizar el trabajo con el ADN extraído, la OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, USA), se recurrió al empleo de una enzima ADN polimerasa diferente, la AccuStart™ II PCR ToughMix® (2X) (Quanta, USA), la cual es una mezcla de reacción que cuenta con una polimerasa de ADN termoestable ultra pura y altamente procesable que se combina con anticuerpos monoclonales de alta avidéz que le permiten superar muchos inhibidores conocidos de PCR que a menudo están presentes en muestras crudas de ADN genómico extraídas de muestras ambientales, tejidos vegetales, hongos o tejidos animales (66x). Finalmente, la secuenciación de los 26 amplicones obtenidos y su comparación con la base de datos de nucleótidos “nt/nr” del Genbank mediante el algoritmo BLASTn permitieron identificar molecularmente hasta género 26 de los 40 hongos aislados (Tabla 7, anexo 6).

Cabe anotar que para profundizar en la identificación taxonómica de los hongos, se ha sugerido la utilización de varios genes y no solo la región ITS, ya que se ha demostrado que esta región ITS no proporciona suficiente resolución entre especies estrechamente relacionadas(65), es decir, especies que no se pueden distinguir fácilmente en función de la morfología, pero que forman linajes filogenéticos distintos en función de marcadores moleculares, denominadas especies crípticas(66), ejemplo de ello es la identificación de siete aislamientos como *Trametes* sp. y tres de *Auricularia* sp. y *Ganoderma* sp., sin poder distinguir si son diferentes especies. Para ello se han planteado unos marcadores de código de barras secundarios para hacer filogenias, como el espaciador intergénico (*IGS*), el gen codificante de la β -tubulina II (*TUB2*), las subunidades más grande (*RPB1*) y segunda más grande (*RPB2*) de la ARN polimerasa II dirigida por ADN, factor de elongación traslacional 1α (*TEF1*), ADN topoisomerasa I (*TOPI*), fosfoglicerato quinasa (*PGK*), y la subunidad I (*COX1*) y la subunidad II (*COX2*) de la citocromo c oxidasa(65).

Además de emplear estos códigos de barras para la identificación molecular de los hongos, también se deberían tener en cuenta para mayor efectividad criterios como: primero, un conjunto común de *primers* y tecnologías que permitan la amplificación y secuenciación de todos los hongos en los loci objetivo, segundo, una base de datos de referencia integral que incluye todas las especies de hongos conocidas y, tercero, un conjunto de criterios de reconocimiento de especies basados en secuencias de ADN que se pueden aplicar en todo el reino de los hongos (67). Asimismo, junto con el componente molecular, es vital correlacionar la identificación con los datos fenotípicos para hacer de la taxonomía de los hongos algo más íntegro y preciso, para obtener registros más detallados de las especies identificadas.

En cuanto al crecimiento en los medios modificados con extracto de sustrato leñoso, se observó un mayor número de aislamientos con crecimiento en el extracto de urapán, 23 mientras que en extracto pino solamente 16, que podría deberse a que el urapán tiene una madera dura y esto puede facilitar en mayor medida su aprovechamiento como fuente de carbono y otros nutrientes.

En el ambiente se pueden observar preferencias a raíz de diferencias estructurales; por ejemplo, los basidiomicetos de la pudrición blanca como los hongos de los géneros *Trametes* spp., *Ganoderma* spp., *Auricularia* spp., y *Amauroderma* sp., identificados en este estudio, entre otros, mayormente se encuentran en la madera dura, mientras que los hongos de la pudrición parda atacan con mayor frecuencia las maderas blandas; además, la presencia o no de compuestos en cada tipo de madera también varía, por ejemplo, extractos que incluyen algunos ácidos grasos y fenoles, como los taninos, se encuentran tanto en maderas blandas como en maderas duras, mientras que los terpenos mayormente se hallan en las maderas blandas (44,48).

Además, dentro de la sucesión fúngica de la colonización leñosa se evidencia que los macrohongos del filo Basidiomycota prevalecen en el inicio de la descomposición de la madera, mientras que los del filo Ascomycota en las últimas etapas, esto respalda estudios que demuestran cómo algunas especies de hongos y su relación con las plantas muestran preferencia por cierto tipo de sustrato (44).

Por otro lado, la degradación de los colorantes Azure B y Rojo Fenol permite evaluar cualitativamente la producción de las enzimas lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas, respectivamente, debido a la oxidación del reactivo. Es importante resaltar que los métodos cualitativos constituyen una buena herramienta para la búsqueda rápida (rastreo) de enzimas que degraden complejos lignocelulósicos. Estas pruebas proporcionan una indicación certera de la presencia de estas enzimas con el fin de realizar una adecuada selección de cepas de hongos respecto al grupo de enzimas que producen, disminuyendo la cantidad de pruebas cuantitativas, que pueden ser mucho más costosas. (13)

Estas enzimas modificadoras de lignina también se denominan colectivamente enzimas ligninolíticas. Estas enzimas han ganado gran atención hacia los agentes biológicos para la degradación de compuestos que contienen desechos lignocelulósicos y otros contaminantes orgánicos. También se reporta que las enzimas ligninolíticas son efectivas en el tratamiento de desechos industriales y otros compuestos xenobióticos a través del proceso de biodegradación y decoloración (47).

La regulación de los genes de las lacasas y las peroxidasas involucra una jerarquía de señales ambientales tales como la concentración de carbono y nitrógeno, la presencia de metales y xenobióticos, el choque de temperatura y, recientemente, varias longitudes de luz del día descubiertas (68).

En cuanto a la producción enzimática de lignina peroxidasas y manganeso peroxidasa, se observó potencial en especies de los géneros *Trametes* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinus* sp., *Rigidoporus* sp., *Dacryopinax* sp., *Mycena* sp., *Amauroderma* sp., *Xylaria* sp., *Volvariella* sp., *Morganella* sp., *Auricularia* sp. y *Pycnoporus* sp. Así mismo, se han registrado múltiples aplicaciones biotecnológicas para estos hongos, tanto medicinales como farmacéuticas, agrícolas, alimenticias y de biorremediación.

Los siete aislamientos de *Trametes* sp. mostraron crecimiento diferente sobre los medios modificados con extractos de madera de urapán y pino, así como en los medios con los colorantes

Azure B y Rojo fenol, sugiriendo una actividad ligninolítica diferente entre todos ellos, resultados que sugieren que podría tratarse de siete especies diferentes de este género.

A especies del género *Trametes* se les ha atribuido propiedades medicinales, por ejemplo, a *T. versicolor* propiedades como antidiabético, anticancerígeno, antioxidante y antiinflamatorio, antimicrobiano, antiviral, citotóxicos, actividad de mejora inmunológica, actividad prebiótica y efecto inhibidor de AChE. Además, se ha demostrado que los compuestos fenólicos y el ácido linoleico extraídos de *T. lactinea* poseen actividades antimicrobianas, antioxidantes, citostáticas. Por otro lado, extractos de *T. polyzona* inhibieron el crecimiento de las diferentes cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. enterica*. También *Trametes* sp. tiene la capacidad de degradar desechos agrícolas como sustitutos de los productos químicos comúnmente utilizados para el tratamiento de contaminantes que son tóxicos para el medio ambiente. *T. polyzona* puede eliminar fármacos como carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno y sus metabolitos y reducir su actividad estrogénica por debajo del límite de detección (69)

Especies del género *Ganoderma* spp. han sido ampliamente estudiadas por sus múltiples aplicaciones, entre ellas el tratamiento para enfermedades, como artritis, bronquitis, úlceras gástricas, hiperglucemia, insomnio, nefritis, enfermedades inflamatorias y cáncer. Dentro de las propiedades medicinales, se sabe que *G. lucidum* tiene una alta actividad antioxidante y contiene triterpenos y ácidos ganodéricos A, B, H, T, C2 y Me, con propiedades hepatoprotectoras, antihipertensivas, anti-VIH-1 y acciones antihistamínicas (70). También, tienen un gran potencial en la bioacumulación de metales pesados como el plomo, zinc, níquel, cobre y cadmio (71).

En cuanto al hongo *Lentinus crinitus*, su secretoma muestra una diversa gama de enzimas lignocelulolíticas y proteolíticas con aplicaciones prometedoras en varias ramas de la industria (72); a especies del género *Rigidoporus* les han determinado genes con relevancia en el metabolismo de los antibióticos (p. ej., cefalosporina esterasa), así como aplicaciones potenciales en la degradación de ácidos grasos (73).

Dacryopinax spathularia tiene la capacidad de producir glicolípidos con actividad antimicótica y antibiótica de microorganismos que deterioran alimentos y bebidas, asimismo la producción de

estos compuestos parece ser una característica quimiotaxonómica válida que ha sido “preservada” en los organismos productores en el curso de su evolución, probablemente porque los hongos tienen una ventaja selectiva sobre sus competidores (74).

Amauroderma se ha utilizado tradicionalmente para prevenir los ataques epilépticos y el llanto constante en los bebés. Las propiedades farmacológicas de *Amauroderma* incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, neuroprotectores, anticancerígenos, antihiperlipidémicos, antiepilépticos y antibacterianos. (75) La amaurocina, una proteína sintetizada por *Amauroderma* mostró actividad contra aislados de *T. vaginalis* con una baja toxicidad hacia los neutrófilos humanos y un carácter proinflamatorio (76).

Por el lado de los ascomicetos, especies de *Xylaria* presentan potencial antifúngico de los metabolitos secundarios ácido piliforme y citocalasina D, los cuales fueron aislados y guiados por ensayos con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y presentaron un gran potencial biotecnológico y de producción de diferentes compuestos activos que podrían ser prometedores contra la enfermedad de antracnosis (77), es decir, como controlador biológico de fitopatógenos.

Especies del género *Morganella*, antes incluidos en el género *Lycoperdon* han sido estudiadas por bioacumular metales pesados, tal como el Hg. (78) Se ha descrito diversas aplicaciones biotecnológicas del género *Pycnoporus* mediante el aprovechamiento de sus lacasas, como la bioconversión de subproductos agrícolas y materias primas vegetales en productos valiosos, la biopulpa y el bi blanqueo de pulpa de papel y la biodegradación de organocontaminantes, xenobióticos y contaminantes industriales (79).

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de la biodiversidad y refuerzan la necesidad de profundizar en el estudio de los macrohongos colombianos, tanto desde la taxonomía y descripción de especies, como de su gran potencial biotecnológico y su aplicación.

8. CONCLUSIONES

- Se logró aislar 40 macrohongos de Lloró y Nuquí en medios de cultivo PDA y agar avena.
- Se identificaron 26 macrohongos del bosque tropical húmedo de los municipios de Lloró y Nuquí, Chocó, Colombia por análisis molecular y siguiendo claves taxonómicas, los cuales pertenecen a los géneros *Trametes* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinus* sp., *Rigidoporus* sp., *Dacryopinax* sp., *Mycena* sp., *Amauroderma* sp., *Xylaria* sp., *Volvariella* sp., *Morganella* sp., *Auricularia* sp., *Earliella* sp. y *Pycnoporus* sp.
- Se identificaron 12 macrohongos hasta género solamente por clave, los cuales pertenecen a los géneros *Ganoderma* sp., *Auricularia* sp., *Trametes* sp., *Auricularia* sp., *Hymenochaete* sp., *Lentinus* sp., *Stereum* sp., *Cookeina* sp. y *Oudemansiella* sp.
- De los 40 hongos, 20 presentaron crecimiento frente a los dos medios modificados con extracto de madera (urapán y pino), 9 solo presentaron crecimiento en el medio modificado con el extracto de madera de urapán y los 11 hongos restantes no presentaron crecimiento en ninguno de los medios modificados con extractos de madera.
- Los hongos LL4, LL9 y N3 (tres aislamientos de *Trametes* sp.), N18 (*Earliella* sp.) y N19 (*Auricularia* sp.) evidenciaron una mayor producción enzimática de lignina peroxidasa, seguidos de LL6 (*Trametes* sp.), LL29 (*Xylaria* sp.), LL32 (*Volvariella* sp.) y N33 (*Ganoderma* sp.) con una actividad moderada y, por último, con una baja actividad los hongos LL8 (*Mycena* sp.), LL25 (*Trametes* sp.), LL37 (*Morganella* sp.) y N20 (*Lentinus* sp.)
- Los hongos que presentaron mayor actividad manganeso peroxidasa fueron LL17 (*Amauroderma* sp.) y N23 (*Dacryopinax* sp.), seguidos de LL4 (*Trametes* sp.), LL11 (*Ganoderma* sp.), LL38 (*Ganoderma* sp.), N3 (*Trametes* sp.), N19 (*Auricularia* sp.) y N33 (*Ganoderma* sp.) y, por último, con una baja actividad LL9 (*Trametes* sp.), LL29 (*Xylaria* sp.), N12 (*Rigidoporus* sp.) y N21 (*Pycnoporus* sp.).
- Los hongos LL4 (*Trametes* sp.) y N19 (*Auricularia* sp.) mostraron actividad Lip y MnP, aunque el hongo LL4 presentó alta actividad de ambas enzimas y crecimiento en ambos tipos de extracto de madera, dura y blanda (urapán y pino), a diferencia del hongo N19, que presentó alta actividad LiP, una moderada actividad MnP y solo presentó crecimiento en el medio con extracto de madera dura (urapán).

9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Es necesario continuar con el registro de la funga existente en el país para la apropiación del conocimiento y así abrir camino a investigaciones que profundicen en el potencial biotecnológico de los mismos.

Es necesario contribuir con la transferencia de conocimiento a las comunidades, para promover la conservación de la biodiversidad y el posible aprovechamiento de los recursos.

Se recomienda hacer ensayos diseñando un medio de cultivo con el sustrato leñoso directamente con el fin de generar un ambiente más propicio para el crecimiento de microorganismos.

Se recomienda para futuras investigaciones en macrohongos, utilizar marcadores de código de barras secundarios para realizar la identificación molecular a nivel de especie como *β -tubulina* el *RPB1*, el *RPB2* y el *TEF1*.

Se recomienda estudiar los procesos bioquímicos tras la degradación de los colorantes, con el fin de dilucidar las rutas metabólicas utilizadas.

10. SOCIALIZACIÓN EN EVENTOS Y PRODUCCIÓN ACADÉMICA

Este trabajo se socializó en el I Congreso Colombiano de Micología, organizado por la Asociación Colombiana de Micología y realizado del 22 al 24 de junio de 2022 en la Universidad El Bosque en Bogotá.

Adicionalmente, se socializó en el XX Encuentro Regional de Semilleros de Investigación REDCOLSI- Nodo Bogotá D.C., Cundinamarca y realizado del 8 al 12 de agosto de 2022 en Bogotá D.C por modalidad virtual, obteniéndose puntaje superior a 90 puntos por lo que se socializó en el XXV Encuentro Nacional y XIX Encuentro Internacional de Semilleros de Investigación – REDCOLSI, realizado del 12 al 15 de octubre de 2022 en Medellín.

REFERENCIAS

1. Gaya E., Vasco-Palacios A. M, Vargas-Estupiñán N., Lücking R., Carretero J., Sanjuan T., et al. ColFungi: Colombian resources for Fungi Made Accessible [Internet]. Royal Botanic Gardens, Kew.; 2021. Disponible en: <https://www.kew.org/sites/default/files/2021-06/Colombian%20resources%20for%20Fungi%20made%20accessible.pdf>
2. Vasco-Palacios AM, Franco-Molano AE. Diversity of Colombian macrofungi. :58. Disponible en: https://ipt.biodiversidad.co/sib/resource?r=udea_mhongos_literatura_001
3. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. Daño y pérdida de biodiversidad [Internet]. Disponible en: <https://www.cepal.org/es/temas/biodiversidad/perdida-biodiversidad>
4. Rojas J, Hormaza A. Evaluación de la biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca y sus consorcios. Rev UDCA Actual Divulg Científica [Internet]. 30 de junio de 2016 [citado 18 de septiembre de 2022];19(1). Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/258>
5. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research [Internet]. diciembre de 2001;105:11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756208620274>
6. Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. Heitman J, James TY, editores. Microbiol Spectr [Internet]. 25 de agosto de 2017 [citado 15 de septiembre de 2022];5(4):5.4.10. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
7. IDEAM, UNAL. Variabilidad Climática y Cambio Climático en Colombia [Internet]. 1.^a ed. Bogotá, D.C.; 2018. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023778/variabilidad.pdf>
8. López-Quintero CA, Straatsma G, Franco-Molano AE, Boekhout T. Macrofungal diversity in Colombian Amazon forests varies with regions and regimes of disturbance. Biodivers Conserv [Internet]. agosto de 2012 [citado 15 de septiembre de 2022];21(9):2221-43. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10531-012-0280-8>
9. Mueller GM, Cunha KM, May TW, Allen JL, Westrip JRS, Drechsler-Santos ER, et al. What Do the First 597 Global Fungal Red List Assessments Tell Us about the Threat Status of Fungi? 2022;9(14):23. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-2818/14/9/736>
10. Lodge DJ, Ammirati JF, O'Dell TE, Mueller GM, Huhndorf SM, Wang CJ, et al.

- Terrestrial and lignicolous macrofungi. En: Biodiversity of Fungi [Internet]. Elsevier; 2004 [citado 15 de septiembre de 2022]. p. 127-72. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125095518500118>
11. Gaitán- Hernández R. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción [Internet]. Xalapa, Ver.: Instituto de Ecología; 2004. Disponible en: http://www1.inecol.edu.mx/cv/CV_pdf/libros/Manual_PleurotusGaitan.pdf
 12. Chanagá X, Escobar JP, Marín M, María del Socorro Yepes Pérez. Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá, Colombia. *Fac Nac Agron Medellín* [Internet]. 2012;65(2):11. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472012000200024&script=sci_abstract&tlng=es
 13. Montoya S, Sánchez Ó, Levin L. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotechnol En El Sect Agropecu Agroindustrial* [Internet]. diciembre de 2014;12(2):(115-124). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612014000200013&script=sci_abstract&tlng=es
 14. Fonseca MI, Zapata PD, Villalba LL, Fariña JI. Characterization of the oxidative enzyme potential in wild white rot fungi from Misiones (Argentina). *Acta Biológica Colomb* [Internet]. 7 de mayo de 2014 [citado 15 de septiembre de 2022];20(1):47-56. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/38322>
 15. Pollegioni L, Tonin F, Rosini E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J* [Internet]. abril de 2015 [citado 15 de septiembre de 2022];282(7):1190-213. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13224>
 16. Chaparro DF, Rosas DC, Varela A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Rev Iberoam Micol* [Internet]. octubre de 2009 [citado 15 de septiembre de 2022];26(4):238-43. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140609000114>
 17. Quintero JC, Feijoo G, Lema JM. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *VITAE* [Internet]. 2006;13(2):61-7. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a08.pdf>
 18. Chan-Cupul W, Abarca GPH, Vázquez RR. Aislamiento y evaluación de la actividad

- enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev Int Contam Ambient* [Internet]. agosto de 2016;32(3):13. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992016000300339
19. Carrillo JJ. Potencial ligninolítico de macromicetos presentes en un bosque alto andino en Tabio, Cundinamarca. Universidad de la Salle [Internet]. 2019;26. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1060&context=biologia>
 20. Falade AO, Mabinya LV, Okoh AI, Nwodo UU. Ligninolytic enzymes: Versatile biocatalysts for the elimination of endocrine-disrupting chemicals in wastewater. *MicrobiologyOpen* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 15 de septiembre de 2022];7(6):e00722. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.722>
 21. Agrawal N, Verma P, Shahi SK. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. *Bioresour Bioprocess* [Internet]. diciembre de 2018 [citado 15 de septiembre de 2022];5(1):11. Disponible en: <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-018-0197-5>
 22. Sudiana IK, Sastrawida IDK, Sukarta IN. Decolorization Study of Remazol Black B Textile Dye Using Local Fungi of *Ganoderma* sp. and Their Ligninolytic Enzymes. *J Environ Sci Technol* [Internet]. 15 de diciembre de 2017 [citado 15 de septiembre de 2022];11(1):16-22. Disponible en: <https://www.scialert.net/abstract/?doi=jest.2018.16.22>
 23. Lee H, Yun SY, Jang S, Kim GH, Kim JJ. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Creosote-Contaminated Soil by *Peniophora incarnata* KUC8836. *Bioremediation J* [Internet]. 2 de enero de 2015 [citado 6 de septiembre de 2022];19(1):1-8. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889868.2014.939136>
 24. Badr El-Din SM, Kheiralla ZH, Malek SMA, Aziz DHA. Selection of Fungal Isolates for Biopulping of Rice Straw. *BioResources* [Internet]. 9 de agosto de 2013 [citado 15 de septiembre de 2022];8(4):4969-80. Disponible en: <http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/4293>
 25. Camacho-Morales RL, Guillén-Navarro K, Sánchez JE. Degradation of the herbicide paraquat by macromycetes isolated from southeastern Mexico. *3 Biotech* [Internet]. octubre de 2017 [citado 15 de septiembre de 2022];7(5):324. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0967-3>

26. Rentería-Arango M. La biorremediación en Colombia y sus aplicaciones. *Hechos Microbiológicos* [Internet]. 29 de marzo de 2020 [citado 15 de septiembre de 2022];10(1-2):39-48. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/339845>
27. Morrow MH, Algiers K. Macrofungi. En: *Botany* [Internet]. ASCCC Open Educational Resources Initiative; 2022. Disponible en: <https://bio.libretexts.org/@go/page/37007>
28. Ramírez L, Arango Á. Macromicetos: generalidades, desinfección y cultivo in vitro. *Micro-Ciencia Investig Desarro E Innov* [Internet]. 2017;6:85-94. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10901/17600>
29. Gherbawy Y, Voigt K, editores. *Molecular Identification of Fungi* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [citado 21 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-05042-8>
30. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols* [Internet]. Elsevier; 1990 [citado 20 de septiembre de 2022]. p. 315-22. (A Guide to Methods and Applications). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123721808500421?via%3Dihub>
31. Patterson AD, Gonzalez FJ, Idle JR. Xenobiotic Metabolism: A View through the Metabolometer. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 17 de mayo de 2010 [citado 19 de septiembre de 2022];23(5):851-60. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx100020p>
32. Knapp JS, Bromley-Challoner KCA. Recalcitrant organic compounds. En: *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2003 [citado 19 de septiembre de 2022]. p. 559-95. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124701007500352>
33. Bose S, Kumar PS, Vo DVN, Rajamohan N, Saravanan R. Microbial degradation of recalcitrant pesticides: a review. *Environ Chem Lett* [Internet]. agosto de 2021 [citado 19 de septiembre de 2022];19(4):3209-28. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s10311-021-01236-5>
34. Datta R, Kelkar A, Baraniya D, Molaei A, Moulick A, Meena R, et al. Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. *Sustainability* [Internet]. 3 de julio de 2017 [citado 20 de septiembre de 2022];9(7):1163. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2071-1050/9/7/1163>
35. Corrales Ramírez LC, Caycedo Lozano L. Principios físicoquímicos de los colorantes

- utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. Nova [Internet]. 10 de febrero de 2020 [citado 20 de septiembre de 2022];18(33). Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/3701>
36. Satyanarayana T, Deshmukh SK, Deshpande MV, editores. *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [citado 19 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-9349-5>
 37. Syafrudin M, Kristanti RA, Yuniarto A, Hadibarata T, Rhee J, Al-onazi WA, et al. Pesticides in Drinking Water—A Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 8 de enero de 2021 [citado 19 de septiembre de 2022];18(2):468. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/2/468>
 38. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl Sci* [Internet]. noviembre de 2019 [citado 19 de septiembre de 2022];1(11):1446. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s42452-019-1485-1>
 39. CDC. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet [Internet]. National Biomonitoring Program. 2022. Disponible en: [https://www.cdc.gov/biomonitoring/PAHs_FactSheet.html#:~:text=Polycyclic%20aromatic%20hydrocarbons%20\(PAHs\)%20are,other%20foods%20will%20form%20PAHs.](https://www.cdc.gov/biomonitoring/PAHs_FactSheet.html#:~:text=Polycyclic%20aromatic%20hydrocarbons%20(PAHs)%20are,other%20foods%20will%20form%20PAHs.)
 40. CDC. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). 1995; Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html
 41. Raychaudhuri A, Rishi Gurjar, Somdipta Bagchi, Manaswini Behera. Application of microbial electrochemical system for industrial wastewater treatment. En: *Advances in Green and Sustainable Chemistry* [Internet]. 2022. p. 195-215. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323907651000125#!>
 42. Goltapeh EM, Danesh YR, Varma A, editores. *Fungi as Bioremediators* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [citado 22 de septiembre de 2022]. (Soil Biology; vol. 32). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-33811-3>
 43. Sharma B, Dangi AK, Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J Environ Manage* [Internet]. marzo de 2018 [citado 22 de septiembre de 2022];210:10-22. Disponible en:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030147971731263X>

44. Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Świdarska-Burek U, Jarosz-Wilkołazka A, Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 1 de noviembre de 2017 [citado 19 de septiembre de 2022];41(6):941-62. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/6/941/4569254>
45. Zainith S, Chowdhary P, Mani S, Mishra S. Microbial ligninolytic enzymes and their role in bioremediation. En: *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 15 de septiembre de 2022]. p. 179-203. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128190012000097>
46. Mendonça Maciel MJ, Castro e Silva A, Telles Ribeiro HC. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electron J Biotechnol* [Internet]. 15 de noviembre de 2010 [citado 15 de septiembre de 2022];13(6):0-0. Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol13/issue6/full/2/index.html>
47. Kumar A, Chandra R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* [Internet]. febrero de 2020 [citado 22 de septiembre de 2022];6(2):e03170. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020300153>
48. Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkołazka A, et al. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *Int J Mol Sci* [Internet]. 31 de enero de 2020 [citado 22 de septiembre de 2022];21(3):966. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/966>
49. Colombia Turismo Web. Nuquí [Internet]. Disponible en: <http://www.colombiaturismoweb.com/DEPARTAMENTOS/CHOCO/MUNICIPIOS/NUQUI/NUQUI.htm>
50. Weather Atlas. Clima y previsión meteorológica mensual. Lloro, Colombia [Internet]. Disponible en: [https://www.weather-atlas.com/es/colombia/lloro-clima#:~:text=Los%20meses%20con%20la%20humedad,baja%20es%20Febrero%20\(85%25\)](https://www.weather-atlas.com/es/colombia/lloro-clima#:~:text=Los%20meses%20con%20la%20humedad,baja%20es%20Febrero%20(85%25))
51. Frederick RD, Snyder CL, Peterson GL, Bonde MR. Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection and Discrimination of the Soybean Rust Pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. *Phytopathology*® [Internet]. febrero de 2002 [citado 19 de septiembre de 2022];92(2):153-158. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.2.153>

- 2022];92(2):217-27. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2002.92.2.217>
52. White, Bruns, Lee, Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. En: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. 1990.
53. Franco-Molano Ana Esperanza, Vasco-P. Aida, López-Quintero Carlos, Boekhout T. Macrohongos de la región del medio Caquetá. Guía de campo. [Internet]. primera. Medellín: Universidad de Antioquia; 2005. Disponible en: <https://biblioteca.ecosur.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=000039715>
54. Fergus CL. Illustrated genera of wood decay fungi. 1960;148. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19611101650>
55. Largent D, Johnson D, Watling R, Stuntz DE. How to Identify Mushrooms to Genus. I: Macroscopic Features. Bull Torrey Bot Club [Internet]. julio de 1978 [citado 22 de septiembre de 2022];105(3):240. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2484126?origin=crossref>
56. Largent D, Johnson D, Watling R. MUSHROOMS i: TO GENUS 111: Torrey Botanical Society [Internet]. 1977;105(3):84. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/How-to-Identify-Mushrooms-to-Genus-III%3A-Microscopic-Largent/9239de5db1a05afa826f2c6b17a2b70711560c89>
57. Noordeloos ME, Kuyper TW, Vellinga EC. Flora agaricina Neerlandica, critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands. Sci Hortic [Internet]. septiembre de 1996 [citado 22 de septiembre de 2022];66(1-2):138-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304423896810806>
58. Ryvarden L. Genera of Polypores, Nomenclature and Taxonomy [Internet]. 1991. 1-363. p. (Synopsis Fungorum; vol. 5). Disponible en: <https://www.nhbs.com/synopsis-fungorum-volume-5-genera-of-polypores-nomenclature-and-taxonomy-book>
59. Mata M. Macrohongos de Costa Rica [Internet]. Vol. 1. INBIO; 2003. Disponible en: <https://www.amazon.com/-/es/Milagro-Mata/dp/9968702870>
60. Mata M. Macrohongos de Costa Rica [Internet]. 1.^a ed. Vol. 2. INBIO; 2003. Disponible en: <https://www.amazon.es/Macrohongos-Costa-Rica-Macrofungi-Vol/dp/9968702862>
61. Puerto W. Desarrollo de un medio de cultivo de origen natural para el crecimiento de microorganismos con capacidad ligninolítica [Internet]. [Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]; 2019. Disponible en:

- <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3708/Informe%20final%20Wilson%20Alejandro%20Puerto%20Zea.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
62. Rubilar O. Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca. :148. Disponible en: <https://doctoradornn.ufro.cl/wp-content/uploads/2021/01/12-olga-rubilar.pdf>
 63. Oliveros CV, Chegwin Angarita C, Ardila Barrantes HD. Condiciones para el análisis de proteínas del micelio de *Lentinula edodes* obtenido por fermentación en estado líquido. Rev Colomb Quím [Internet]. 1 de septiembre de 2019 [citado 23 de septiembre de 2022];48(3):3-12. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/74843>
 64. Rodríguez I, Piñeros Y. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. 13 de septiembre de 2007;14(2):8. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v14n2/v14n2a05.pdf>
 65. Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M, Paszczyński AJ. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. Enzyme Microb Technol [Internet]. enero de 2013 [citado 22 de septiembre de 2022];52(1):1-12. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022912001718>
 66. Quantabio. AccuStart™ II PCR ToughMix® (2X) [Internet]. Disponible en: https://www.quantabio.com/media/contenttype/IFU-098.1_REV_03_95142_AccuStart_II_PCR_ToughMix_.pdf
 67. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 17 de abril de 2012 [citado 23 de septiembre de 2022];109(16):6241-6. Disponible en: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1117018109>
 68. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? IMA Fungus [Internet]. diciembre de 2020 [citado 23 de septiembre de 2022];11(1):14. Disponible en: <https://IMAFungus.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43008-020-00033-z>
 69. Peintner U, Kuhnert-Finkernagel R, Wille V, Biasioli F, Shiryaev A, Perini C. How to resolve cryptic species of polypores: an example in *Fomes*. IMA Fungus [Internet]. diciembre

- de 2019 [citado 23 de septiembre de 2022];10(1):17. Disponible en: <https://IMAFungus.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43008-019-0016-4>
70. Xu J. Fungal DNA barcoding. Adamowicz S, editor. *Genome* [Internet]. noviembre de 2016 [citado 21 de septiembre de 2022];59(11):913-32. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/gen-2016-0046>
71. Hapuarachchi KK. A Review on Bioactive Compounds, Beneficial Properties and Biotechnological Approaches of *Trametes* (Polyporaceae, Polyporales) and a New Record from Laos. *Chiang Mai J Sci* [Internet]. 2021;28(3):25. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/352035172_A_Review_on_Bioactive_Compounds_Beneficial_Properties_and_Biotechnological_Approaches_of_Trametes_Polyporaceae_Polyporales_and_a_New_Record_from_Laos
72. Cambri G, de Sousa MML, Fonseca D de M, Marchini FK, da Silveira JLM, Paba J. Analysis of the Biotechnological Potential of a *Lentinus crinitus* Isolate in the Light of Its Secretome. *J Proteome Res* [Internet]. 2 de diciembre de 2016 [citado 23 de septiembre de 2022];15(12):4557-68. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00636>
73. Oghenekaro AO, Raffaello T, Kovalchuk A, Asiegbu FO. De novo transcriptomic assembly and profiling of *Rigidoporus microporus* during saprotrophic growth on rubber wood. *BMC Genomics* [Internet]. diciembre de 2016 [citado 23 de septiembre de 2022];17(1):234. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/17/234>
74. Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGT, et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers* [Internet]. julio de 2019 [citado 23 de septiembre de 2022];97(1):1-136. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13225-019-00430-9>
75. Zheng C, Cheung TM, Leung GP. A review of the phytochemical and pharmacological properties of *Amauroderma rugosum*. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. junio de 2022 [citado 23 de septiembre de 2022];38(6):509-16. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/kjm2.12554>
76. Duarte M, Seixas A, Peres de Carvalho M, Tasca T, Macedo AJ. Amaurocine: Anti-*Trichomonas vaginalis* protein produced by the basidiomycete *Amauroderma camerarium*. *Exp Parasitol* [Internet]. febrero de 2016 [citado 23 de septiembre de 2022];161:6-11. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489415300758>

77. Elias LM, Fortkamp D, Sartori SB, Ferreira MC, Gomes LH, Azevedo JL, et al. The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. as antifungal agents against anthracnose. *Braz J Microbiol* [Internet]. octubre de 2018 [citado 23 de septiembre de 2022];49(4):840-7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S151783821730237X>
78. Falandysz J, Nnorom IC, Jarzyńska G, Romińska D, Damps K. Mercury Bio-Concentration by Puffballs (*Lycoperdon perlatum*) and Evaluation of Dietary Intake Risks. *Bull Environ Contam Toxicol* [Internet]. octubre de 2012 [citado 23 de septiembre de 2022];89(4):759-63. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00128-012-0788-3>
79. Lomascolo A, Uzan-Boukhris E, Herpoël-Gimbert I, Sigoillot JC, Lesage-Meessen L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. diciembre de 2011 [citado 23 de septiembre de 2022];92(6):1129-49. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3596-5>

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.

Medio PDA

1. Suspender 39 g de medio PDA liofilizado en 1 litro de agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. Servir en placas de Petri.

Agar avena

1. Suspender 30 g de harina de avena y 20 g de Agar-Agar en 1 litro de agua destilada.
2. Llevar a ebullición para disolver por completo.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Servir en placas de Petri.

Caldo PD

1. Cocinar 200 g de papa sabanera sin cáscara en 1 litro de agua destilada.
2. Filtrar el caldo con una gasa.
3. Agregar 20 g de Dextrosa.
4. Mezclar hasta disolver por completo.
5. Servir en matraces pequeños con 20 ml aproximadamente y tapar con torundas de algodón envueltas en gasa.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Medio modificado con extracto de sustrato leñoso

- Extracción de la lignina de corteza y madera aserrada de urapán (*Fraxinus* sp.) y pino (*Pinus* sp.)
1. El protocolo es igual para las dos especies de árboles (urapán y pino) pero se realiza por separado.
 2. Mezclar el aserrín de la corteza con el de la madera.
 3. Suspender 100 g de aserrín en 150 mL de soda cáustica al 4 %.
 4. Llevar a fuego bajo hasta la emisión de vapores.
 5. Desde la emisión de vapores mantener por 45 minutos en fuego bajo.
 6. Filtrar el líquido obtenido en un embudo con papel filtro y apisonar para obtener la mayor cantidad de líquido rico en lignina.
 7. Conservar este líquido en un frasco ámbar.

- Preparación del medio de cultivo

1. Suspender los componentes mencionados a continuación en un litro de agua destilada:

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
Agar-Agar	20 g/L
Líqu. rico en lignina	5 mL

2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. Servir en placas de Petri.

Medio modificado con colorantes Azure B y Rojo Fenol

1. Suspender los componentes mencionados a continuación en un litro de agua destilada:

Glucosa	10 g
Tartrato de amonio	0,2 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
Agar	22 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
pH	5,5

2. Mezclar hasta disolver por completo.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Cuando el medio esté a punto de servirse, agregar 0.2 g de colorante y mezclar hasta disolver por completo
5. Filtrar con gasa estéril y servir en placas de Petri.


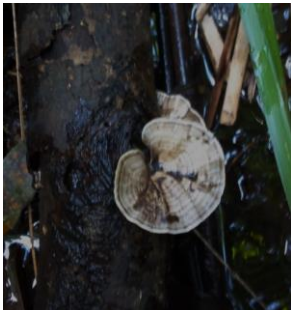








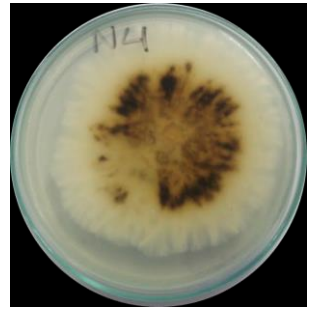
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN por medio del kit de purificación de DNA genómico Wizard® para Hongos filamentosos








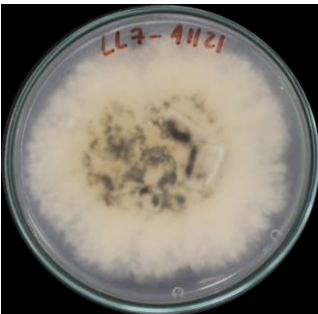

1. Macerar 60 mg de micelio obtenido del crecimiento obtenido y filtrado del caldo PD en nitrógeno líquido y llevarlos a un tubo Eppendorf de 1.5mL
2. Agregar 600µL de Nuclei Lysis Solution e incubar a 65°C por 15 min y posteriormente vórtex para homogeneizar.
3. Agregar 3µL de RNase Solution, incubar a 37°C por 15 minutos y vórtex. Finalmente mantener a temperatura ambiente por 15 min.
4. Agregar 200µL de Protein Precipitation Solution, llevar a vórtex por 20 segundos y luego 10 min en hielo para maximizar la precipitación.
5. Centrifugar a 13000 g por 4 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5mL nuevo.
7. Agregar 600µL de isopropanol y mezclar suavemente de 5 a 7 veces.
8. Centrifugar a 13000 g por 2 minutos.
9. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y agregar etanol al 70% (entre 600µL y 1 mL). Mezclar suavemente de 5 a 7 veces.
10. Centrifugar a 13000 g por 2 minutos.
11. Descartar el etanol y dejar secar al aire toda la noche.
12. Agregar 100µL de solución de rehidratación y llevar a vórtex.
13. Incubar a 65°C por una hora o toda la noche a 4°C.


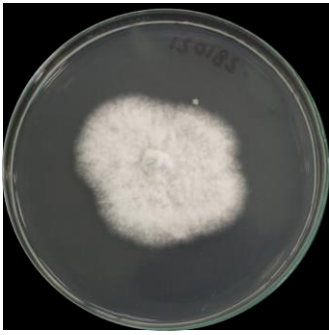





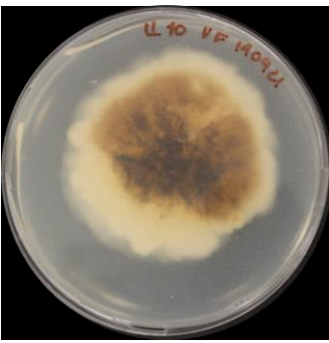
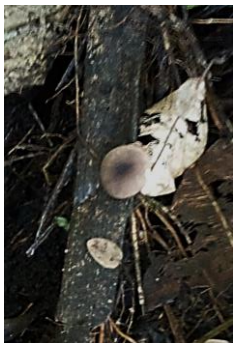
Anexo 3. Protocolo de extracción cruda de ADN (46).





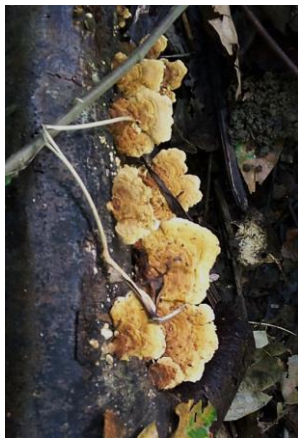




1. Suspender aproximadamente 10 mg de micelio filtrado en 100 mL de tampón de extracción (89 mM Tris-HCl, pH 8,0, ácido bórico 45 mM, EDTA 0,05 mM y 1,0% (vol/vol)β-mercaptoetanol) en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
2. Triturar el micelio suspendido con una punta de plástico acoplada a un taladro eléctrico hasta observar una mezcla homogénea, es importante evitar dejar calentar la muestra durante la trituración.
3. Incubar a 75 °C durante 15 min.
4. Centrifugar a 16.000 × g durante 10 min.
5. Transferir 50 uL del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y almacenar a – 20°C.

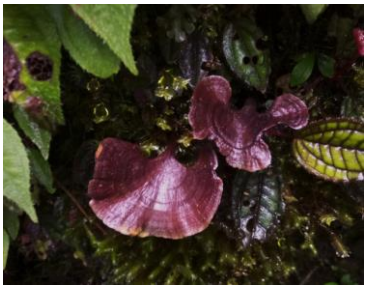







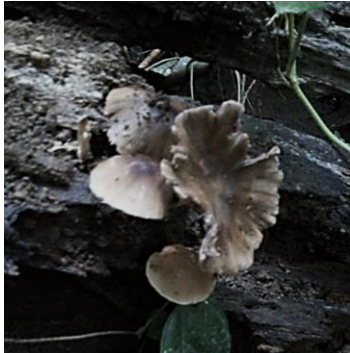
Anexo 4. Registro fotográfico de los macrohongos recolectados y los aislamientos obtenidos.







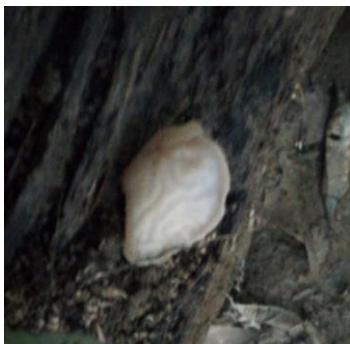




Municipio Lloró			Municipio Nuquí, corregimiento Panguí		
Código, fecha y coordenadas geográficas	Registro fotográfico	Aislamiento en medio PDA y/o Agar avena	Código, fecha y coordenadas geográficas	Registro fotográfico	Aislamiento en medio PDA y/o Agar avena
<p>LL-1</p> <p>05.07.21 5.49835,-76.54503</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-1</p> <p>11.07.21 5.66469,-77.31398</p>		
<p>LL-3</p> <p>05.07.21 5.49578,-76.53590</p>			<p>N-3</p> <p>11.07.21 5.66479,-77.31442</p>		
<p>LL-4</p> <p>05.07.21 5.496,-76.53611</p>			<p>N-4</p> <p>11.07.21 5.66517,-77.31469</p>		


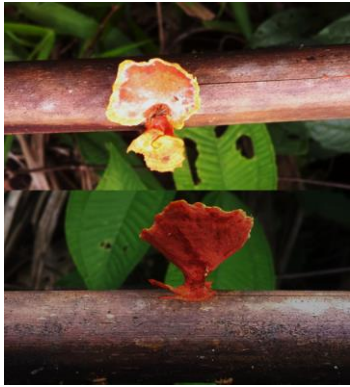
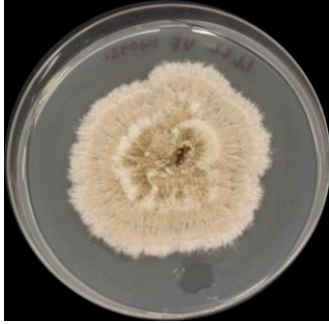



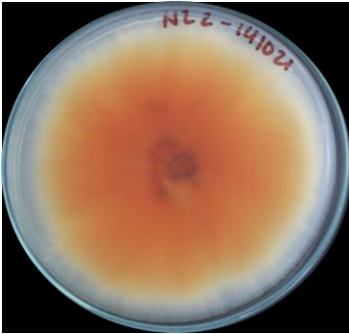



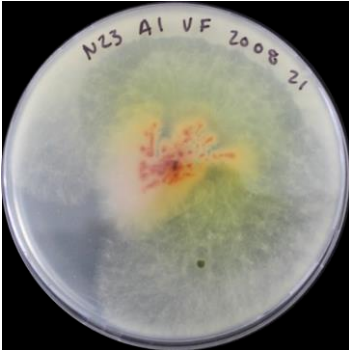
<p>LL-5</p> <p>05.07.21 5.49835,-76.54503</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-5</p> <p>11.07.21 5.66513,-77.3146</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-6</p> <p>05.07.21 5.49572,-76.53519</p>			<p>N-6</p> <p>11.07.21 5.66541,-77.31475</p>		
<p>LL-7</p> <p>05.07.21 5.49835,-76.54503</p>			<p>N-7</p> <p>11.07.21 5.66552,-77.31476</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>




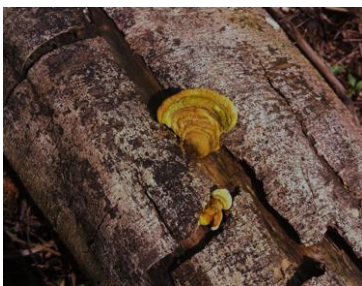
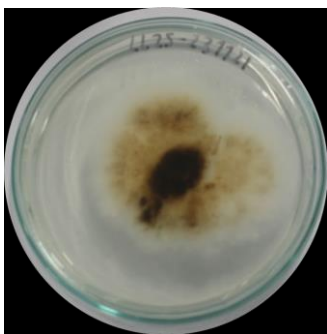




<p>LL-8</p> <p>05.07.21 5.49577,-76.53524</p>			<p>N-8</p> <p>11.07.21 5.66544,-77.31468</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-9</p> <p>05.07.21 5.49564,-76.53483</p>			<p>N-9</p> <p>11.07.21 5.66588,-77.31451</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-10</p> <p>05.07.21 5.49835,-76.54503</p>			<p>N-10</p> <p>11.07.21 5.66056,-77.31051</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>






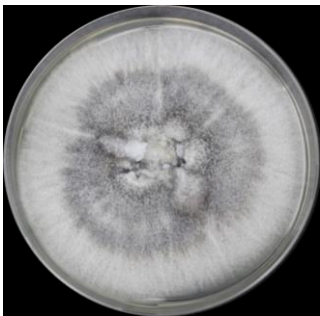

<p>LL-11 05.07.21</p>			<p>N-11 11.07.21 5.66055,-77.31056</p>		
<p>LL-12 06.07.21 5.49988,-76.54214</p>	<p>No fue posible hacer el registro fotográfico.</p>	<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-12 11.07.21 5.66051,-77.31059</p>		
<p>LL-13 06.07.21 5.49502,-76.52792</p>			<p>N-13 11.07.21 5.66033,-77.31041</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>






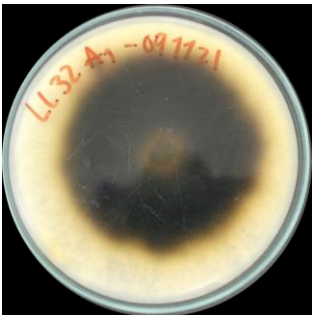

<p>LL-14</p> <p>06.07.21 5.49988,-76.54214</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-14</p> <p>11.07.21 5.66028,-77.31041</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-15</p> <p>06.07.21 5.49387,-76.52672</p>			<p>N-15</p> <p>11.07.21 5.66029,-77.31031</p>		
<p>LL-17</p> <p>06.07.21 5.49391,-76.52665</p>			<p>N-17</p> <p>11.07.21 5.65997,-77.31058</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>





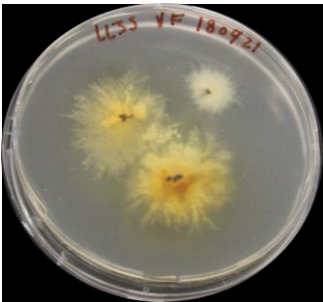
<p>LL-18 06.07.21 5.49956,-76.54214</p>			<p>N-18 11.07.21 5.65997,-77.31058</p>		
<p>LL-19 07.07.21 5.4942,-76.52763</p>			<p>N-19 11.07.21 5.65985,-77.31061</p>		
<p>LL-20 07.07.21 5.4942,-76.52763</p>	<p>No fue posible hacer el registro fotográfico.</p>		<p>N-20 11.07.21 5.65992,-77.3104</p>		






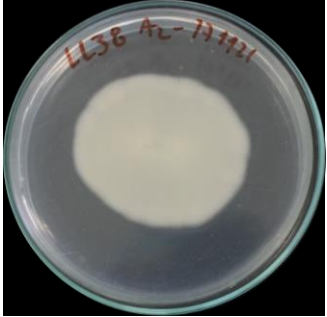
<p>LL-21 07.07.21 5.49813,-76.53253</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-21 12.07.21 5.7091,-77.26799</p>		
<p>LL-22 07.07.21 5.49814,-76.53266</p>			<p>N-22 12.07.21 5.70144,-77.27802</p>		
<p>LL-23 07.07.21 5.49801,-76.53359</p>			<p>N-23 12.07.21 5.7011,-77.27886</p>		

<p>LL-24 07.07.21 5.49797,-76.53346</p>			<p>N-24 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-25 07.07.21 5.49835,-76.54503</p>			<p>N-25 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-26 07.07.21 5.497,-76.53558</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-26 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		

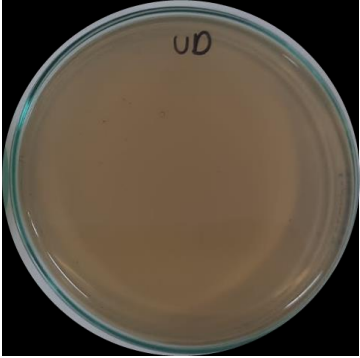
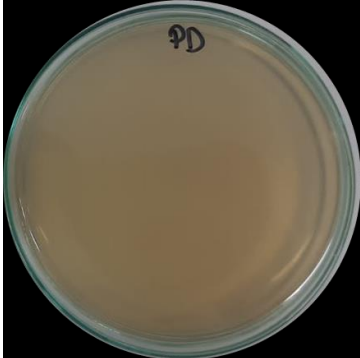
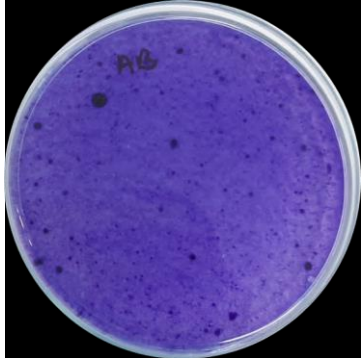
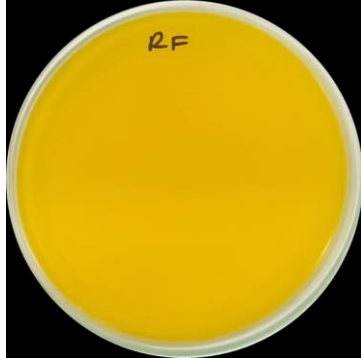


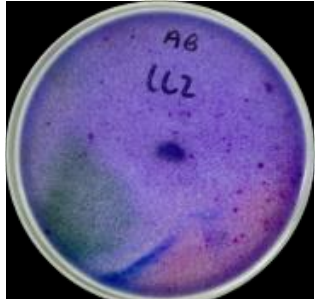

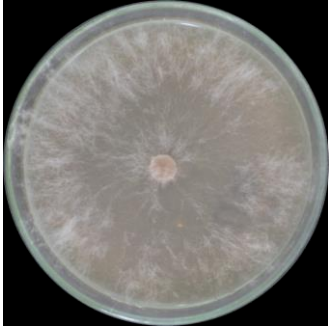
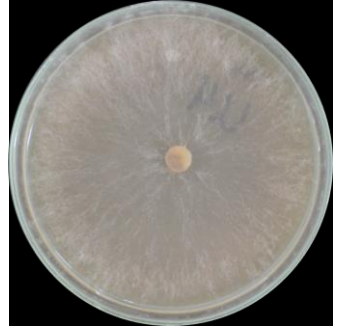
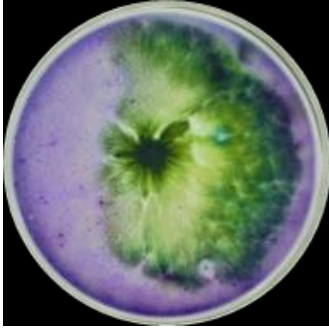

<p>LL-27 07.07.21 5.49699,-76.53545</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-27 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-28 07.07.21 5.49906,-76.54792</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-28 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-29 08.07.21 5.49906,-76.54792</p>			<p>N-29 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>


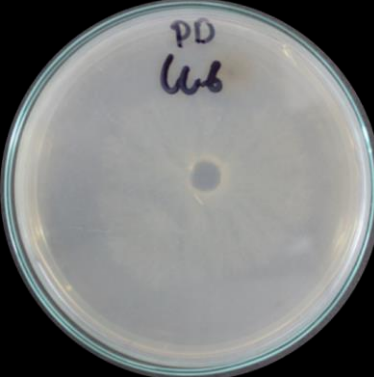
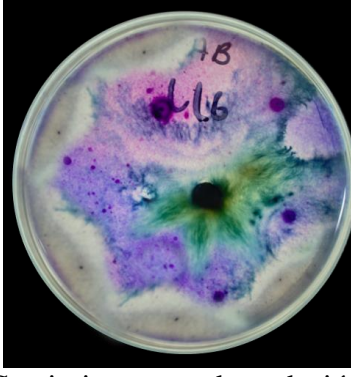








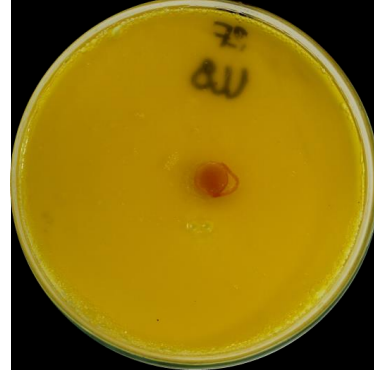
<p>LL-30 08.07.21 5.49988,-76.54178</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-30 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>	<p>No fue posible hacer el registro fotográfico.</p>	<p>No fue posible aislarlo.</p>
<p>LL-31 08.07.21 5.4997,-76.54198</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-31 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		
<p>LL-32 08.07.21 5.49988,-76.54178</p>			<p>N-32 13.07.21 5.66348,-77.30982</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>

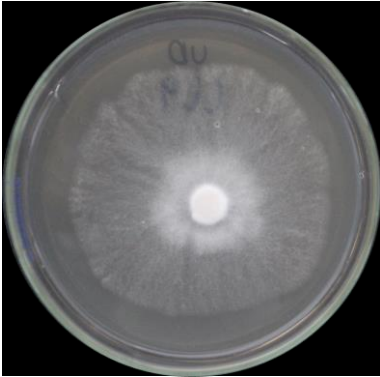
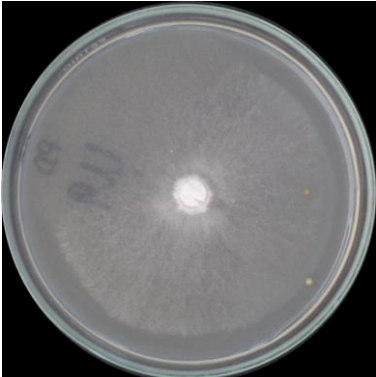




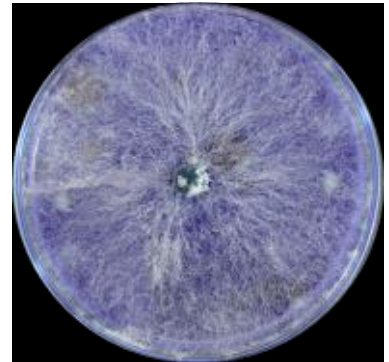
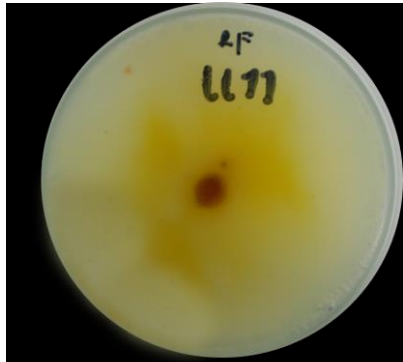

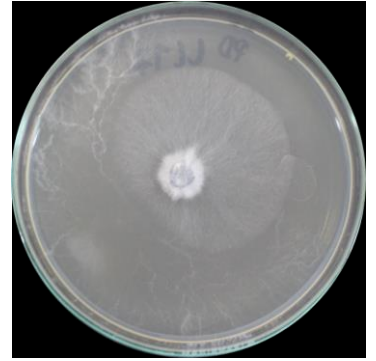
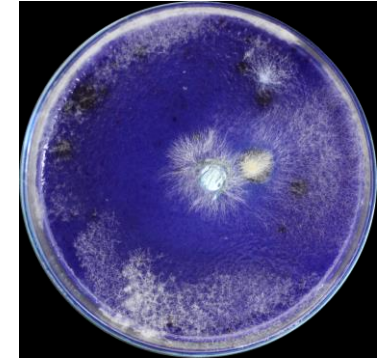
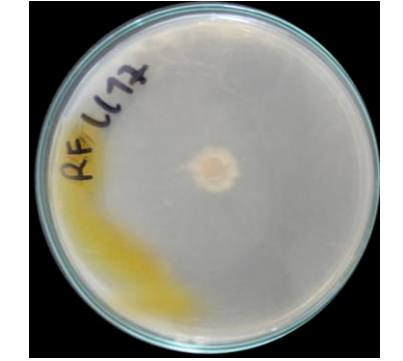
<p>LL-33</p> <p>08.07.21 5.49988,-76.54178</p>	<p>No fue posible hacer el registro fotográfico.</p>	<p>No fue posible aislarlo.</p>	<p>N-33</p> <p>14.07.21 5.66374,-77.31543</p>		
<p>LL-34</p> <p>08.07.21 5.48201,-76.54353</p>		<p>No fue posible aislarlo.</p>			
<p>LL-35</p> <p>08.07.21 5.48319,-76.54011</p>					


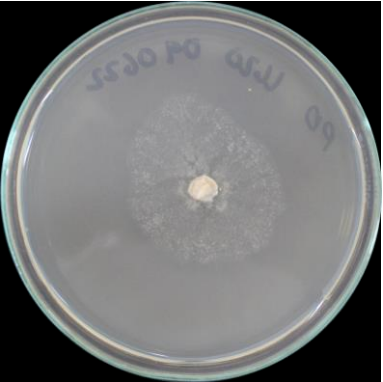
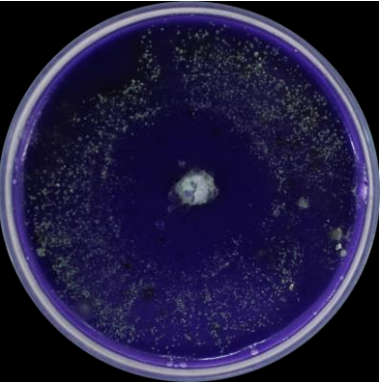


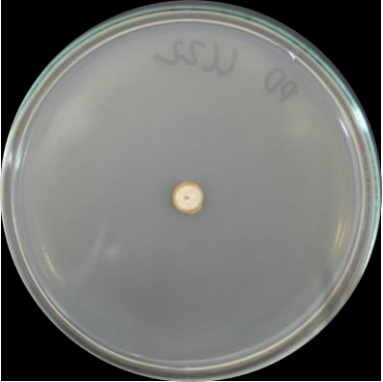

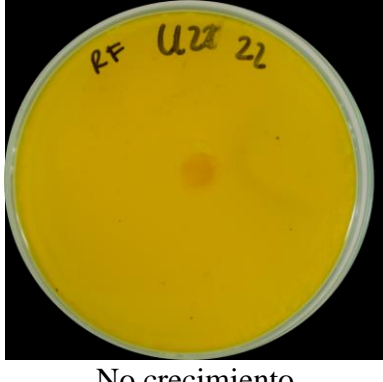
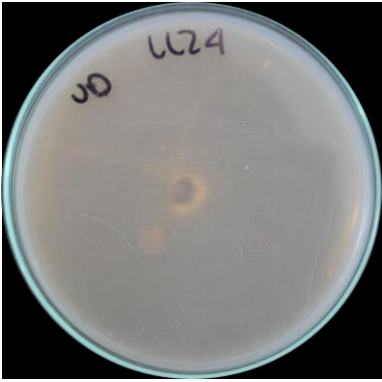
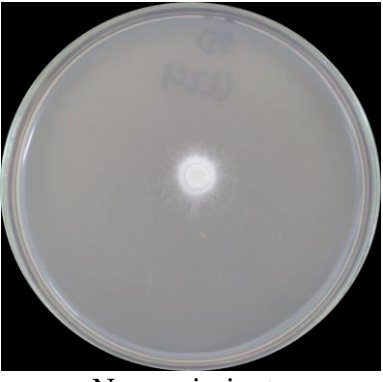

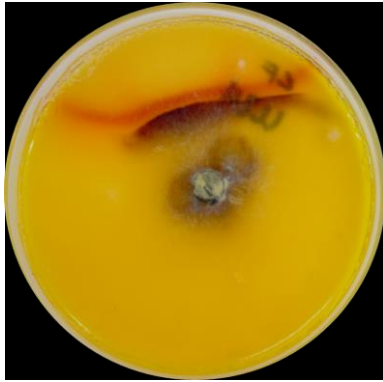
<p>LL-36</p> <p>08.07.21</p> <p>5.46477,-76.54431</p>					
<p>LL-37</p> <p>08.07.21</p> <p>5.46477,-76.54431</p>					
<p>LL-38</p> <p>08.07.21</p> <p>5.48546,-76.54084</p>					


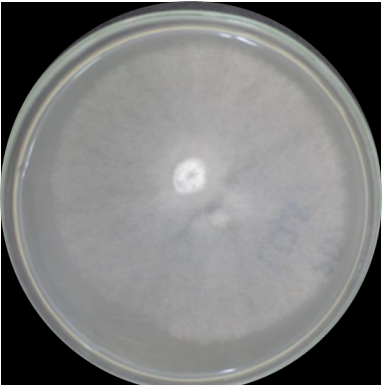
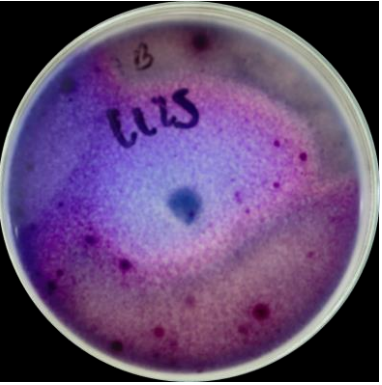


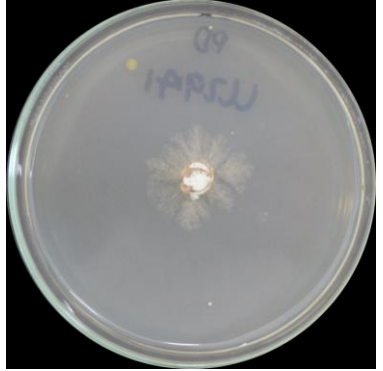
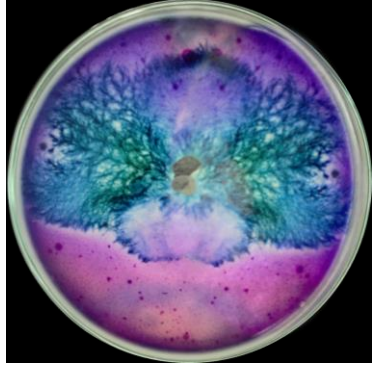

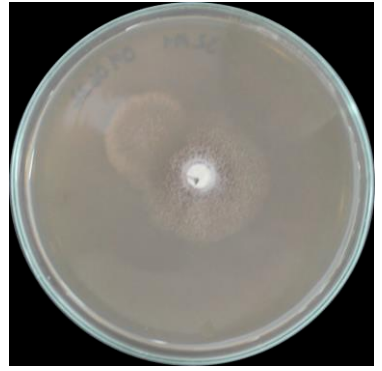
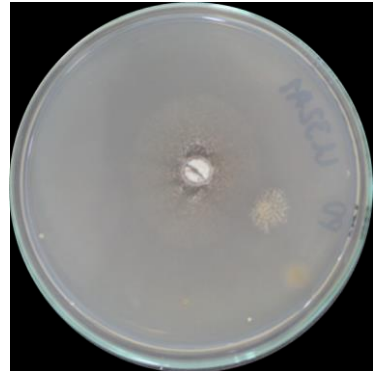
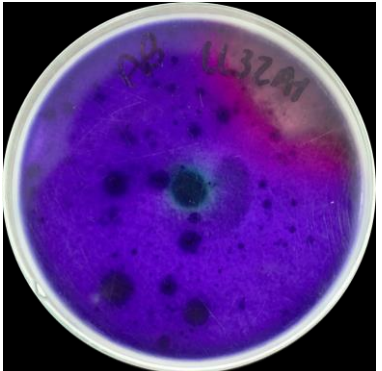

Anexo 5. Crecimiento de los macrohongos aislados en medios modificados.



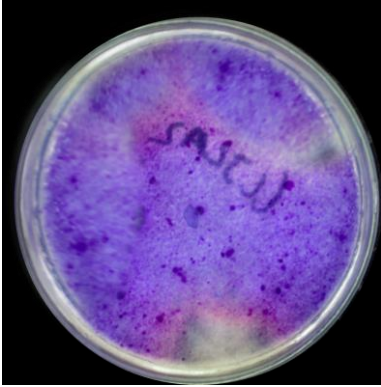

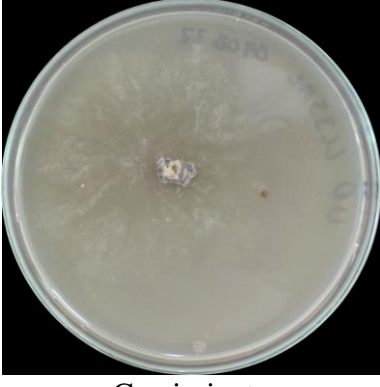

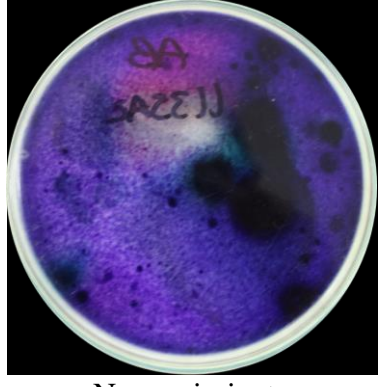




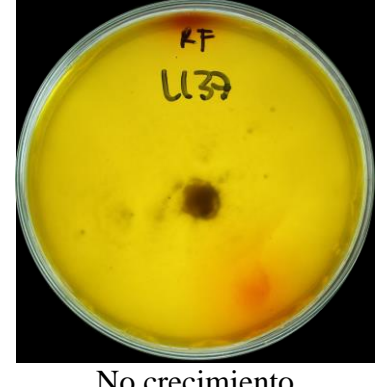
Código	Medio con extracto de sustrato leñoso de urapán	Medio con extracto de sustrato leñoso de pino	Medio con colorante azure B	Medio con colorante rojo fenol
Control negativo	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>
LL2	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>
LL4	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>

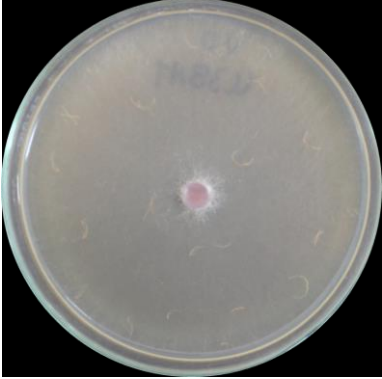
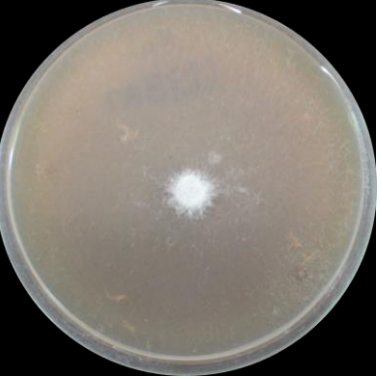
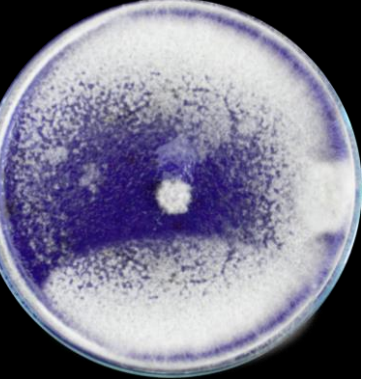

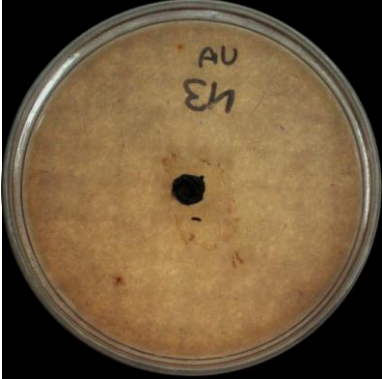
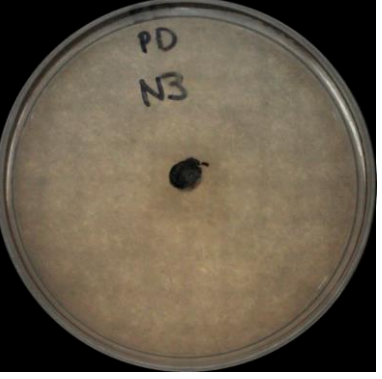

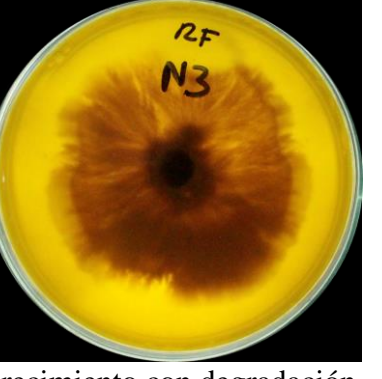
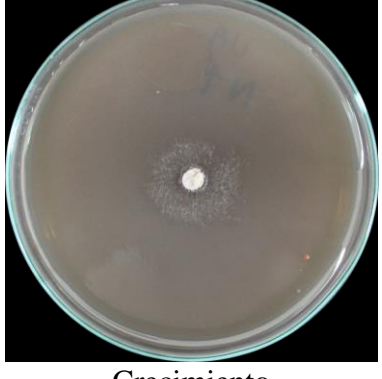
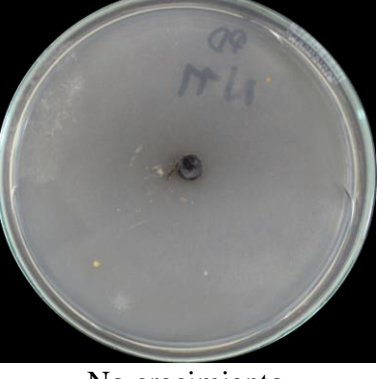
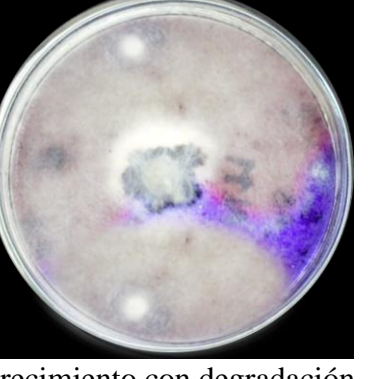
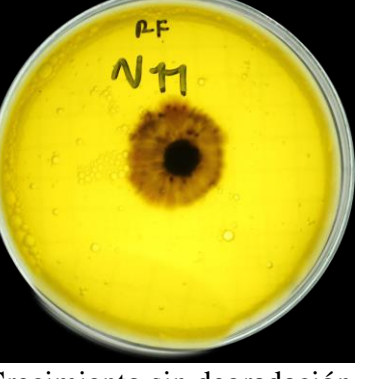
LL6	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
LL7	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
LL8	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>No crecimiento</p>

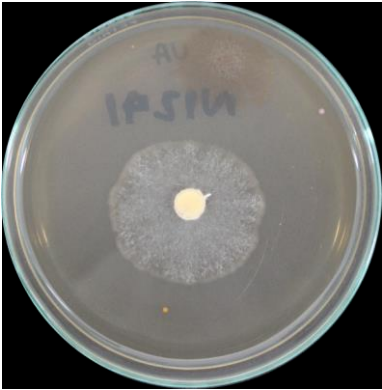

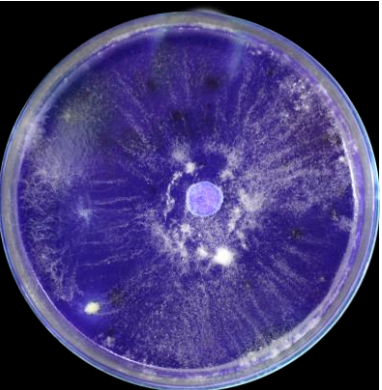
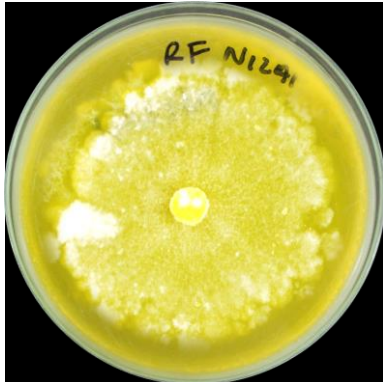


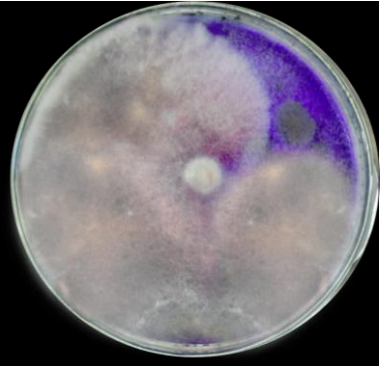

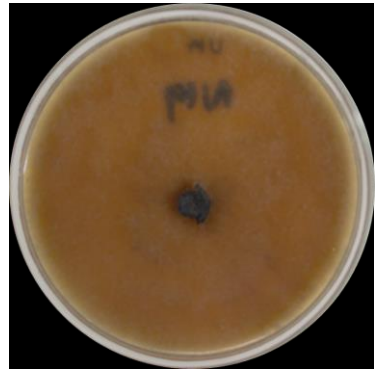
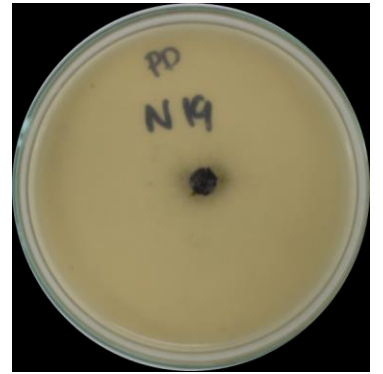
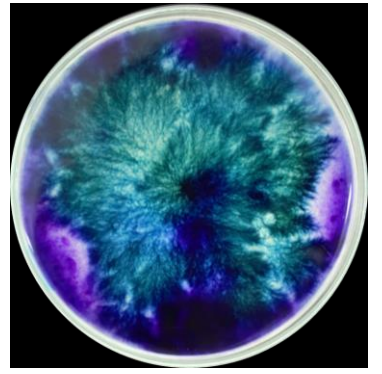
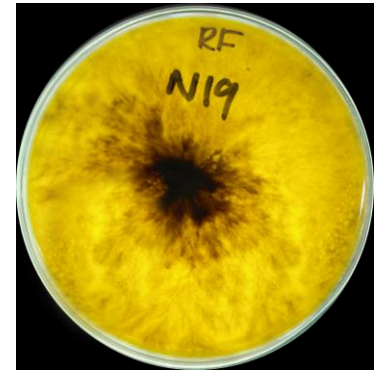
<p>LL9</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
<p>LL11</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
<p>LL17</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>

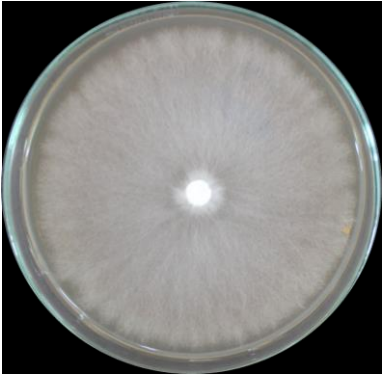
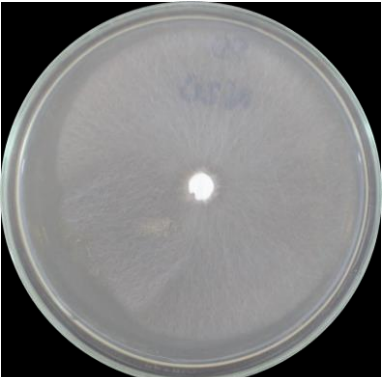
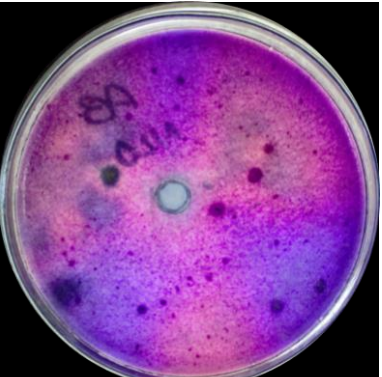


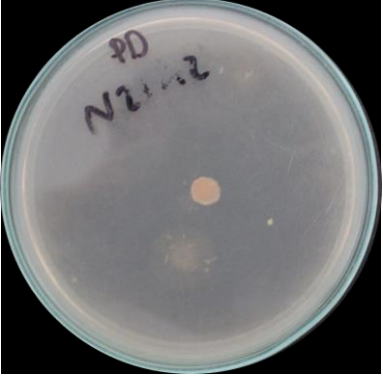
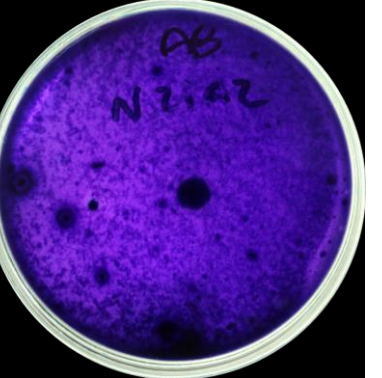

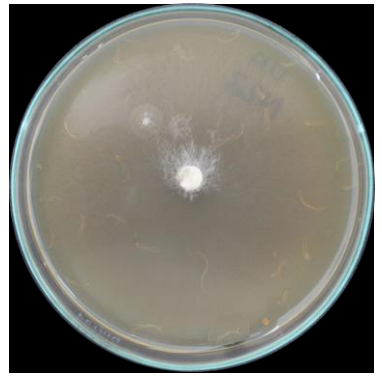
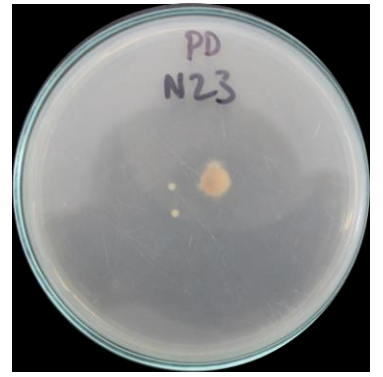
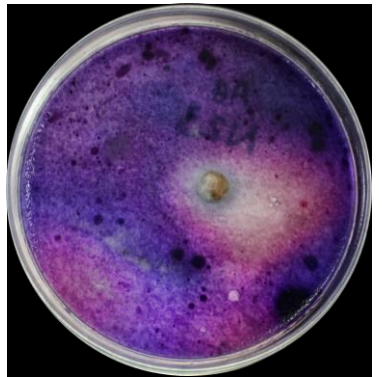

LL20	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
LL22	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>
LL24	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>No crecimiento</p>

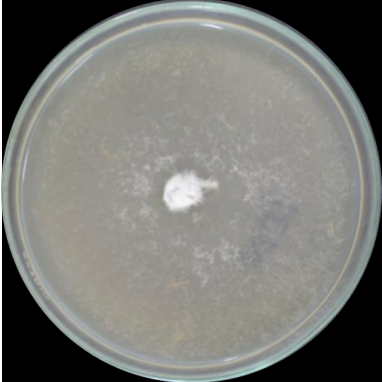
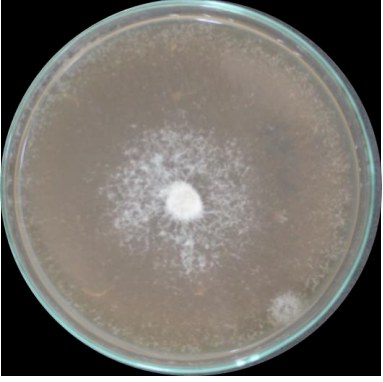
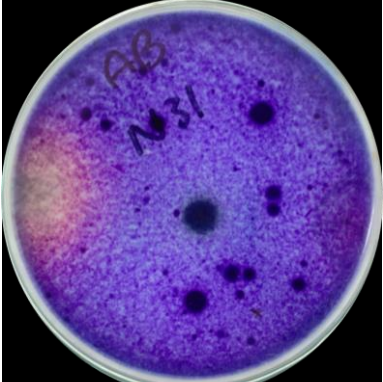

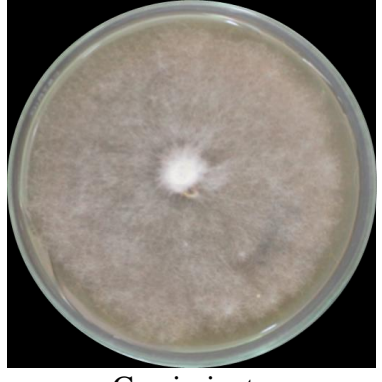
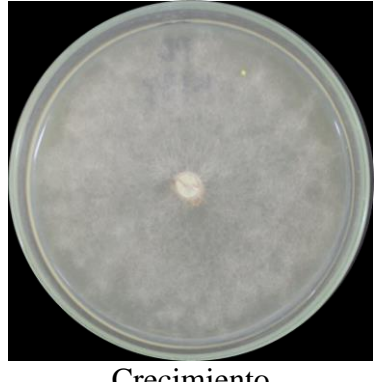
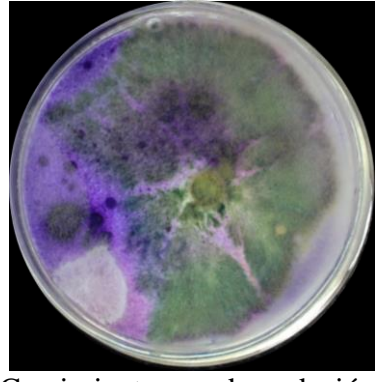

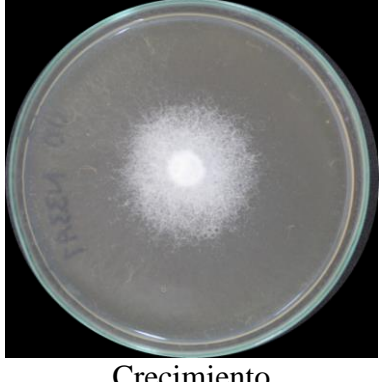

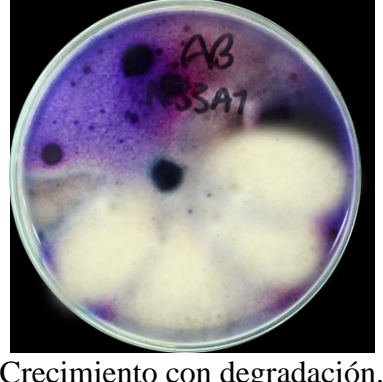

<p>LL25</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>No crecimiento</p>
<p>LL29</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
<p>LL32A1</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>

LL32A2	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
LL35	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>
LL37	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>No crecimiento</p>

LL38	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
N3	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
N11	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>

<p>N12</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
<p>N18</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
<p>N19</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>

N20	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
N21	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
N23	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>

<p>N31</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>No crecimiento</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>
<p>N33</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>
<p>N33A1</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento</p>	 <p>Crecimiento con degradación.</p>	 <p>Crecimiento sin degradación.</p>

Anexo 6. Homología de las secuencias de la región ITS del ADNr de hongos aislados que no presentaron actividad ligninolítica.

	Código	Homología en GenBank	Número de accesión	Identidad %	Valor e
1	LL10	<i>Auricularia</i> sp.	KM583898.1	99%	0.0
2	LL15	<i>Trametes</i> sp.	JX040840.1	98%	0.0
3	LL18	<i>Hexagonia</i> sp.	MK968437.1	95%	0.0
4	LL23	<i>Oudemansiella</i> sp.	HQ331034.1	100%	0.0
5	N1	<i>Hexagonia</i> sp.	MF195031.1	99%	0.0
6	N4	<i>Trametes</i> sp.	KU253773.1	96%	0.0

Anexo 7. Hongos identificados solo por comparación con claves taxonómicas.

	Código	Género identificado
1	LL1	<i>Ganoderma</i> sp.
2	LL3	<i>Auricularia</i> sp.
3	LL5	<i>Trametes</i> sp.
4	LL10	<i>Auricularia</i> sp.
5	LL14	<i>Hymenochaete damicornis</i>
6	LL21	<i>Lentinus</i> sp.
7	LL27	<i>Stereum</i> sp.
8	LL34	<i>Cookeina</i> sp.
9	N9	<i>Cookeina</i> sp.
10	N24	<i>Cookeina</i> sp.
11	N25	<i>Oudemansiella</i> sp.
12	N29	<i>Trametes</i> sp.