

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



“ANÁLISIS DE CAPACIDAD LIGNINOLÍTICA DE HONGOS BASIDIOMICETOS
PROCEDENTES DE LA RESERVA SABIA ESPERANZA PARA LA
DEGRADACIÓN DE BAGAZO DE CAÑA”

Trabajo de titulación previa a la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

AUTOR:

CRISTIAN ISRAEL CARLOSAMA QUINATO A

DIRECTOR:

Ing. Santiago Zárate. MSc

Ibarra – Ecuador
2020

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“ANÁLISIS DE CAPACIDAD LIGNINOLÍTICA DE HONGOS BASIDIOMICETOS
PROCEDENTES DE LA RESERVA SABIA ESPERANZA PARA LA
DEGRADACIÓN DE BAGAZO DE CAÑA”

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor, por lo cual, se autoriza su presentación
como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:



ING. SANTIAGO ZARATE, MSc.
DIRECTOR



BLGO. PEDRO BARBA, MSc.
ASESOR



ING. CARLA SANDOVAL, MSc.
ASESORA



JUAN CARLOS GARCÍA, PhD.
ASESOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	DE	1725315053	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Y	Carlosama Quinatoa Cristian Israel	
DIRECCIÓN:	Cayambe, Marchena y Rocafuerte		
EMAIL:	cicarlosama@utm.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	(02)2 2111 022	TELÉFONO MÓVIL:	0987824549

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	ANÁLISIS DE CAPACIDAD LIGNINOLÍTICA DE HONGOS BASIDIOMICETOS PROCEDENTES DE LA RESERVA SABIA ESPERANZA PARA LA DEGRADACIÓN DE BAGAZO DE CAÑA
AUTOR (ES):	Carlosama Quinatoa Cristian Israel
FECHA: DD/MM/AAAA	7/09/2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Santiago Zárate, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 7 días del mes de septiembre de 2020

EL AUTOR:

(Firma)

Nombre: Cristian Carlosama

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a Dios por ser mi guía, salvador y sostén. Por su ayuda en todo mi formación profesional. Estando persuadido de esto, que el que comenzó en vosotros la buena obra, la perfeccionará hasta el día de Jesucristo. Filipenses 1:6 (Reina-Valera, 1960).

A mis padres, Oswaldo y Mirian por su amor y apoyo. Son mi ejemplo a seguir y estoy agradecido a Dios por sus vidas. De igual manera mi hermana y hermano, Adriana y Jeremy que con su ayuda y confianza han sabido levantarme cuando estoy por decaer. A Carolina Quezada que con su amor y con sus palabras de aliento ha sabido ayudarme a no rendirme y seguir adelante. Gracias por todo lo que hacen por mí.

A la Universidad Técnica del Norte por permitirme ampliar mis conocimientos y continuar con mis estudios. En especial a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, donde los docentes fueron un pilar importante dentro de mi formación académica. Al Laboratorio de Biotecnología Aplicada que me permitió desarrollar la parte experimental de mi tesis y conocer grandes personas que con su amistad y conocimiento me ayudaron culminar la parte experimental de mi tesis. Gracias por los conocimientos que impartieron en mí. A mi director de Tesis Ing. Santiago Zárate. MSc, deja en mí en ejemplo de buen docente y calidad de persona. Gracias por la ayuda impartida en este proceso de titulación, brindarme su apoyo y ayudarme en los momentos que estaba a punto de decaer. Al PhD Juan Carlos García por su apoyo y permitirme formar parte de su equipo de investigación. También a mis asesores Ing. Carla Sandoval. MSc y Blgo. Pedro Barba por su contribución en el desarrollo del documento escrito y ayuda en la parte experimental.

Al ingeniero Marcelo Ramírez dueño de la Reserva Privada Sabia Esperanza, por permitirme realizar el muestreo y la acogida recibida. Asimismo, a los moradores de la localidad. Muchas gracias. También al Ing. Pablo Londoño y la Universidad Central por la ayuda en las pruebas de TGA. De igual manera a mis compañeros de proyecto Samanta, Juan, Sintia y Saúl por su guía en el proceso de investigación y su amistad.

Cristian

DEDICATORIA

Lo dedico a Dios primeramente, A Él sea toda la gloria y siempre van dedicados todos mis logros.

A mis padres por el apoyo incondicional que me brindaron en el proceso de titulación.

A mi hermana, Adriana quién me ayudó y sostuvo en muchas ocasiones. Dios te bendiga.

A Carolina Quezada por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

Cristian

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO	4
DEDICATORIA	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I.....	12
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Antecedentes.....	12
1.2 Definición del problema	13
1.3 Justificación	14
1.4 Pregunta directriz.....	15
1.5 Objetivos.....	15
1.5.1 Objetivo general	15
1.5.2 Objetivos específicos.....	15
1.5.3 Hipótesis	15
1.6 Marco legal.....	16
CAPÍTULO II.....	18
MARCO TEÓRICO	18
2.1 Revisión de literatura.....	18
2.1.1 Biomasa agroresidual.....	18
2.1.2 Bagazo de caña de azúcar	18
2.1.2 Producción de caña de azúcar en el Ecuador.....	18
2.1.3 Composición química del bagazo de caña de azúcar	19
2.1.3.1 Celulosa	19
2.1.3.2 Hemicelulosa	19
2.1.3.4 Lignina.....	20
2.1.4 Pretratamientos para delignificar biomasa agroresidual.....	20
2.1.4.1 Pretratamiento físico.....	20
2.1.4.2 Pretratamiento químico	20

2.1.4.3 Pretratamiento biológico	21
2.1.5 Hongos Lignocelulósicos	21
2.1.5.1 <i>Ganoderma sp</i>	21
2.1.5.2 <i>Trametes hirsuta</i>	21
2.1.7 Proceso biológico de la delignificación.....	22
2.1.8 Cuantificación de lignina.....	23
2.1.8.1 Análisis termogravimétrico (TGA)	23
CAPÍTULO III	24
3.1 Descripción del área de estudio	24
3.2 Obtención de material biológico	25
3.2.1 Recolección de muestras fúngicas	25
3.3 Obtención de cepas puras de hongos basidiomicetos	25
3.3.1 Siembra del cuerpo frutífero en medio de cultivo PDA	25
3.3.2 Aislamiento y conservación.....	26
3.4 Caracterización morfológica y molecular de hongos	26
3.4.1 Caracterización a partir del cuerpo fructífero	26
3.4.2 Microscopia óptica de hongos	27
3.4.3 Caracterización molecular de hongos	27
3.5 Descomposición biológica de bagazo de caña de azúcar	28
3.5.1 Preparación del sustrato de bagazo de caña.....	28
3.5.2. Inoculación y desarrollo miceliar	28
3.6 Cuantificación de polímeros vegetales por termogravimetría.....	29
3.6.1 Preparación del sustrato.....	29
3.6.2 Análisis termogravimétrico	29
3.7 Análisis estadístico de datos	30
CAPÍTULO IV	31
RESULTADOS	31
4.1 Aislamiento e identificación morfológica y molecular de los hongos de estudio	31
4.3 Crecimiento miceliar	34
4.4 Cuantificación de polímeros por termogravimetría.....	35
4.5 Análisis de degradación de polímeros en caña de azúcar.....	35
4.5.1 Diferencias entre bagazo y bagazo con medio enriquecido.	35

4.5.2 Contenido de lignina.....	36
4.5.3 Contenido de celulosa y hemicelulosa.....	37
CAPÍTULO V	38
DISCUSIÓN.....	38
CAPÍTULO VI.....	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
6.1 Conclusiones.....	43
6.2 Recomendaciones	44
CAPÍTULO VII.....	45
BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	45
7.1 Bibliografía.....	45
7.2 Anexos.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Degradación biológica de lignina con la ayuda de enzimas ligninolíticas.....	22
Figura 2. Puntos de muestreo de hongos en la Reserva Sabia Esperanza.	24
Figura 3. Caracterización morfológica <i>Trametes hirsuta</i>	31
Figura 4. Caracterización morfológica de <i>Ganoderma sp.</i>	33
Figura 5. Desarrollo miceliar de <i>Trametes hirsuta</i> y <i>Ganoderma sp</i> en el sustrato.	34
Figura 6 Comparación entre bagazo y bagazo con medio enriquecido.....	36
Figura 7 Delignificación de bagazo de caña de azúcar.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Provincias con producción de caña de azúcar	19
Tabla 2 Rango de temperatura de degradación de polímeros vegetales.....	23
Tabla 3 Características cuerpo fructífero de <i>Ganoderma</i> y <i>Trametes</i>	27
Tabla 4 Composición de medio de enriquecimiento	29
Tabla 5 Variables en estudio	30
Tabla 6 Resumen del BLAST desarrollado en el NCBI.....	32
Tabla 7 Resumen de BLAST llevado a cabo en el NCBI	34
Tabla 8 Análisis dTGA de los polímeros por fermentación con <i>Trametes hirsuta</i>	35
Tabla 9 Análisis dTGA de los polímeros por fermentación con <i>Ganoderma sp</i>	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de capo de <i>Trametes</i>	56
Anexo 2. Ficha de campo <i>Ganoderma</i>	56
Anexo 3. Contenido promedio de hemicelulosa, celulosa y lignina en los factores y tratamientos en estudio	58
Anexo 4. ADEVA para las variables hemicelulosa, celulosa y lignina	58

RESUMEN

La producción de caña de azúcar en la provincia de Imbabura ha ido en auge en los últimos años. Según datos estadísticos llevados a cabo por el INEC en el año 2016, muestra a dicha provincia en el quinto lugar de producción de este cultivo a nivel nacional. Dicha producción deja una gran cantidad de bagazo de caña de azúcar, causando la emisión de contaminantes gaseosos. A pesar del potencial de este desecho, su explotación se ve limitada debido a la composición química que presenta. Se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo la última, el polímero más recalcitrante y difícil de degradar. Por otro lado, utilizando pretratamientos a la biomasa se pretende dar un valor agregado a los desechos agroindustriales. Utilizando pretratamiento biológico a través de hongos con capacidad ligninolítica se consigue degradar la capa de lignina y dejar expuesta la celulosa y hemicelulosa para usarla en fines bioenergéticos, productos químicos, farmacéutica, entre otros. Dentro de esta investigación, se realizó pretratamiento biológico al bagazo de caña de azúcar con *Trametes hirsuta* y *Ganoderma sp* recolectados en la Reserva Sabia Esperanza para medir la capacidad ligninolítica que estos poseen a través de análisis termogravimétricos.

PALABRAS CLAVE

Biomasa lignocelulósica, Hongos ligninolíticos, Pretratamiento, Termogravimetría, manejo de residuos.

ABSTRACT

In Imbabura province in recent years, sugar cane production has been booming. According to statistical data carried out by INEC in 2016, showings that province in fifth place of production nationwide. This production leaves a large amount of sugarcane bagasse, causing the emission of gaseous pollutants. Despite the potential of this waste, its exploitation is limited due to the chemical composition. It mainly consists of cellulose, hemicellulose and lignin, being the latter the most recalcitrant and difficult polymer to degrade. On the other hand, using biomass pretreatments is intended to give added value to agro-industrial waste. Using biological pretreatment through fungi with ligninolytic capacity, which manage to degrade the lignin layer and expose the cellulose and hemicellulose for uses in bioenergetic, chemical and pharmaceutical purposes, among others. Within this research, biological pretreatment was carried out on sugarcane bagasse with *Trametes hirsuta* and *Ganoderma sp* and the ligninolytic capacity they possess was measured through thermogravimetric analyzes.

KEYWORDS

Lignocellulose Biomass, Ligninolytic Fungus, Pretreatment, Thermogravimetry

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los hongos constituyen uno de los mayores grupos de seres vivos, siendo 80000 especies aproximadamente consideradas como especies crípticas (Cubas, 2007). La importancia ecológica de estos hongos se sostiene en su capacidad de degradar polímeros y biomoléculas estructurales de la materia orgánica, entre ellos celulosa y lignina, para convertirlas en productos de fácil asimilación para otros organismos, o en productos de desecho final como gases o materia orgánica (Leeuwenhoek, 2012).

Su papel como saprófitos primarios, los establece en la base de las cadenas tróficas de descomposición (Stamets, 1993). Para la degradación de polímeros lignocelulósicos, estos hongos producen complejos enzimáticos extra e intracelulares que incluyen enzimas de oxidación de celulosa, hemicelulosa, xilano y lignina (Yan, Chen, Niu, Chen, & Chagan, 2015).

Esta capacidad se puede utilizar para aprovechar los productos de desecho agrícolas, como el bagazo de caña de azúcar producido en la provincia de Imbabura (Chiriboga, 2012). En donde, aún no han sido utilizados estos desechos (Moreno, Pozo, & Nájera, 2017). Por otro lado, el aprovechamiento de residuos agroindustriales mediante pretratamiento biológico hace posible un uso más eficiente de los recursos disponibles para la obtención de productos de valor agregado y biocombustibles, debido a su alta disponibilidad y bajo precio (Cardona, Quintero, & Paz, 2010).

En la presente investigación, se aislaron organismos fúngicos con capacidad ligninolítica localizados en la Reserva Sabia Esperanza. Se realizó muestreo por conveniencia, recolectando cuerpos fructíferos para su replicación clonal en laboratorio con el fin de realizar fermentación sólida y así degradar la lignina presente en el bagazo de caña de azúcar.

1.2 Definición del problema

El desarrollo industrial ha mejorado la calidad de vida de las personas, sin embargo, la ha convertido en una sociedad dependiente de consumo que genera grandes cantidades de residuos agroindustriales (Cury , Aguas , Martinez , Olivero y Chams, 2017). Dentro de los remanentes de la producción agrícola se puede destacar a los rastrojos de campo y los residuos de procesamiento (Moreno et al., 2017). Ambos materiales contienen abundante material lignocelulósico que se desperdicia, sin embargo, podría ser aprovechado en diversas áreas (Vincenza, 2013)

Debido a su alta disponibilidad y bajo costo, los materiales lignocelulósicos son considerados como el futuro de las materias primas para el desarrollo de biocombustibles y otros productos de interés (Cardona et al., 2010). No obstante, la mayor parte de su volumen es desechado hacia el campo usándolo como abono o comida de ganado o a su vez, siendo aglomerado en el campo trayendo mosquitos o malos olores (Chiriboga, 2012; Moreno, Becerra, y Blanco, 2004).

El principal motivo de la subutilización de este residuo es la presencia de polímeros difíciles de degradar, entre ellos, se puede enumerar a la lignina (Hakeem, Jawaid, y Rashid, 2014). Para degradar este polímero, se necesita conocer los cambios fisicoquímicos que ocurre durante el pretratamiento y de esta manera optimizar estos procesos y costos (Amin et al., 2017). Por tal motivo, varios estudios se han enfocado en encontrar metodologías para la aceleración de la ruptura de estas moléculas (Kristensen, 2008).

Para ello, pretratamientos físicos, químicos y fisicoquímicos han sido estudiados pero traen a su vez desventajas por el alto costo de mantenimiento de las maquinarias, uso de productos adicionales, pérdida del sustrato, pueden llegar a ser inhibidores de enzimas debido al alto pH o temperatura con el que se trabaja (Teixeira et al., 2014). Entre estas metodologías, se destaca el pretratamiento biológico con la ayuda de microorganismos que facilitan su degradación, y en este caso, la utilización de hongos basidiomicetos de pudrición blanca que han presentado mejores resultados (Mosier et al., 2005).

Estos hongos sintetizan una gran variedad de enzimas que rompen la lignina en compuestos más solubles, siendo esta capacidad la causa de interés en el ámbito industrial (Morais, Forgács, y Cserhádi, 2005). La conversión biológica de biomasa celulósica a través de hongos de pudrición blanca ofrece altos rendimientos de productos a bajos costos (Yang, Dai, Ding, & Wyman, 2011). A través de hidrólisis enzimática convierte la biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables que se puede usar para realizar biocombustibles u otros productos químicos (Yan et al., 2015).

1.3 Justificación

En los últimos años, la obtención de bioetanol u otros productos químicos a través de materiales lignocelulósicos ha sido investigada con gran interés. No obstante, la producción a gran escala aún no es viable debido a la falta de estudios que consideren la integración de procesos, aumento de los rendimientos de fermentación e integración de operaciones unitarias para hacerla una tecnología más competitiva (Kim y Dale, 2004; Rivera, Sarita, Garcia, Filho, y Carvalho, 2010)

En este contexto, el sector agropecuario ecuatoriano, constituye una de las principales fuentes de sustento para la economía nacional generando soberanía y seguridad alimentaria (INIAP, 2012). Dentro de estos productos, la caña de azúcar constituyó en el año 2016 el 3.30% en el PIB nacional (CFN, 2017). Guayas presenta mayor cosecha de caña de azúcar con un 82.83% a nivel nacional (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2017). Imbabura se localiza en el quinto puesto con el 2.18%, donde se registra que sembró 2393 ha y cosechó 1797 ha mensuales, dando una producción anual de 255873 Tm (INEC, 2016).

A pesar de la ganancia económica que genera este cultivo, no se puede dejar de lado el impacto ambiental producido (Corrêa, Brugnari, Bracht, Peralta, y Ferreira, 2016). La escasa tecnología utilizada y no manipular de manera correcta los desechos producidos en las azucareras o en los pequeños cañicultores o debido al uso de procesos obsoletos para la fabricación del grano de azúcar, hace que no se utilice al máximo este producto al ser desechado en su mayor parte (Barroso, 2013).

Por este motivo, la presente investigación pretende utilizar las enzimas provenientes de hongos basidiomicetos de pudrición blanca endémicos de la provincia de Imbabura en Ecuador. Además, con ellas, realizar hidrólisis enzimática en bagazo de caña de azúcar con el fin de degradar la capa de lignina y obtener subproductos a través del tratamiento biológico.

1.4 Pregunta directriz

¿Con la aplicación de hongos ligninolíticos basidiomicetos de pudrición blanca encontrados en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza se puede realizar hidrólisis enzimática y degradar la lignina?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Analizar la capacidad ligninolítica de hongos basidiomicetos de pudrición blanca encontrados en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza.

1.5.2 Objetivos específicos

- Muestrear hongos basidiomicetos en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza
- Aislar cultivos puros de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca
- Caracterizar morfológica y molecularmente los hongos basidiomicetos de pudrición blanca
- Determinar la capacidad ligninolítica de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca en bagazo de caña de azúcar

1.5.3 Hipótesis

Los hongos basidiomicetos de pudrición blanca encontrados en la Reserva Sabia Esperanza son capaces de degradar biomasa lignocelulósica.

1.6 Marco legal

Principalmente los puntos que se toman para el desarrollo del marco legal del tema de tesis fueron receptados de la Constitución del Ecuador 2008 y al Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021, siendo los siguientes:

Dentro de la constitución

Título II: Derechos

Capítulo Segundo: Derechos del Buen Vivir

Sección primera: Agua y alimentación

Art. 13.- Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales.

Capítulo Segundo: Ambiente sano

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias.

Capítulo séptimo: Derechos de la naturaleza

Art. 71.- La naturaleza o Pacha Mama, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia y el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos.

Art 73. Se deberán aplicar medidas de precaución sobre actividades que causen deterioro en el ecosistema y alteraciones en los ciclos vitales.

Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales

Sección séptima: Biosfera, ecología urbana y energías alternativas

Art. 413.- El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

De acuerdo con el Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021:

Objetivo 3: Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones.

Promueve buenas prácticas ambientales que aporten a la disminución de la contaminación, la conservación, la mitigación y la adaptación a los efectos del cambio climático, e impulsar las mismas en el ámbito global.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Revisión de literatura

2.1.1 Biomasa agroresidual

La biomasa agroresidual es cualquier material utilizado en actividades agrícolas, pecuarias y forestales derivada de organismos biológicos (excluyendo los residuos fósiles), entre ellos se puede enumerar al maíz, paja, plantas, desechos animales, despojos y pastos perennes para ser usados directamente como combustibles o después de un proceso de conversión (Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011). También, se define como una fuente renovable de energía que se utiliza en diversas aplicaciones domésticas y comerciales, como calefacción directa, generación de electricidad y producción de biocombustibles (OECD, 2014).

2.1.2 Bagazo de caña de azúcar

El bagazo de caña de azúcar es un residuo que se origina de la elaboración de la azúcar constituyéndose un subproducto de esta producción (Cheavegatti et al., 2011). Se encuentra constituido por cuatro fracciones: fibra (45%), sólidos insolubles (2-3%), sólidos solubles (2-3%) y agua (50%) representando el mayor coproducto en tonelaje y mayor volumen en la producción industrial del azúcar de caña (Almazán & Rodríguez, 2016). Dentro del Ecuador, al bagazo de caña de azúcar se lo utiliza como abono y comida para vacas y cerdos (Elizalde, 2015).

2.1.2 Producción de caña de azúcar en el Ecuador

Saccharum officinarum es una gramínea que despierta un interés económico debido a la alta producción en la industria azucarera, además, en los últimos años la industria energética se ha visto interesada por este material, en especial con biocombustibles de segunda generación a partir de sus residuos (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Su estructura está conformada por celulosa (40.41%), hemicelulosa (27-38%) y lignina (10-20%) (Karimi, 2015). El cultivo se extiende a lo largo de diferentes provincias del Ecuador (Tabla 1).

Tabla 1

Provincias con producción de caña de azúcar

Provincia	Superficie (ha)		Producción anual (Tm)	Porcentaje
	Plantada	Cosechada		
Guayas	88,052	87,255	6961,050	80.38
Cañar	9,357	6,039	447,134	8.54
Loja	7,052	7,052	777,902	6.44
Los Ríos	2,551	2,529	201,782	2.33
Imbabura	2.393	1,797	255,873	2.18

Fuente: INEC, (2016)

2.1.3 Composición química del bagazo de caña de azúcar

2.1.3.1 Celulosa

Es el polisacárido más predominante que constituye aproximadamente 40-50% de la materia vegetal, siendo este degradado con la ayuda de celulasas transformándolas a glucosa para la producción de bioetanol (Bugg, Ahmad, Hardiman, & Rahmanpour, 2011). Tiene forma de fibrillas lineales de aproximadamente 30-40 cadenas unidas por hidrógeno de β -1,4 glucopiranosidos y se encuentra formando parte de los tejidos de sostén de la planta (Yang et al., 2011).

2.1.3.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero presente en la biomasa vegetal alrededor del 25 al 30% aproximadamente cuya función es la formación de la pared celular de las plantas (Pérez, Martínez, Muñoz, & Rubia, 2002). Exhiben una distribución mucho más amplia de azúcares en relación a la celulosa y son a menudo polisacáridos ramificados y esencialmente amorfos (Hakeem et al., 2014). Estos polisacáridos generalmente están asociados con la celulosa, a menudo con enlaces de hidrógeno y con ramificaciones compuestos por residuos β -D-hexosilo unidos por enlaces 1,4 (Yang et al., 2011).

2.1.3.4 Lignina

La lignina es un polímero aromático con una estructura heterogénea que viene siendo el segundo biopolímero más abundante en la tierra, presentándose en un 15 a 21% en plantas gramíneas (Mäkelä et al., 2016). No ha sido posible dar una definición estructural clara como a la celulosa y hemicelulosa, debido a la complejidad del aislamiento, el análisis de la composición y la caracterización natural (Chavéz y Domine, 2013). Se conoce que posee un elevado peso molecular debido a la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos que son encargados de dar rigidez protegiendo a la celulosa y hemicelulosa de degradarse (Geib et al., 2008).

2.1.4 Pretratamientos para delignificar biomasa agroresidual

2.1.4.1 Pretratamiento físico

El principal objetivo del pretratamiento físico es la reducción del tamaño de partículas del biopolímero mediante fragmentación, molienda, entre otras con la ayuda de interacciones mecánicas, radiación de microondas, sonicación secado por pulverización, radiación gamma o pirólisis (Kucharska, Rybarczyk, Hołowacz y Łukajtis, 2018).

2.1.4.2 Pretratamiento químico

El pretratamiento químico permite la desintegración de la lignocelulosa en compuestos simples debido a reacciones químicas en soluciones acuosas como los pretratamientos ácido y alcalino, oxidación, ozonólisis o la disolución en líquidos iónicos o solventes orgánicos obteniendo en menor tiempo un alto rendimiento de pentosas, aunque este tipo de tratamientos genera al mismo tiempo subproductos perjudiciales (ácidos, amonio, entre otras) (Sasmal y Mohanty, 2018). Por ejemplo, utilizando ácido sulfúrico o ácido clorhídrico se logra hidrolizar la celulosa pero estos solventes orgánicos afectan la salud humana y genera un alto impacto ambiental, por lo cual, es necesario neutralizar el pH (Jönsson y Martín, 2016).

2.1.4.3 Pretratamiento biológico

El pretratamiento biológico involucra utilizar microorganismos como hongos de pudrición marrón para degradar lignina, hemicelulosa y poca cantidad de celulosa u hongo de pudrición blanca que son eficientes para degradar solo lignina con la ayuda de enzimas peroxidasas y lacasas (Dahiya y Goyal, 2018). Es efectivo, económico, amigable con el ambiente, no es nocivo para la salud humana a comparación de los tratamientos químicos o fisicoquímicos pero requiere un frecuente control ya que el proceso es lento (Madadi, Yuanyuan, y Abbas, 2017).

2.1.5 Hongos Lignocelulósicos

Lo hongos basidiomicetos de pudrición blanca son eficientes para degradar lignina y probablemente son la mejor opción a nivel industrial donde se requiera delignificación de sustratos lignocelulósicos (Asgher, Ahmad, Muhammad, & Iqbal, 2013). Algunos viven como saprófitos (Manoharachary et al., 2005) siendo importantes, ya que son capaces de degradar o descomponer la materia inorgánica, convirtiéndola en gases o sales minerales que serán emanadas al medio (Leeuwenhoek, 2012). Con la ayuda de enzimas como lacasa, lignino peroxidasas y manganeso peroxidasas, estas setas juegan un papel importante para la degradación de lignina (Kavanagh, 2011).

2.1.5.1 *Ganoderma sp*

Pertenece al orden de los Polyporales siendo un hongo de podredumbre blanca cuyo cuerpo fructífero es semejante a la madera que causa biodelignificación en maderas duras de árboles vivos o muertos (Teixeira et al., 2008) . Un rasgo distintivo es que su espora surge con doble pared, con una capa interna de color oscuro que lleva un ornato que perfora la capa exterior hialina, de esta manera, la espora parece tener una superficie espinosa (Webster & Weber, 2007).

2.1.5.2 *Trametes hirsuta*

Es un hongo de pudrición blanca del orden de los Polyporales causante de la descomposición de la madera, posee la apariencia de orejas con un himenio blanco (Rodri, 2006). Es un eficiente degradante de lignina por producir un alto nivel de enzimas lacasa

y peroxidasa en diversos medios, especialmente cuando se suministra con inductores específicos, sustancias fenólicas o materiales de lignocelulosa (Vasina, Pavlov, y Koroleva, 2016). No existen reportes de tratamiento biológico en caña de azúcar desarrollado por esta especie.

2.1.7 Proceso biológico de la delignificación

En la naturaleza, la degradación de materiales lignocelulósicos es realizada por la acción de diferentes enzimas específicas (Karimi, 2015). La lignina al ser un sistema complejo recalcitrante es muy difícil de degradar por tal motivo, los hongos basidiomicetos secretan enzimas extracelulares a través de sus micelios con el fin de penetrar estos polímeros y así degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina, (Figura 1 Degradación biológica de lignina con la ayuda de enzimas ligninolíticas (Chen, 2014). Últimamente, se han realizado muchos estudios sobre el mecanismo de descomposición catalítica del sistema enzimático que degrada la lignina, encontrando enzimas peroxidadas extracelulares como las lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y la enzima fenol oxidasa extracelular, como lacasa (Ruel y Ambert, 1994).

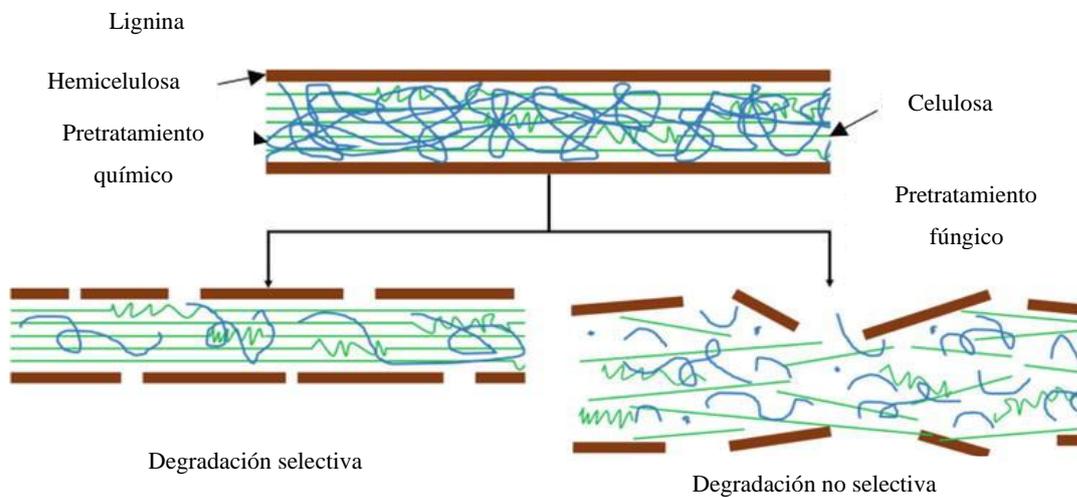


Figura 1 Degradación biológica de lignina con la ayuda de enzimas ligninolíticas

Fuente: Najiah, Nur, & Azlan, (2019)

2.1.8 Cuantificación de lignina

2.1.8.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA es una técnica utilizada para estudiar las reacciones de descomposición de la muestra en la determinación de las características de la devolatilización y los parámetros cinéticos (Antolín y Deny, 2015), tales como la energía de activación y el factor pre-exponencial, así como la influencia de la temperatura y velocidad de calentamiento en el desarrollo de las reacciones de descomposición térmica y los mecanismos de reacción (Cutiño y Medina, 2011). La materia a analizar disminuye conforme pasa el tiempo que oscila desde los 0 a 120 min y la temperatura varía desde la temperatura ambiente hasta los 750°C mientras se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica (Granados, 2015).

Los datos obtenidos en el análisis termogravimétrico describen curvas denominadas termogramas que representan el porcentaje de cenizas, humedad, volátiles (polímeros) y carbón fijo (Carrier et al., 2010). A su vez, se obtiene la derivada del termograma (dTGA) revelando picos que aparecen sobre las curvas, basado en ello, se conoce el porcentaje de degradación de un polímero en particular en dependencia a la temperatura a la cual este se descompone (Tabla 2) (Melgar, Borge, & Pérez, 2008).

Tabla 2

Rango de temperatura de degradación de polímeros vegetales

Rango de temperatura	Pérdida de compuestos
< 100°C	Disminución de humedad
100-250°C	Fase inicial de descomposición
250-350°C	Degradación hemicelulosa
350-500°C	Degradación celulosa y parte de lignina
> 500°C	Degradación lignina

Fuente: Manals y Penedo, (2011)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área de estudio

La presente investigación se ejecutó en dos partes, una fase de bioprospección y una fase experimental. La bioprospección se llevó a cabo en la Reserva Privada Sabia Esperanza localizada en el cantón Pimampiro, parroquia San Francisco de Sigsipamba, comunidad la Floresta, comprendida por un área de 1 507,22 ha con un rango altitudinal entre los 2600 y 3600 msnm (Figura 2. *Puntos de muestreo de hongos en la Reserva Sabia Esperanza.*) (Vallejos, 2017). La reserva fue seleccionada debido a que es un área donde no se han realizado estudios ecológicos o de biodiversidad y posee condiciones climáticas pertinentes para el crecimiento de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca (Sánchez, 2017). Todo ello se llevó a cabo con el permiso del Ministerio del Ambiente No. 0017-2018-ICA-FAU-FLO-DEPAI/MAE.

La fase experimental se realizó en el campus Hospital San Vicente de Paúl de la Universidad Técnica del Norte en los laboratorios de Biotecnología aplicada y Biotecnología Vegetal, ubicado en la Parroquia San Francisco, cantón Ibarra, Provincia de Imbabura, Ecuador (Latitud: 0.3469 y Longitud: -78.1142).

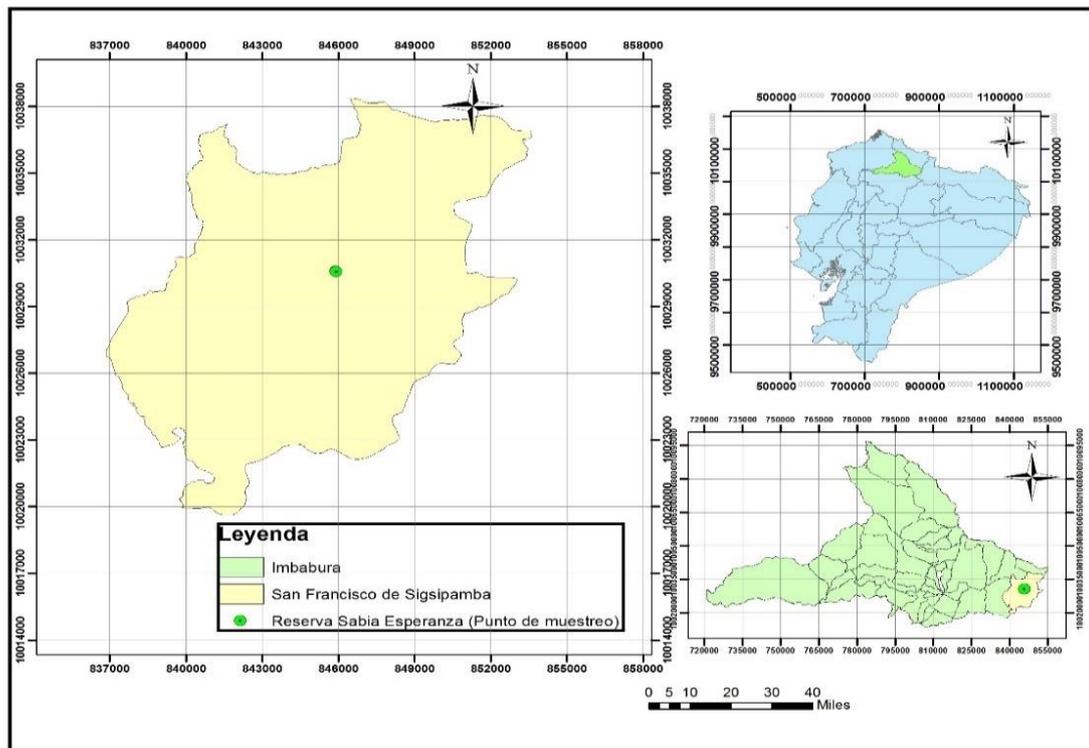


Figura 2. Puntos de muestreo de hongos en la Reserva Sabia Esperanza.

3.2 Obtención de material biológico

3.2.1 Recolección de muestras fúngicas

El muestreo se llevó a cabo en el mes de abril de 2019 y se lo realizó por conveniencia debido a que el 70% del área de la reserva es de difícil acceso. El punto de muestreo del primer cuerpo fructífero fue latitud: 0.2762 y longitud: -77.89276 y del segundo latitud: 0.2763 y longitud: -77.89277. La temperatura ambiental registrada fue de 11.6 °C con una humedad de 70% y una altitud de 3028 msnm.

Se cortaron los cuerpos fructíferos procurando mantener su estructura intacta. Se desinfectó con etanol al 70% y se trasladó al laboratorio en recipientes plásticos de 500 ml cerrados herméticamente para evitar su posible degradación (Furci y Nascimiento, 2007).

Posteriormente, se tomó el cuerpo fructífero y se fotografió su basidiocarpo e himenio. Luego, se recolectaron los datos más relevantes de cada especie fúngica en una ficha técnica (Anexo 1 y 2). Los cuerpos fructíferos fueron llevados al laboratorio a temperatura ambiente para su procesamiento y posterior aislamiento.

3.3 Obtención de cepas puras de hongos basidiomicetos

3.3.1 Siembra del cuerpo fructífero en medio de cultivo PDA

Los cuerpos fructíferos fueron propagados dentro de la cámara de flujo laminar (TermoScientific®, 1323) previamente limpia y esterilizada. Se desinfectó el cuerpo fructífero con una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 10 segundos (Siddiquee, Yusuf, Ain, y Mohd, 2010).

Luego, se cortó un segmento del cuerpo fructífero aproximadamente de 1 cm² en la parte del himenio con un bisturí estéril. A continuación, fue sumergido en etanol al 96%, se flameó para ser colocado en una caja de Petri de dimensión 100x15 mm con medio de cultivo PDA (*Neogen® Culture Media*) (Salazar, 2014).

3.3.2 Aislamiento y conservación

Para obtener un cultivo puro, se realizó dos resiembras en cajas de Petri con medio PDA con el fin de aislar los hongos. Fue necesario realizar microscopia para observar estructuras características de Basidiomicetos tiñendo las hifas con azul de metileno (Mueller, Bills, & Foster, 2004). A continuación, se sembró en el medio de cultivo dentro de una cámara de flujo laminar con la ayuda de capilares. Luego se incubó a temperatura ambiente.

Para evitar la pérdida de las cepas aisladas, se las conservó en glicerol al 10 % a -20°C por un periodo de seis meses. Esto se realizó agregando 25 ml de medio de cultivo PDA en un tubo cónico de 50 ml y se lo dejó solidificar inclinado. Ya solidificado, se cortó un segmento de aproximadamente 1 cm² de la cepa pura y se sembró en el tubo cónico. Se esperó por una semana, se añadieron 20 ml de glicerol al 10 % y se guardó en congelación a -20°C (Mueller et al., 2004).

También, las cepas fueron conservadas en una matriz compuesta de maíz, yeso y agua destilada. Primero, se cocieron 20 g de maíz por 20 min para suavizar el grano. Luego se añadieron 6 g de yeso y 15 ml de agua destilada, para posteriormente esterilizar la matriz por 15 minutos a 121°C. Una vez frío, se agregó la mezcla en la cepa pura que se desea conservar. Con esta técnica se puede conservar el micelio del hongo hasta seis meses en congelación -4 °C (Salazar, 2014).

3.4 Caracterización morfológica y molecular de hongos

3.4.1 Caracterización a partir del cuerpo fructífero

En la Tabla 3 se puede observar las principales características morfológicas y de sustrato de crecimiento de hongos del género *Ganoderma* y *Trametes*, el cual se usó para la caracterización morfológica de los cuerpos fúngicos recolectados en el muestreo.

Tabla 3

Características cuerpo fructífero de los géneros Ganoderma y Trametes.

Estructura	Características		Gráfico
	<i>Ganoderma</i>	<i>Trametes</i>	
Cuerpo fructífero	Solitario Aplanado de aproximadamente 30 cm	En grupo Delgado, convexo de aproximadamente 16 cm	
Basidiocarpo	No lacado	No lacado	
Himenio	Blanca y carnosos. Si se lastima la parte de las basidiosporas su color se vuelve café y es irreversible	Blanco y rugoso	
Estipe	No presenta	No presenta	
Apariencia	Similar a madera	Similar a madera	
Hábitat	Madera en Descomposición	Madera en descomposición	

Fuente: Binder et al., (2013); Salazar, (2014); Schmidt, (2006); Webster & Weber, (2007)

3.4.2 Microscopia óptica de hongos

Con la parte adherente de una cinta, se procedió a impregnar una parte del micelio sobre esta superficie para colocarlo sobre un portaobjetos. Posteriormente fueron teñidas con azul de metileno y observadas al microscopio óptico (LEICA, DM300) con aumento de 40x y 100x. Se identificaron estructuras características como: basidiosporas, basidio, hifas (esqueléticas, conjuntivas o germinativas), fíbulas, entre otras (Menéndez, 2016).

3.4.3 Caracterización molecular de hongos

Para la caracterización molecular, se envió las cepas puras al laboratorio IDGEN en cajas de Petri con cinco días de crecimiento. De acuerdo con el laboratorio mencionado, la extracción de ADN se realizó tomando 100 mg aproximadamente de micelio. Luego, se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad e integridad del ADN. Posteriormente, se diluyó hasta obtener una concentración de aproximadamente 20 ng/uL

para la amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers universales ITS1/ITS4 (Webster & Weber, 2007).

A continuación, los productos de PCR fueron secuenciados por el método SANGER. Se obtuvo los cromatogramas para procesar las secuencias por medio del programa MEGA versión X obteniendo secuencias consenso (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, y Tamura 2018). Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento con el algoritmo BLAST usando la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI y comparando las secuencias obtenidas con las ya reportadas (Kavanagh, 2011).

3.5 Descomposición biológica de bagazo de caña de azúcar

3.5.1 Preparación del sustrato de bagazo de caña

El bagazo de caña de azúcar fue proporcionado por la empresa IANCEM y pertenece a la variedad Puerto Rico 980 donde previamente fue triturado en un tamaño de partícula entre 2 a 4 cm en dicha empresa. Todo este material se lavó con agua a 70 °C para eliminar azúcares. Después de secar al sol durante 6 horas, el sustrato se guardó en un recipiente plástico de 20 litros (Huicochea, 2014). Antes de realizar la inoculación con los hongos, se pesó 40 g de bagazo en fundas polifan sellando con una cinta en su parte superior y se llevó el sustrato a esterilización por calor húmedo y presión a 121°C en un autoclave (ALL AMERICAN, modelo 25x) por 2 horas (Cotter, 2014).

3.5.2. Inoculación y desarrollo miceliar

Para facilitar el crecimiento del micelio, el bagazo fue enriquecido con el medio descrito en la Tabla 4 y esta mezcla se autoclavó (TUTTNAUER, 3870 ML) durante 15 minutos a 121°C. Pasado este tiempo, se dejó en reposo el medio hasta alcanzar temperatura ambiente (Elisashvili & Kachlishvili, 2008; Pandey y Singh, 2009). Posteriormente, se añadieron 120 ml de medio de enriquecimiento juntamente con 8g de micelio previamente aislado en cada funda, disponiéndolo de forma vertical y con incubación a 27 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$), por seis semanas, evitando la exposición a la luz solar. No se controló valores de pH y humedad.

Tabla 4

Composición de medio de enriquecimiento.

Reactivo	Cantidad (g)
NH₄NO₃	0.720
KH₂PO₄	0.576
NaH₂PO₄*H₂O	0.144
MgSO₄*7H₂O	0.360
Extracto de levadura	2.880

* Estos valores fueron disueltos en 720 ml de agua destilada.

*Marca HIMEDIA

Fuente: Elisashvili y Kachlishvili, (2008)

3.6 Cuantificación de polímeros vegetales por termogravimetría

3.6.1 Preparación del sustrato

Para cada uno de los tratamientos, se tomaron 30 gramos de muestra y se procedió a secarlas en una estufa de marca MEMMERT para eliminar el exceso de humedad a una temperatura de 105°C por 2 horas. Después, se pulverizó la muestra a un tamaño de partícula de 0.05 mm en una trituradora de biomasa (FRITSCH, 55743) (Ramírez, 2019). Se sellaron las muestras, se etiquetaron y fueron enviadas al Laboratorio de Química de la Universidad Central del Ecuador. con el fin de desarrollar pruebas termogravimétricas (TGA) y térmico diferencial (dTGA) de las mismas.

3.6.2 Análisis termogravimétrico

Dentro del análisis termogravimétrico, se realizó pruebas termogravimétricas y térmico diferencial en los tratamientos de bagazo (BC), bagazo más nutrientes (BENRIQ), bagazo más nutrientes más hongo sin colonización del micelio (Gano PRE y TH PRE) y bagazo más nutrientes y hongo ya colonizado por el micelio (Gano POST Y TH POST).

En el laboratorio mencionado en el apartado anterior, se realizó las pruebas TGA. Las muestras fueron llevadas a pirólisis de 0 a 700°C alrededor de dos horas en un analizador de TGA (METTLER TOLEDO). Finalizada la prueba y recopilados los datos, estos se analizaron en el software OriginPro versión 2020 con el fin de cuantificar el área bajo la curva de los picos formados por la curva dTGA. De esta manera, se obtuvo los porcentajes de los polímeros hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en los diferentes tratamientos (Maldonado, 2019).

3.7 Análisis estadístico de datos

Para conocer que tratamiento fue más efectivo en el porcentaje de degradación de hemicelulosa, celulosa, y lignina, se estableció un experimento con dos factores en estudio y dos factores adicionales. El factor a fue fermentación con dos niveles (**a1**=sin tratamiento y **a2**= con tratamiento). El factor b consistió en el tipo del hongo lignocelulósico con dos niveles (**b1**= *Trametes hirsuta* y **b2**=*Ganoderma sp*). Los tratamientos adicionales consistieron en **c1**= Bagazo o testigo absoluto y **c2**= bagazo enriquecido (testigo enriquecido). Este diseño generó un total de 6 tratamientos, a los cuales se realizaron 3 repeticiones (Tabla 5).

Para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, estos se sometieron a un análisis de la varianza (ADEVA) considerando como significativos los valores que presenten un $p < 0,05$. Se realizó la prueba de Tukey al 5%. Para este análisis, se utilizó el programa INFOSTAT versión 2015.

Tabla 5

Variables en estudio

Tratamiento	Fermentación	Hongo	Código	Descripción
Bagazo con medio enriquecido	Sin tratamiento	<i>Trametes hirsuta</i>	PRE TH	Bagazo con medio enriquecido sin fermentar + <i>Trametes hirsuta</i>
	Sin tratamiento	<i>Ganoderma sp</i>	PRE GANO	Bagazo con medio enriquecido sin fermentar + <i>Ganoderma sp</i>
	Con tratamiento	<i>Trametes hirsuta</i>	POST TH	Bagazo con medio enriquecido + <i>Trametes hirsuta</i> fermentando el sustrato
	Con tratamiento	<i>Ganoderma sp</i>	POST GANO	Bagazo con medio enriquecido + <i>Ganoderma sp</i> fermentando el sustrato
Bagazo			BC	Sólo Bagazo
Bagazo con medio enriquecido			BENRIQ	Bagazo más nutrientes (Tabla 4)

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 Aislamiento e identificación morfológica y molecular de los hongos de estudio

La fase de muestreo nos permitió obtener cuatro cuerpos fructíferos de los cuales dos fueron aislados de manera *in vitro* y se clasificó en dependencia de su morfología (Figura 3)

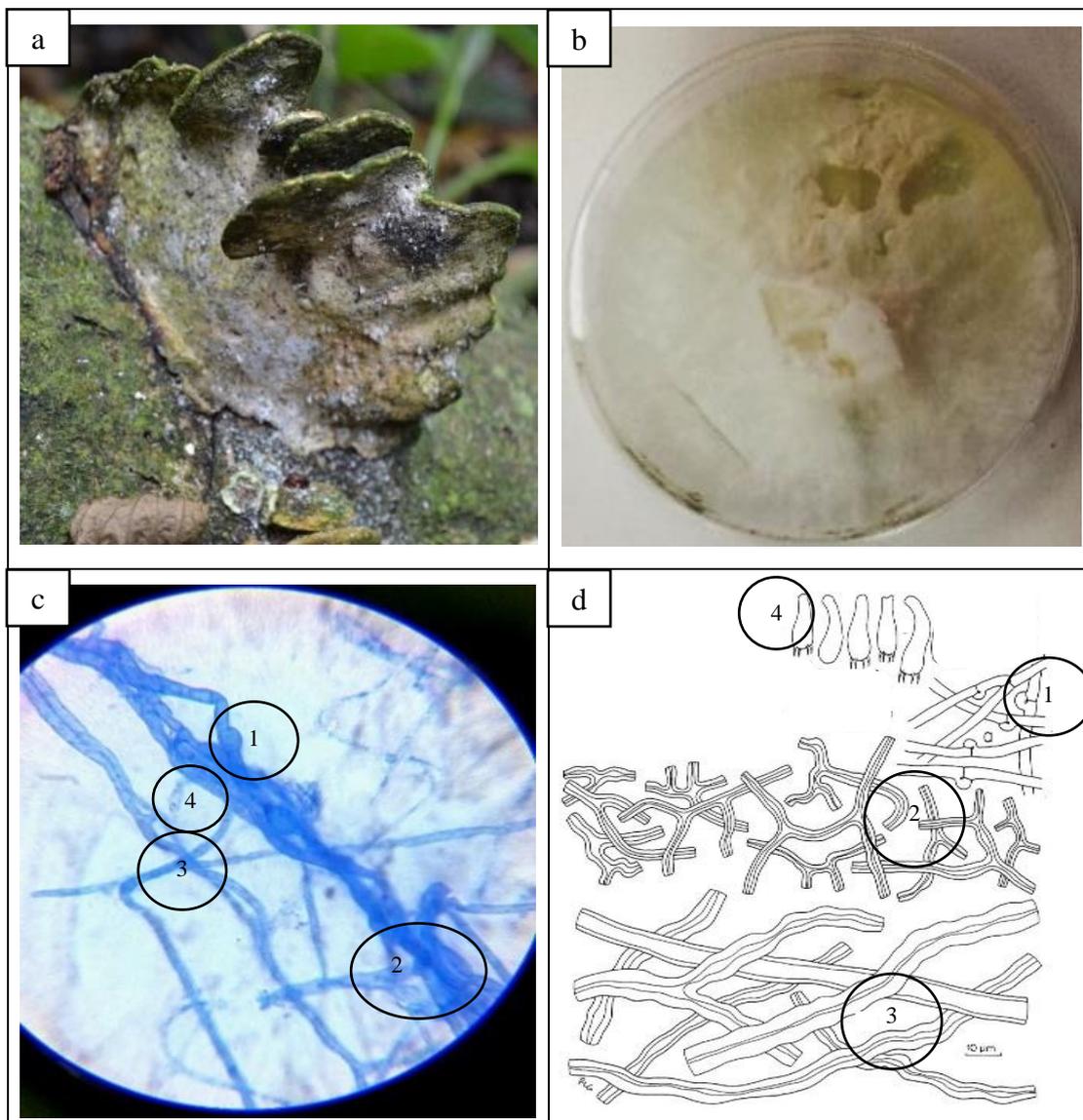


Figura 3. Caracterización morfológica *Trametes hirsuta*. a) Cuerpo fructífero, b) Micelio, c) Micelio visto al microscopio 100x y d) Imagen de micelio recuperada de Ryvarden y Gilbertson, (1993). Dentro de las figuras c y d se encuentran: 1, hifas generativas; 2, hifas de unión; 3, hifas esqueléticas; 4, basidios.

El primer microorganismo aislado se describe en la Figura 3, donde se visualiza la morfología característica correspondiente a *Trametes hirsuta*. En a y b se aprecia un cuerpo fructífero con una forma de abanico de un color blanquecino en las basidiosporas. Además, se aprecia un micelio blanco que conforme pasa el tiempo se torna su aspecto más algodonoso. Dentro de la figura 3 en el apartado c, se observan hifas alargadas, ramificadas y gruesas sin fíbulas que dan consistencia al hongo, se las conoce como hifas esqueléticas. Además, se aprecia hifas generativas con basidiosporas en las terminaciones que son las productoras de esporas semejantes a la figura 4 reportada por (Ryvarden y Gilbertson, 1993). Asimismo, se visualiza la presencia de basidios que son las encargadas de la reproducción asexual de estos hongos (Kavanagh, 2011; Mueller et al., 2004 y Watanabe, 2010).

También, dentro del análisis molecular con la ayuda del algoritmo bioinformático BLAST se demostró que la secuencia amplificada pertenece a la especie *Trametes hirsuta* con un 100% de identidad, como lo describe la Tabla 6.

Tabla 6

Resumen del BLAST desarrollado en el NCBI

Organismo	Fragmento	Longitud (bp)	Identidad (%)	Acceso NCBI
<i>Trametes hirsuta</i>	ITS1/ITS4	596	100	MN856345.1

Fuente: IDGEN 2019

Por otra parte, en la caracterización morfológica de *Ganoderma sp*, en la Figura 4 en el cuadro a, se observa un cuerpo fructífero semejante a la madera en forma de oreja con un himenio blanco que si se lastima cambia su color a café y esto es irreversible. Además, en el cuadro b, se observa la forma del micelio en la caja de Petri siendo este, de color blanco y recalcitrante, que cuando envejece torna su color a amarillo.

Adicionalmente, en la Figura 4 en el cuadros c, se observa hifas conectivas siendo estas retorcidas y ramificadas, ensamblándose entre ellas, con el fin de dar una consistencia leñosa al carpóforo (Cotter, 2014; Schmidt, 2006). Se apreció hifas alargadas de paredes

gruesas con ápices dendríticos ramificados, se las conoce como hifas esqueléticas. Por otro lado, se tiene la presencia de una fíbula que es propia de este tipo de hongos. Además, se visualiza la presencia de hifas generativas con la presencia de basidiosporas que darán origen a un nuevo cuerpo fructífero (López, Gutiérrez, Hernández, Valenzuela, y Esqueda, 2016; Salazar, 2014).

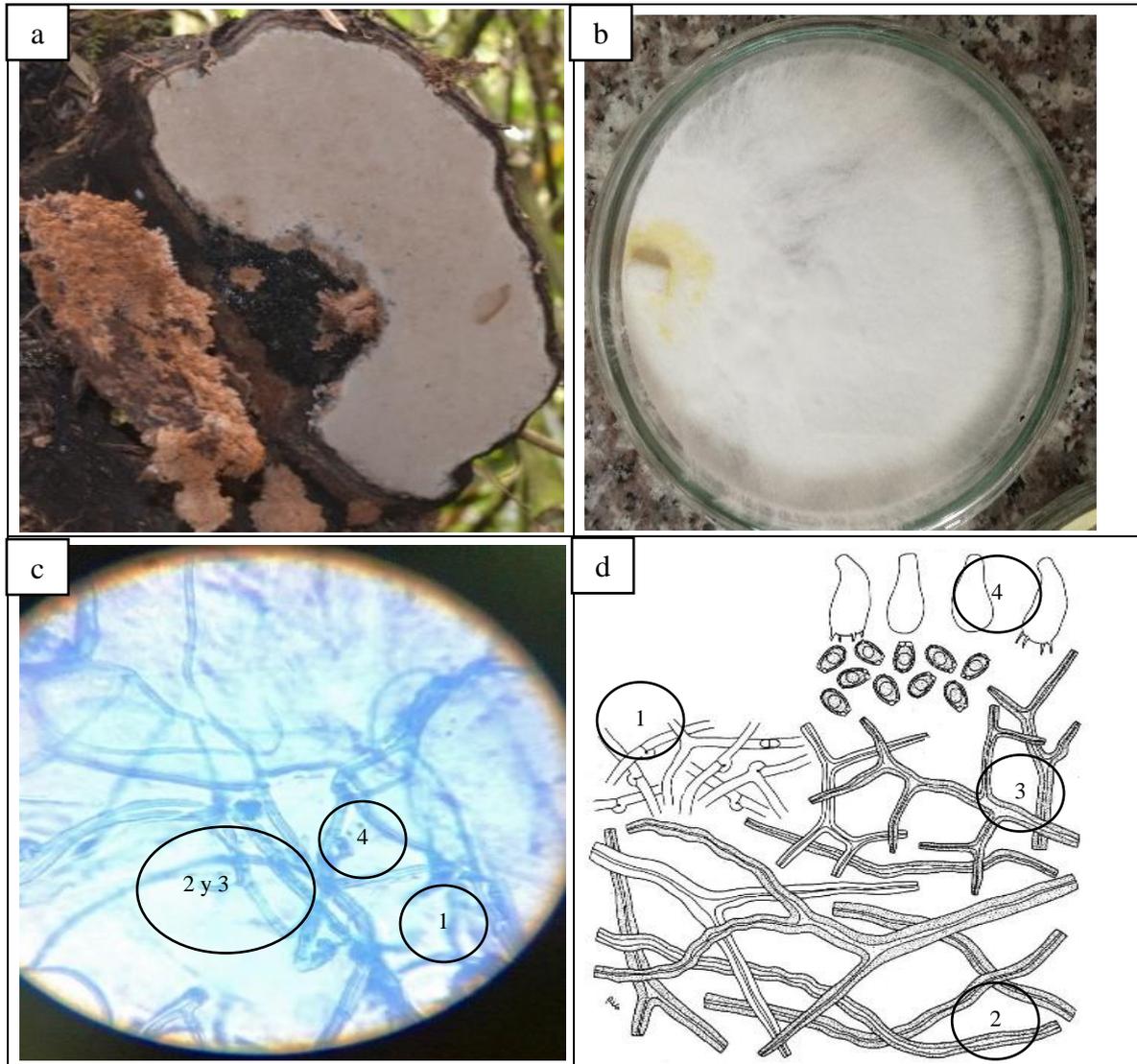


Figura 4. Caracterización morfológica de *Ganoderma* sp. a) Cuerpo fructífero, b) Micelio, c) Micelio visto al microscopio 100x y d) Imagen de micelio recuperada de Ryvar den y Gilbertson, (1993). Dentro de las figuras C y D se encuentran: 1, hifas generativas; 2, hifas esqueléticas, algunas con ápices dendríticos ramificados; 3, hifas de unión; 4, basidios.

Igualmente, que para *Trametes hirsuta*, el análisis bioinformático demostró que la secuencia amplificada pertenece a la especie *Ganoderma australe* con un 96.8% de

identidad (Tabla 7). Dado a que el porcentaje de identidad es bajo, no se puede asegurar que pertenezca a dicha especie, pero sí que es perteneciente al género *Ganoderma sp.*

Tabla 7

Resumen de BLAST llevado a cabo en el NCBI

Organismo	Fragmento	Longitud (bp)	Identidad (%)	Acceso NCBI
<i>Ganoderma australe</i>	ITS1/ITS4	555	96.8	KU569541.1

Fuente: IDGEN, (2019)

4.3 Crecimiento miceliar

La colonización total del micelio se presentó en diferentes tiempos en los dos hongos. En el caso de *Trametes hirsuta*, el sustrato fue colonizado en cuatro semanas, presentando exudados de color amarillento al cabo de la tercera semana. Por otro lado, *Ganoderma sp* tuvo complicaciones en su crecimiento, logrando colonizar parcialmente al sustrato en un periodo de seis semanas, presentando exudados a la quinta semana. Estos datos se recabaron mediante inspección visual mientras duró el experimento por tal motivo no se realizó un diseño estadístico (Figura 5)



Figura 5. Desarrollo miceliar de *Trametes hirsuta* y *Ganoderma sp* en el sustrato.

4.4 Cuantificación de polímeros por termogravimetría

El análisis termogravimétrico realizado en cada muestra demostró que existieron diferencias en el contenido de polímeros en todos los tratamientos Tabla 8.

Tabla 8

Análisis dTGA de los polímeros por fermentación con Trametes hirsuta

<i>Trametes hirsuta</i>				
Polímeros	BC (%)	BENRIQ (%)	PRE TH (%)	POST TH (%)
Hemicelulosa	41	42	47	50
Celulosa	39	33	35	38
Lignina	20	25	19	12*

* Porcentaje (peso/peso) de reducción de lignina.

Las *Tabla 8* y *Tabla 9*, ilustran los promedios de las tres repeticiones que se realizaron. En ellas, se aprecia el porcentaje de pérdida de lignina al que llegaron los dos hongos.

Tabla 9

Análisis dTGA de los polímeros por fermentación con Ganoderma sp.

<i>Ganoderma sp</i>				
Polímeros	BC (%)	BENRIQ (%)	PRE GANO (%)	POST GANO (%)
Hemicelulosa	41	42	48	47
Celulosa	39	33	36	41
Lignina	20	25	16	12*

* Porcentaje (peso/peso) de reducción de lignina.

4.5 Análisis de degradación de polímeros en caña de azúcar

4.5.1 Diferencias entre bagazo y bagazo con medio enriquecido.

El análisis de la varianza con dos adicionales reportó diferencias estadísticamente significativas en la presencia de lignina entre bagazo (BC) y bagazo con medio enriquecido (BENRIQ) ($F=5,88$; $p=0,03$; $gl=1$) (Figura 6). En la cual bagazo enriquecido tuvo un incremento en la cantidad de lignina con respecto a bagazo normal.

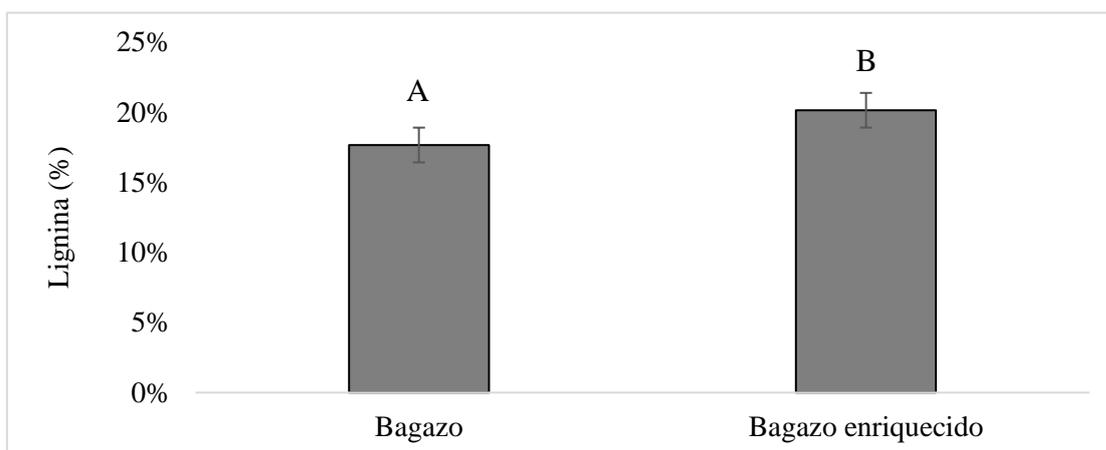


Figura 6. Comparación entre bagazo y bagazo con medio enriquecido. A) bagazo y B) bagazo con medio enriquecido. Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey 5%; $p < 0,05$). Barras de error verticales representan desviación estándar.

4.5.2 Contenido de lignina

Por otro lado, también se constató que existe diferencias estadísticamente significativas con respecto a la reducción de lignina al ocurrir el tratamiento biológico por parte de los dos hongos ($F=5,88$; $p=0,03$; $gl=1$). Con este resultado, se constató que hubo reducción de este polímero en el bagazo de caña de azúcar (Figura 7). No obstante, no se reportaron diferencias significativas para conocer cuál hongo es el mejor degradador de lignina ($F=0,02$; $gl=5$; $p=0,98$).

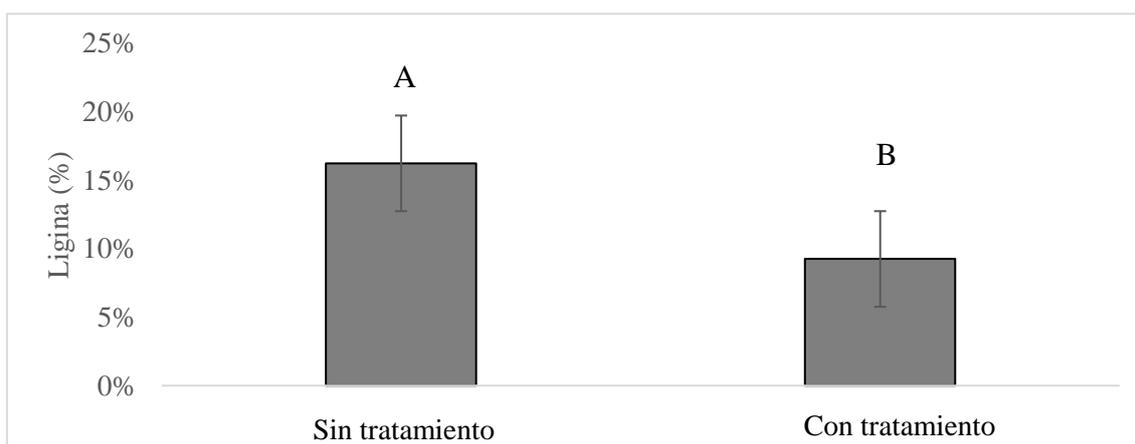


Figura 7. Delignificación de bagazo de caña de azúcar. A) Bagazo sin tratamiento por los dos hongos y B) bagazo con tratamiento por los dos hongos. Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey 5%; $p < 0,05$). Barras de error verticales representan desviación estándar.

4.5.3 Contenido de celulosa y hemicelulosa

El análisis de la varianza de la celulosa no reportó diferencia significativas en los factores hongos ($F=1$; $gl=1$; $p= 0,42$), tratamiento ($F=1$; $gl=5$; $p= 0,42$) y Bagazo tratado ($F=3$; $gl=1$; $p= 0,13$). También, se observa que hubo un incremento de este polímero de un 9,4% para *Trametes hirsuta* y 70,88% para *Ganoderma sp.* Por otro lado, para la variable hemicelulosa, no se reportó diferencias significativas para el factor hongos ($F=5$; $gl=1$; $p= 0,05$), tratamiento ($F=2$; $gl=5$; $p= 0,22$) y Bagazo tratado ($F=4$; $gl=1$; $p= 0,08$). En este caso se reportó un incremento del 16,48% tratado biológicamente con *Trametes hirsuta* pero disminuyó la cantidad de este polímero en un 23,25% con *Ganoderma sp.*

CAPÍTULO V DISCUSIÓN

La revisión de las características macroscópicas y microscópicas juegan un papel importante en la determinación taxonómica de los hongos. Para *Trametes hirsuta*, se observó que tenía un cuerpo fructífero de color gris oscuro y con vellosidades con una forma parecida a un abanico cuyo sustrato es madera en descomposición coincidiendo la morfología y hábitat con las reportadas por Asternatura, (2019); Schmidt, (2006). De igual manera, al microscopio se observaron hifas esqueléticas, conectivas y generativas con la presencia de basidiosporas y fíbulas en su micelio lo que coincide con las reportadas por Cotter, (2014) y Mueller et al., (2004). Con lo descrito anteriormente, se pudo conocer que el género al que pertenecen los hongos colectados.

De igual manera para *Ganoderma sp*, se observó que son organismos solitarios dentro de su hábitat. Posee un basidiocarpo brillante, laqueado de color café con un himenio blanco que al lastimarlo cambia su color a café oscuro, siendo esto irreversible coincidiendo con las reportadas en (Ryvarden y Gilbertson, 1993; Salazar, 2014; Webster & Weber, 2007; López, Gutiérrez, Hernández, Valenzuela, y Esqueda, 2016; Teixeira et al., 2008). Asimismo, MycoBank, (2019); Webster & Weber, (2007) y Watanabe, (2010) reportan que las características microscópicas de este hongo son similares a las del género *Trametes* ya que son pertenecientes al filo *Basidiomycota*.

La caracterización morfológica posee limitaciones ya que no se conoce con exactitud la especie del organismo fúngico (Das, Lee, y Jung, 2020). En el caso de hongos Polyporales, al tener características similares como apariencia de madera, forma semicircular, basidiosporas blancas y cantidad limitada de diferenciación de hifas hacen que exista confusión al momento de caracterizarlos de manera morfológica (Romanelli, Sutton, Thompson, Rinaldi, y Wickes, 2014). Por tal motivo, (Cotter, 2014; Moore, Robson, & Trinci, 2011) recomiendan realizar caracterización molecular ya que es una manera concisa de conocer la identidad del espécimen muestreado.

La caracterización molecular va a la par de la caracterización morfológica ya que permiten conocer la especie de hongo con sus principales características, permitiendo de esta manera, dar las condiciones ambientales para el crecimiento del mismo (Kavanagh,

2011). En estudios llevados a cabo por Badotti et al., (2017); Zhao, Xu, & Pfister, (2016) para realizar la caracterización molecular, se amplifica la secuencia ITS como marcador molecular fúngico, ya que permite amplificar la región 5.8s del rDNA que representa una huella genómica para cada hongo conservado en su interior. Esto lo corrobora Avin, Bhassu, Lumpur, Tan, & Sabaratnam, (2012) en su investigación, ya que para determinar la especie de hongos, utilizó ITS 1 e ITS 2 denominándola como una herramienta eficiente para la identificación de especies de Basidiomicetos.

Los marcadores moleculares utilizados en esta investigación fueron ITS 1 e ITS 4 y dieron como resultado en la electroforesis una amplificación a 600 bp en la corrida del gel (IDGEN, 2019). Esta información coincide con la reportada por Batallas, (2016); R. Zhao, Li, Sanchez-ramirez, & Stata, (2017) quienes utilizaron estos cebadores, logrando amplificar un fragmento de 600 bp y su secuencia fue homóloga a la división *Basidiomycota*. Analizando los resultados de porcentaje de similitud con las secuencias obtenidas después del alineamiento, se aprecia que *Ganoderma sp* cuenta con 96,8% de similitud con *Ganoderma australe*. Salazar, (2014); Suárez-medellín, Luna-rodríguez, Mendoza, & Salinas, (2008) explican que con un porcentaje de identidad inferior al 98% no se puede aseverar una especie de hongo luego del análisis bioinformático BLAST, por tal motivo, sugieren usar ITS1 e ITS2 para corroborar los datos expuestos en la secuenciación. Dentro de esta investigación no se utilizó el primer ITS 2 para corroborar resultados ya que las muestras fueron enviadas a realizar a un laboratorio privado quienes ya tenían su protocolo establecido.

Conociendo las especies de los hongos, se consideró las condiciones ambientales y nutricionales que necesitan para su crecimiento. Durante el desarrollo miceliar, *Trametes hirsuta* colonizó el bagazo de caña de azúcar. El medio de enriquecimiento usado pudo permitir al hongo acomodarse a las condiciones ambientales a la cual fue sometido (Vrsanska y Palovcikova, 2015; Yan et al., 2015). Dentro de este estudio, se utilizó diferentes sales, extracto de levadura como fuente de nitrógeno utilizando como fuente de carbono el bagazo de caña de azúcar. En estudios llevado a cabo por Carrasco, Zied, Pardo, Preston, & Giménez, (2018) especifican que en especies de *Pleurotus* y *Lentinula* es necesario adicionar fuentes de nitrógeno al sustrato para mejorar el rendimiento y

calidad de estos hongos. Lograron incrementar el crecimiento de estos hongos entre un 25% a 40% en comparación de los que no fue enriquecido el sustrato.

Por otro lado, el micelio de *Ganoderma sp* colonizó un tercio del sustrato. Posiblemente fue por el envejecimiento de la cepa, ya que, su micelio presentaba un color amarillento como lo reportado por Du, Dong, Wang, y Yao, (2019); Salazar, (2014) causado por las múltiples resiembras que se realizó. Otro factor a tomar en cuenta es que *Ganoderma sp* requieren sustratos superiores al 25% de lignina para su crecimiento. Madrignac y Flecha, (2019), reportan que utilizaron árboles del género *Quercus sp* en su estudio, siendo conocidos por presentar una alta concentración de dicho polímero. En su investigación evidenciaron una mejora del desarrollo miceliar a comparación de sustratos con una baja cantidad de este polímero. Ampliando lo descrito, (Carrasco et al., 2018) sugiere realizar una mezcla de aserrín de árboles del género antes mencionado con el desecho agroindustrial a usar en proporción 7:3 o 9:1, ya que, necesita una gran cantidad de lignina para su desarrollo.

La temperatura en el cuarto de crecimiento de los hongos fue entre 22°C a 27°C. Cabe recalcar que la humedad no fue controlada durante el crecimiento del micelio sobre el sustrato, lo que pudo haber influido al momento del desarrollo miceliar, originando la proliferación de contaminantes de origen fúngicos. En investigaciones llevadas a cabo por Mueller et al., (2004); Watanabe, (2010); Webster & Weber, (2007) argumentan que la temperatura es un factor crítico que compromete el crecimiento. Los mencionados autores reportan rangos óptimos comprendido entre 24 a 27 °C. Valores fuera de este rango son causantes de truncar el crecimiento del cuerpo fructífero del hongo debido al atrofiamiento de las basidiosporas, ya que a esta temperatura estimula su germinación (Pietika, 2005). Por otro lado, la humedad dentro de un rango entre 65-75% se la considera como un rango óptimo para el crecimiento del hongo, ya que un calor húmedo superior al descrito perjudicaría a las basidiosporas del hongo (Cotter, 2014; Ortiz, Alatorre, & Valvidia, 2011).

Luego del desarrollo miceliar, se conoció el grado de reducción de polímeros llevados a cabo en pruebas termogravimétricas, donde todos los tratamientos manifiestan un comportamiento similar a las temperaturas reportadas por (Manals y Penedo, 2011;

Torres y Guardiola, 2007). En primer lugar, la desnaturalización del sustrato fue entre los 200°C a 650°C, presentando el termograma con las curvas de hemicelulosa, celulosa y lignina dentro del programa Origin Pro2020. Para evitar errores de lectura Kasi, Norshahirah y Ramesh, (2018) mencionan que para obtener un termograma claro es importante que la mezcla se encuentre seca y la velocidad de calentamiento suba paulatinamente. Zuñiga, Salazar, y Ellen, (2016) argumentan que las pruebas TGA son una herramienta eficiente para conocer los cambios existentes en los polímeros al momento que ocurre el tratamiento biológico pero puede existir una interferencia en la lectura al estar una pieza mal ensamblada, aparición de una nueva sustancia o error en la lectura. En este estudio, al adicionar una sustancia al sustrato cambió las proporciones de los polímeros. En virtud de ello, el analista debe percatarse de ante mano las variables a presentarse para no cometer errores en la lectura. Por este motivo, Aydemir y Ayrylmis, (2018); Lalit, Mayank, y Ankur, (2018) recomiendan usar otro tipo de análisis ya sea térmico, microscopía infrarroja, reología o resonancia magnética nuclear para corroborar los datos obtenidos.

Posteriormente, el análisis estadístico del resultado del análisis TGA reflejó que los hongos estudiados son capaces de reducir el porcentaje de lignina presente en el bagazo de caña de azúcar. Se presume esto, ya que dichos hongos poseen enzimas lacasas y peroxidases que son capaces de hidrolizar enlaces específicos en dicha molécula (Otjen et al., 1987 y Ander y Eriksson, 1977). En estudios llevados a cabo por (Manavalan y Manavalan, 2012) en *Ganoderma lucidum*, consiguieron un 24% de reducción de lignina resultando similar a esta investigación que se consiguió degradar un 25% de lignina. Por otro lado, en *Trametes hirsuta* no se reporta estudios en degradación de lignina en bagazo de caña. Además, en este estudio no se reportaron evidencias significativas de degradación de bagazo de caña de azúcar entre los dos hongos por lo tanto los dos sirven para degradar lignina sin presenciar diferencias entre los dos.

También, se presentó un aumento del porcentaje de lignina al añadir el medio enriquecido. Elisashvili et al.,(2008) sugiere enriquecer el sustrato ya que se aporta nutrientes al sustrato consiguiendo mejores resultados, aunque esto genera errores de lectura en los resultados obtenidos. Para evitar interferencias en los resultados, Granados, (2015); Huicochea, (2014); Manals y Penedo, (2011) recomiendan utilizar en sustratos con

aditamento, un analizador de gas evolucionado ya que detecta diversos sucesos térmicos de pérdida de masa a partir de cambios físicos y químicos del sustrato. Sin embargo, necesitaríamos repetir el ensayo y corroborar resultados, ya que posiblemente las repeticiones no fueron las necesarias o las condiciones del crecimiento miceliar o la toma de muestra no fue homogénea. Por tal motivo, existiría errores de lectura al momento de realizar las pruebas termogravimétricas como las presenciadas en este estudio, que al añadir el medio enriquecido causó un incremento de los polímeros (Manals y Penedo, 2011).

En la celulosa se evidenció un incremento después del tratamiento biológico con los dos hongos. Molina & Espín, (2014) en su estudio mencionan que estos hongos abren la hemicelulosa para su degradación, por ende, hay un incremento de este polímero. Por otro lado, en *Trametes hirsuta* se evidenció un incremento de hemicelulosa. En estudios llevados a cabo por (Ayuso, Rencoret, Gutiérrez, Ruiz, y Martínez, 2019; Otjen y Blanchette, 1982) menciona que los hongos polyporales degradan la lignina dejando a la celulosa disponible para la fabricación de productos químicos de gran interés, como biocombustibles. Además, lo usan como reserva al momento de fructificar (Saito et al., 2018). En el caso de *Ganoderma sp*, se cree que como creció en una parte del sustrato logro consumir los dos polímeros o a su vez, este hongo los utiliza como fuente energética y nutricional como lo describe Masarin, Vicentim, y Pavan, (2008). Se deben realizar más pruebas para corroborar estos resultados.

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Bajo las técnicas de muestreo establecidas se logró aislar hongos Basidiomicetos de pudrición blanca procedentes de la Reserva Sabia Esperanza de los géneros *Trametes* y *Ganoderma*.

La caracterización morfológica permitió describir el género al que pertenecen los hongos Basidiomicetos procedentes de la Reserva Sabia Esperanza.

La caracterización molecular ayudó a conocer la especie de *Trametes hirsuta* utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 caso contrario con *Ganoderma sp.*

En la fase de crecimiento miceliar, *Trametes hirsuta* se desarrolló de mejor manera en bagazo de caña de azúcar colonizando el sustrato en su totalidad, caso contrario a la cepa de *Ganoderma sp* que creció en un tercio del sustrato.

Se presentaron inconvenientes al realizar las pruebas termogravimétricas ya que presenta un margen de error al utilizar sustratos con aditamentos.

El tratamiento biológico con *Trametes hirsuta* y *Ganoderma sp* permitieron reducir la cantidad de lignina que se encontraba en bagazo de caña de azúcar pero no se obtuvo con los resultados diferencias estadísticamente significativas que ayuden a corroborar cual hongo es tiene un mayor porcentaje de delignificación.

La hemicelulosa y celulosa presento un incremento después del tratamiento biológico llevado a cabo por *Trametes hirsuta*; por otro lado, *Ganoderma sp* degrado la celulosa pero no hemicelulosa que presentó un incremento en los resultados obtenidos.

6.2 Recomendaciones

Utilizar un antifúngico como orto fenilfenol al momento de aislar los hongos basidiomicetos *in vitro* ya que permite la inhibición de otros organismos fúngicos como ascomicetos.

Tomar en cuenta, las características macro y microscópicas al momento de realizar la caracterización morfológica ya que esto influye al momento de conocer el género del hongo.

Utilizar los primers ITS 1 y ITS 2 para corroborar la identidad de *Ganoderma sp.*

Medir parámetros como temperatura, pH y humedad ya que podrían repercutir en el crecimiento o rendimiento de los hongos si se encuentran fuera de los parámetros recomendados.

Utilizar una mezcla de aserrín con bagazo de caña de azúcar en proporciones 9:1 o 7:3 sin nutrientes añadidos.

Secar las muestras a 105 °C por dos horas antes de enviar las muestras con el fin de eliminar la humedad presente en la misma ya que podría interferir en los resultados enviados.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

7.1 Bibliografía

- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Almazán, O., & Rodríguez, N. F. (2016). El bagazo de la caña de azúcar . Propiedades , constitución y potencial.
- Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S., Zhang, R., Liu, G., & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>
- Ander, P., & Eriksson, K. (1977). Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi By.
- Antolín, G., & Deny, O. (2015). Caracterización de bagazo de caña de azúcar mediante análisis térmico, (December).
- Asgher, M., Ahmad, Z., Muhammad, H., & Iqbal, N. (2013). Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops & Products*, 44, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.005>
- Avin, F. A., Bhasu, S., Lumpur, K., Tan, Y. S., & Sabaratnam, V. (2012). Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species Molecular classification and phylogenetic relationships of selected edible Basidiomycetes species, (December 2013). <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1567-2>
- Aydemir, D., & Ayrimis, N. (2018). cellulose nanofibrils and nanoclays Preparation and characterization of biopolymer nanocomposites from cellulose nanofibrils and nanoclays, (December 2019). <https://doi.org/10.1177/0021998317713589>
- Ayuso, I., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Ruiz, F., & Martínez, Á. (2019). Peroxidase evolution in white-rot fungi follows wood lignin evolution in plants PC-LiPA, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905040116>

- Badotti, F., Oliveira, F. S. De, Garcia, C. F., Bruna, A., Vaz, M., Luize, P., ... Góes-neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>
- Barroso, L. A. (2013). Contaminación ambiental por quema de caña de azúcar: Un estudio exploratorio en la región central del estado de Veracruz.
- Batallas, R. (2016). *Caracterización morfológica y molecular de cuatro especies de macrohongos comestibles y medicinales en zonas de cultivo de la comunidad kichwa de Oglán – Pastaza, Ecuador*. Universidad de Guayaquil.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi, 28(12). <https://doi.org/10.1039/c1np00042j>
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Bioresource Technology Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>
- Carrasco, J., Zied, D. C., Pardo, J. E., Preston, G. M., & Giménez, A. P. (2018). Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality. *AMB Express*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0678-0>
- Carrier, M., Loppinet-serani, A., Denux, D., Lasnier, J., Ham-Pichavant, F., Cansell, F., & Aymonier, C. (2010). Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass & Bioenergy*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.067>
- CFN. (2017). *Cultivo de caña de azúcar: Elaboración y refinado de azúcar de caña y melaza de caña; remolacha azucarera, etc*. Quito.
- Chavéz, M., & Domine, M. (2013). LIGNINA , ESTRUCTURA Y APLICACIONES : MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL LIGNIN , STRUCTURE AND APPLICATIONS : DEPOLYMERIZATION METHODS FOR, 4(4), 15–46.
- Cheavegatti-Gianotto, A., de Abreu, H. M. C., Arruda, P., Besspalhok Filho, J. C., Burnquist, W. L., Creste, S., ... César Ulian, E. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified

- Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*, 4(1), 62–89.
<https://doi.org/10.1007/s12042-011-9068-3>
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose* (Primera). Beijing: Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- Chiriboga, G. (2012). *Estudio de factibilidad para la creación de una pequeña empresa, productora y comercializadora de abono orgánico; a partir de desechos de la caña de azúcar en la parroquia Imbaya, cantón Antoño Ante, provincia de Imabura*. Universidad Técnica del Norte. Retrieved from http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2423/1/02_ICO_299_TESIS.pdf
- Corrêa, R. C. G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 103–117.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.012>
- Cotter, T. (2014). *Praise for Organic Mushroom Farming and Mycoremediation*. Chelsea Green Publishing.
- Cubas, P. (2007). Hongos, 1–5.
- Cury R, K., Aguas M, Y., Martinez M, A., Olivero V, R., & Chams Ch, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S), 122.
<https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.530>
- Cutiño, E., & Medina, M. (2011). Análisis termogravimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales. *Tecnología Química*, XXXI, 9.
- Dahiya, S., & Goyal, S. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production : A Brief Review, (January).
- Das, K., Lee, S., & Jung, H. (2020). Molecular and Morphological Characterization of Two Novel Species Collected from Soil in Korea Molecular and Morphological Characterization of Two Novel Species. *Mycobiology*, 48(1), 9–19.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1695717>
- Du, Z., Dong, C., Wang, K., & Yao, Y. (2019). *Classification , Biological Characteristics and Cultivations of Ganoderma*. (Z. Lin & B. Yang, Eds.) (Firts). Brijing.
- Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2008). Effect of growth substrate , method of

- fermentation , and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes, 1531–1538. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0454-2>
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., & Kvesitadze, G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition, 99, 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.011>
- Elizalde, M. (2015). *Mejoramiento de la rentabilidad con diversificación de subproductos de la caña de azúcar, en Chaguarpamba. Loja*. Universidad Técnica de Machala. Retrieved from http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1983/1/CD769_TESIS.pdf
- Furci, G., & Nascimento, G. (2007). *Fungi Austral, Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile*. (Corporación Chilena de la Madera, Ed.) (First). Concepción, Chile.
- Geib, S. M., Filley, T. R., Hatcher, P. G., Hoover, K., Carlson, J. E., Jimenez-Gasco, M. d. M., ... Tien, M. (2008). Lignin degradation in wood-feeding insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12932–12937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805257105>
- Granados, Y. (2015). *Importancia De Los Ensayos TGA y DSC en el Estudio de las Propiedades Térmicas de Mezclas Asfálticas Estudiante*. Universidad Distrital Francisco José De Caldas Facultad. Retrieved from <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/3709/1/GranadosCristanchoYennyAlejandra2015.pdf>
- Hakeem, K. R., Jawaid, M., & Rashid, U. (2014). Biomass and Bioenergy. In K. Rehman & M. Jawaid (Eds.) (First, p. 68). New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07641-6>
- Huicochea, E. F. (2014). Composición del bagazo de caña por análisis termogravimétrico, (June).
- INEC. (2016). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, 23. <https://doi.org/10.4206/agrosur.1974.v2n2-09>

- INIAP. (2012). POLITICAS INSTITUCIONALES DE INVESTIGACIÓN, TRANSFERENCIA DE INNOVACIONES Y PRESTACION DE SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Retrieved from <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/POLITICASINIAP2012.pdf>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2017). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, 23. <https://doi.org/10.4206/agrosur.1974.v2n2-09>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Bioresource Technology Pretreatment of lignocellulose : Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *199*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Karimi, K. (2015a). *Lignocellulose- Based Bioproducts*. (K. Vijai, Ed.) (Volume 1). Isfahan: Springer Science.
- Karimi, K. (2015b). *Lignocellulose- Based Bioproducts*. (V. Gupta & M. Tuohy, Eds.) (Primera). Irán. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14033-9>
- Kasi, R., Norshahirah, S., & Ramesh, S. (2018). Thermogravimetric Analysis of Polymers, (January 2019). <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst667>
- Kavanagh, K. (2011). Fungi : Biology and Applications. In K. Kavanagh (Ed.) (Second, p. 125). Ireland.
- Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *26*, 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
- Kristensen, J. B. (2008). *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Substrate interactions and high solids loadings*. Forest & Landscape Denmark. Frederiksberg.
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., & Łukajtis, R. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes, 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
- Lalit, R., Mayank, P., & Ankur, K. (2018). Natural fibers and biopolymers characterization: a futura potential composite material, *68(1)*, 33–50. <https://doi.org/10.2478/scjme-2018-0004>
- Leeuwenhoek, V. (2012). Introducción a los hongos.
- López, D., Gutiérrez, A., Hernández, E., Valenzuela, R., & Esqueda, M. (2016). Diversidad y distribución de Ganoderma (Polyporales : Ganodermataceae) en

- Diversity and distribution of Ganoderma (Polyporales : Ganodermataceae) from. *Botanical Sciences*, 2(June), 431–439. <https://doi.org/10.17129/botsci.463>
- Madadi, M., Yuanyuan, T., & Abbas, A. (2017). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Based on Improving Enzymatic Review Article Pretreatment of Lignocelollusic Biomass Based on Improving Enzymatic Hydrolysis, (March). <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i1.17018>
- Madrignac, B., & Flecha, A. (2019). Evaluación del cultivo de Pleurotus ostreatus y Ganoderma lucidum (Agaricomycetes , Agaricales – Poyporales) empleando sustratos alternativos presentes en el Paraguay, 56(1), 1–13.
- Mäkelä, M. R., Bredeweg, E. L., Magnuson, J. O. N. K., Baker, S. E., Vries, R. P. D. E., & Hildén, K. (2016). Fungal Ligninolytic Enzymes and Their Applications, 1–13. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0017-2016.Correspondence>
- Maldonado, S. (2019). *Evaluación del pretratamiento biológico en biomasa lignocelulósica procedente de residuos agrícolas de fréjol Phaseolus vulgaris (tierno y seco) en la provincia de Imbabura*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Manals, E., & Penedo, M. (2011). Thermogravimetric and thermal analysis differential different vegetable biomasses, 180–190.
- Manavalan, T., & Manavalan, A. (2012). Secretome analysis of Ganoderma lucidum cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of Proteomics*, 77, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.004>
- Manoharachary, C., Sridhar, K., Singh, R., Adholeya, A., Suryanarayanan, T. S., Rawat, S., & Johri, B. N. (2005). Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science*, 89(1), 58–71.
- Masarin, F., Vicentim, M. P., & Pavan, P. C. (2008). Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping, 43, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.10.002>
- Melgar, A., Borge, D., & Pérez, J. (2008). MEDIANTE ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO PARA TAMAÑOS DE PARTÍCULA DE 2 A 19 mm KYNETIC STUDY OF THE BIOMASS DEVOLATILIZATION PROCESS IN PARTICLES SIZES BETWEEN 2-19 mm BY MEANS OF THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS, 124–131. Retrieved from

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49611953013>

- Menéndez, J. (2016). Bacidiomycetes. Características generales. <https://doi.org/ISSN1887-5068>
- Molina, C., & Espín, N. (2014). Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Ligninolítica y Celulolítica a partir del Crecimiento del Hongo *Lentinusedodes* en *Aserrín Tropical*, 33(2).
- Moore, D., Robson, G., & Trinci, A. (2011). *21st Century guidebook to fungi*. (CAMBRIDGE, Ed.) (Firts). Manchester.
- Morais, H., Forgács, E., & Cserháti, T. (2005). Enzyme production of the edible mushroom *pleurotus ostreatus* in shaken cultures completed with agro-industrial wastes. *Engineering in Life Sciences*, 5(2), 152–157. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420065>
- Moreno, C., Becerra, A., & Blanco, M. (2004). *Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 21). Madrid.
- Moreno, J., Pozo, C., & Nájera, F. (2017). *Aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en la fabricación de bloques ecológicos para mampostería liviana*. Retrieved from <http://ceaa.esPOCH.edu.ec:8080/revista.perfiles/Articulos/Perfiles08Art3.pdf>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, 96, 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). Endophytic Fungi. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, 570. <https://doi.org/9780125095518>
- Najiah, N., Nur, L., & Azlan, S. (2019). Fungal pretreatment of lignocellulosic materials. *IntechOpen*, 20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84239>
- OECD. (2014). Biomass and agriculture: Sustainability, markets and policies, 572. Retrieved from http://www.eurosfair.prD.fr/7pc/doc/1219818764_oecd_biomass_and_agriculture.pdf
- Ortiz, M., Alatorre, R., & Valvidia, R. (2011). Effect of temperature and relative humidity on entomopathogenic fungidevelopment, 1(311), 42–53. Retrieved from

<http://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/viewFile/14/12>

- Otjen, B. L., Blanchette, R., Pathology, P., Paul, S., Effland, M., Leatham, G., ... Marsh, B. (1987). Assessment of 30 White Rot Basidiomycetes for Selective Lignin Degradation, *41*(6), 343–349.
- Otjen, L., & Blanchette, R. (1982). Patterns of decay caused by *Inonotus dryophilus* (Aphyllphorales : Hymenochaetaceae), a white-pocket rot fungus of oaks1.
- Pandey, A., & Singh, P. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*.
- Pérez, J., Martínez, J., Muñoz, J., & Rubia, T. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin: an overview, 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Pietika, J. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates, *52*, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.002>
- Ramírez, E. (2019). *Caracterización de la biomasa agro-residual del maíz suave (Zea mays) en la provincia de Imbabura para producción de bioenergía*. Universidad Técnica del Norte.
- Rivera, E. C., Sarita, C., Garcia, R., Filho, R. M., & Carvalho, A. (2010). Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production : determining optimal enzyme loading using neural networks ^, (January), 983–992. <https://doi.org/10.1002/jctb.2391>
- Rodri, A. (2006). Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor, *42*(2002), 612–616. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01879.x>
- Romanelli, A. M., Sutton, D. A., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., & Wickes, B. L. (2014). Sequence-Based Identification of Filamentous Basidiomycetous Fungi from Clinical Specimens : a Cautionary Note Sequence-Based Identification of Filamentous Basidiomycetous Fungi from Clinical Specimens : a Cautionary Note , (January). <https://doi.org/10.1128/JCM.01948-09>
- Ruel, K., & Ambert, K. (1994). Influence of the enzyme equipment of white-rot fungi on the patterns of wood degradation, *13*, 241–254.
- Ryvarden, L., & Gilbertson, R. (1993). *Polipores europeos*. Retrieved from <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TargetKey=14682616000002126&Rec=12982>

- Saito, Y., Tsuchida, H., Matsumoto, T., Makita, Y., Kawashima, M., Kikuchi, J., & Matsui, M. (2018). Screening of fungi for decomposition of lignin-derived products from Japanese cedar. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (June). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.001>
- Salazar, A. (2014). *Diversidad de los géneros Ganoderma y Amauroderma en el Ecuador*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9027/Diversidad de los géneros Ganoderma y Amauroderma en el Ecuador - Andres Salazar 2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9027/Diversidad%20de%20los%20géneros%20Ganoderma%20y%20Amauroderma%20en%20el%20Ecuador%20-%20Andres%20Salazar%202014.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Sánchez, M. (2017). *Propuesta de plan de manejo para el área de conservación privada “estudio de caso reserva sabia esperanza” parroquia san francisco de sigsipamba, cantón pimampiro, provincia de imbabura*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Sasmal, S., & Mohanty, K. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Toward Biofuel Production Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Toward Biofuel Production, (November). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67678-4>
- Schmidt, O. (2006). Wood and tree fungi. In D. Czeschlik (Ed.) (first, p. 87). Leipzig.
- Siddiquee, S., Yusuf, U. K., Ain, N., & Mohd, I. (2010). Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*, (June).
- Stamets, P. (1993). *GROWING GOURMET and MEDICINAL MUSHROOMS a companion guide to The Mushroom Cultivator*.
- Suárez-medellín, J., Luna-rodríguez, M., Mendoza, G., & Salinas, A. (2008). Caracterización morfológica y molecular de una cepa silvestre mexicana perteneciente al género *Ganoderma*.
- Teixeira, R., José, M., Jara, F., González, V., Pedro, J., & Juanita, E. (2008). Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications, 1323–1330. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0414-x>
- Teixeira, R. S. S., Silva, A. S., Moutta, R. O., Ferreira-leitão, V. S., Barros, R. R. O., Ferrara, M. A., & Bon, E. P. S. (2014). Biomass pretreatment : a critical choice for

- biomass utilization via biotechnological routes. *BMC Proceedings*, 8(Suppl 4), O34. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-O34>
- Torres, M., & Guardiola, M. (2007). Estudio cinético por termogravimetría del bagazo de caña de azúcar, 7.
- Vallejos, A. F. R. (2017). VALORACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD HÍDRICA PARA LA CONSERVACIÓN DE LA RESERVA SABIA ESPERANZA, EN LA MICROCUENCA DEL RÍO MATAQUÍ. Retrieved from http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1580/1/TESIS_FINAL_REINGENIERIA_DE_PROCESOS_EMAPA_I_UN_SOLO_ARCHIVO.pdf
- Vasina, D. V, Pavlov, A. R., & Koroleva, O. V. (2016). Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* s t . 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. *BMC Microbiology*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0729-0>
- Vincenza, F. (2013). *Lignocellulose Conversion*. Naples.
- Vrsanska, M., & Palovcikova, D. (2015). MONITORING OF LACCASE PRODUCTION BY FUNGAL ISOLATES FROM CZECH FOREST, (2004), 103–107.
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi* (Third). Taylor & Francis Group.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi* (Third). Exeter.
- Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D., & Chagan, I. (2015). Laccase produced by a thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13, 65, 59–65.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y., & Wyman, C. E. (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), 421–449. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.116>
- Zhao, C., Xu, F., & Pfister, D. H. (2016). Morphological and molecular identification of a new species of *Truncospora* (Polyporales, Basidiomycota) in North America, (June). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.257.1.7>
- Zhao, R., Li, G., Sanchez-ramirez, S., & Stata, M. (2017). A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied phyla with estimated divergence times of highe, (October). <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0381-5>
- Zuñiga, C., Salazar, J., & Rodríguez Ellen. (2016). COMPARACIÓN DE MÉTODOS

GRAVIMÉTRICOS Y DE RESIDUO DE ASFALTO EN UNA EMULSIÓN
ASFÁLTICA COMPARISON OF GRAVIMETRIC AND
THERMOGRAVIMETRIC METHODS FOR OBTAINING THE PERCENTAGE
OF RESIDUE, 3-10.

7.2 Anexos

Anexo 1. Ficha de capo de Trametes

Mushroom collection identification sheet:

Possible Name: Trametes versicolor / cola de pavo

Location: Reserva Jubia Esperanza

Date (d/mm/yy): 12/04/2019

Collector: Cristina Carballo

Collection number: 2

Latitude: 040845 **Longitude:** -78-12246

Habitat (wood, soil, leaf litter, moss, other mushrooms etc. and type of trees nearby): Madera

Growth habit: (solitary, gregarious, caespitose) Solitario En grupo

Pileus: Diameter: 16 cm

Shape (young/mature): convex, conic, campanulate, depressed, umbonate, papillate, uplifted, parabolic, plane) Convexo

Colour Cafe

Colour changes/hygrophanous Al madurar

Texture (hairy, scaly, fibrous, smooth, dry, moist, sticky, slimy) Other _____

Margin (smooth, striate, corrugated, with fringe of tissue) _____

Stipe: Length: _____ Width: _____

Shape (tapering at base or apex, flattened, equal, bulbous base, clavate) _____

Context: solid, stuffed or hollow _____

Colour (including any changes when cut or bruised) _____

Texture _____

Annulus or cortina: Present or Absent

Colour: _____

Texture: _____

Persistent or disappearing with age _____

Volva: Present or Absent

Colour _____

Texture _____

Persistent or disappearing with age _____

Lamellae, pores or teeth

Form: blade, poroid (circular, angular, elongate, labyrinthiform), toothed _____

Colour when young Blanco

Colour when mature Rosado claro

Attachment: free, adnexed, adnate, sinuate, decurrent _____

Spacing: distant, moderate, close, crowded _____

Margin: smooth, serrated, wavy, scalloped, eroded; colour Blanco

Latex present or absent; if present, colour (including colour changes) _____

Flesh of Pileus and Stipe:

Colour _____

Colour changes (if any) when exposed to air _____

Thickness: _____

Odour of whole fruiting body, flesh when cut or crushed (farinaceous, geranium leaves, fungoid, radish, hot chili, flowers, fruit, almond, fish, garlic, honey, chlorine, rank, licorice, maple, wintergreen) Other Humeda

modified by Amanda Bremner from Malloch, David, winter 2005-2006. Collecting Mushrooms for scientific Study. N.B. Naturalist 32(4): p. 117

Anexo 2. Ficha de campo Ganoderma

Mushroom collection

identification sheet:

Possible Name: Ganoderma australe / orija de palo

Location: Reserva Sabia Esperanza

Latitude: 077092 Longitude: -77.81485

Date (d/mm/yy): 11/04/2019

Collector: Cristian Carlsdama

Collection number: 5

Habitat (wood, soil, leaf litter, moss, other mushrooms etc. and type of trees nearby):

Madera, frecuentemente en rioscos en pecuambos

Growth habit: (solitary, gregarious, caespitose) Solitaria

Pileus: Diameter: 30 cm

Shape (young/mature): convex, conic, campanulate, depressed, umbonate, papillate, uplifted, parabolic, plane

Colour Café oscuro

Colour changes/hygrophanous _____

Texture (hairy, scaly, fibrous, smooth, dry, moist, sticky, slimy) Other denso

Margin (smooth, striate, corrugated, with fringe of tissue) _____

Stipe: Length: _____ Width: _____

Shape (tapering at base or apex, flattened, equal, bulbous base, clavate) _____

Context: solid, stuffed or hollow _____

Colour (including any changes when cut or bruised) _____

Texture _____

Annulus or cortina: Present or Absent

Colour: _____

Texture: _____

Persistent or disappearing with age _____

Volva: Present or Absent

Colour _____

Texture _____

Persistent or disappearing with age _____

Lamellae, pores or teeth

Form: blade, poroid (circular, angular, elongate, labyrinthiform), toothed _____

Colour when young Blanco y aliger café

Colour when mature Rojo que do

Attachment: free, adnexed, adnate, sinuate, decurrent _____

Spacing: distant, moderate, close, crowded _____

Margin: smooth, serrated, wavy, scalloped, eroded; colour _____

Latex present or absent; if present, colour (including colour changes) _____

Flesh of Pileus and Stipe:

Colour _____

Colour changes (if any) when exposed to air _____

Thickness: _____

Odour of whole fruiting body, flesh when cut or crushed (farinaceous, geranium leaves, fungoid, radish, hot chili, flowers, fruit, almond, fish, garlic, honey, chlorine, rank, licorice, maple, wintergreen) Other Aroma sutil a madera

modified by Amanda Bremner from Malloch, David, winter 2005-2006. Collecting Mushrooms for scientific Study. N.B. Naturalist 32(4): p. 117

Anexo 3. Contenido promedio de hemicelulosa, celulosa y lignina en los factores y tratamientos en estudio

	Hemicelulosa	DE	Celulosa	DE	Lignina	DE
F1	0,52	0,17	0,31	0,12	0,16	0,10
F2	0,49	0,03	0,42	0,05	0,09	0,05
<i>Trametes hirsuta</i>	0,47	0,14	0,40	0,11	0,13	0,09
	0,54	0,08	0,33	0,10	0,13	0,05
TH F1	0,43	0,22	0,38	0,16	0,18	0,07
TH F2	0,51	0,02	0,42	0,08	0,07	0,07
Gano F1	0,61	0,05	0,25	0,05	0,14	0,06
Gano F2	0,47	0,01	0,42	0,01	0,11	0,02
Factores	0,51	0,08	0,37	0,08	0,13	0,05
Bagazo	0,38	0,10	0,44	0,06	0,18	0,06
Bagazo enriquecido	0,45	0,02	0,35	0,02	0,20	0,03

DE=Desviación estándar F1= Bagazo sin fermentar F2= Bagazo fermentado

Anexo 4. ADEVA para las variables hemicelulosa, celulosa y lignina

FdV	gl	Hemicelulosa		Celulosa		Lignina	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Repetición	2	2	0,22	1	0,42	1,35	0,33
Tratamiento	5	2	0,22	1	0,42	3,23	0,11
Hongo	1	5	0,05	1	0,42	0,02	0,98
Fermentación	1	4	0,08	3	0,13	6,45	0,03*
Hongo*Fermentación	1	1	0,42	1	0,42	1,19	0,37
Factorial vs Adicionales	1	0,15	0,86	0,23	0,80	0,35	0,72
bagazo vs Bagazo enriquecido	1	0,2	0,82	1	0,42	6,45	0,03*
Error	6						
Total	11						

*Valores con $p < 0,05$ por lo tanto considerados como significativos