



**Crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote de *Atta mexicana*, usando sustratos lignocelulósicos y la detección de enzimas lignocelulolíticas**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Naturales e Ingeniería

**PRESENTA**

M. en B. Minerva Elizabeth Maya Yescas

Director: Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Asesores: Dr. Ernesto Favela Torres

Dra. Sylvie Le Borgne

Dr. Sergio Revah Moiseev

**Ciudad de México, 2022**

“El doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. CONACYT, y además cuenta con apoyo del mismo consejo” con la referencia 001466.

Minerva Elizabeth Maya Yescas agradece la beca de posgrado CONACyT (CVU 90734) para realizar este trabajo, también agradece al proyecto SEP–CONACyT No. 287615 por el financiamiento otorgado.

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo teórico-práctico, fue conducido por el Dr. Gabriel Vigueras Ramírez de septiembre 2015 a abril-2022 en la UAM Cuajimalpa. El procedimiento experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos de la Unidad Cuajimalpa.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 28 del mes junio del año 2022, la que suscribe Minerva Elizabeth Maya Yescas\ alumna del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada “Crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte de *Atta mexicana*, usando sustratos lignocelulósicos y la detección de enzimas lignocelulolíticas” realizada bajo la dirección del Dr Juan Gabriel Vigueras Ramírez y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

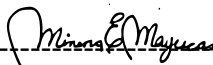
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del director del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [jvigueras@cua.uam.mx](mailto:jvigueras@cua.uam.mx)

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Minerva Elizabeth Maya Yescas

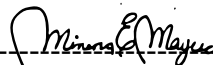
## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

“La que suscribe, Minerva Elizabeth Maya Yescas, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que éste fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

-----  
  
-----  
Minerva Elizabeth Maya Yescas

## **DECLARACIÓN DE NO LUCRO**

“La que suscribe, Minerva Elizabeth Maya Yescas, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana y Minerva Elizabeth Maya Yescas.”

-----  
  
-----  
Minerva Elizabeth Maya Yescas

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a Dios por bendecirme cada día. A mis padres por darme la vida. Al Dr. Sergio Revah, por brindarme su generosa confianza y apoyo para trabajar en este proyecto. Al Dr. Gabriel Viguera por compartir su proyecto y sus enseñanzas. Al Dr. Favela por seguir siendo parte importante de mi desarrollo académico. A la Dra. Sylvie por todas sus sugerencias y aportaciones. A la Dra. Mayola García por su apoyo incondicional para seguir creciendo juntas en nuestro desarrollo profesional. A la M en C. Marysol Bello por su maravillosa amistad, ayuda y gran experiencia laboral.

A los Doctores: Eduardo Palacios y Eduardo Terrés, por abrirme las puertas a los microscopios electrónicos que ayudaron a mejorar consistentemente este trabajo. A las Doctoras: Maribel Hernández, Ale García, Izlia Arroyo, Irmene Ortiz y Flor García, por su amplia experiencia, su colaboración en la parte experimental y por creer en mí.

Al Dr. Julio Espinoza, al M en C. Sergio Hernández y Lic. Moisés Pizaña, por sus valiosos comentarios y contribuciones.

Al Dr. Dennis Infante, M en E. Gibran Pérez y M en C. Andrea Ballen, por su vasta dedicación y paciencia, ya que estamos por publicar próximamente un artículo. Al Dr. Jorge Valenzuela que proporcionó las colonias y consecuentemente permitió un avance sustancial a la investigación. Al Dr. Carlos Patiño por compartir el conocimiento que facilitó eficientemente la resolución de algunos obstáculos.

A todos mis compañeros del laboratorio y planta piloto: M en C. Cenit Soto, Dra Tere García, M en C.I.Q. Kari Castillo, Dr. Toño Velasco, Lic. Ángel Camacho, M en I.E. Jaqui Rosa, Dr. Octavio Saucedo, Ing. Alexis Saldivar, Lic. Leo Castillo, Lic. Uriel Vázquez, M en I.R.H. Caro Cruz, Lic. Fanny Fonseca, I.B. Vero Duran, Dra.Tania Gómez, M en C. Paty Ruiz, Lic. Ezequiel Flores, M en C. Isra Lara, M en C. Adri Marín, M en C. Aby Hernández, Lic. Brenda Rodríguez, Lic. Patricio López, M en C. Adrián Estrada y Lic. Diego Gaytan, gracias por su grata compañía y por alentarme a continuar.

Al Dr. Diego Rodríguez, Dr. Gilmar Ayala y M en G.E. MaryFer Linares, por su estupendo apoyo en la redacción de la tesis y artículos.



A mi hija Nati por ayudarme en las óptimas traducciones al inglés y en las presentaciones cruciales, a mi hijo Millo por alentarme a graduarme; a mi cuñada Gladys y mi hermano Rafa por sus consejos y revisión asertiva de la tesis; a mis hermanos Eddy, Miguel y Moni, por su paciencia, comprensión y sobre todo su amor.

A Juan Carlos, gracias a Dios nos reencontramos en el momento indicado y decidiste quedarte a mi lado, por lo que solo me queda decirte:

*“Love me tender, love me true*

*All my dreams fulfill*

*For my darling, I love you*

*And I always will” -Elvis Presley*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) en el posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, al Programa Adopte un Talento (PAUTA), al Instituto Nacional de Ecología (INECOL) y al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), por darme el espacio y las herramientas para continuar con mi desarrollo académico y profesional.

*“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”*

-Marie Curie.

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Materiales lignocelulósicos.....	4
2.1.1 Celulosa.....	5
2.1.2 Hemicelulosa.....	6
2.1.3 Lignina.....	8
2.2 Hormigas cortadoras de hojas.....	9
2.3 Selección de hojas por las hormigas.....	10
2.4 Jardín del hongo.....	11
2.5 Mutualismo obligado hormiga-hongo.....	14
2.7 Compuestos orgánicos volátiles.....	19
2.8 Capacidad metabólica del hongo.....	20
2.9 Actividades enzimáticas.....	20
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares.....	24
6.1 Cepa fúngica.....	25
6.2 Mantenimiento del jardín del hongo.....	25
6.3 Medio mineral definido.....	27
6.4 Medio YNB.....	27
6.5 Medición de CO <sub>2</sub> por cromatografía de gases.....	27
6.6 Microscopía óptica y electrónica de barrido ambiental (MEBA).....	28
6.7 Análisis elemental por microscopía electrónica de barrido de doble haz (SEM-FIB) .....	28

6.8 <i>Leucoagaricus. gongylophorus</i> creciendo en sustratos lavados o esterilizados observado por MEBA.....	28
6.9 Cultivo sólido con residuos lignocelulógicos.....	29
6.10 Cultivos sumergidos y sólido con residuos lignocelulósicos y sustratos modelo.....	29
6.11 Ensayos de actividad endoglucanasa y xilanasa y cuantificación de CO <sub>2</sub> .....	30
6.12 Ensayo de actividad lacasa.....	32
6.13 Identificación de compuestos orgánicos volátiles.....	32
6.14 Perfiles de proteínas analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	33
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
7.1 Mantenimiento del Jardín del hongo.....	35
7.2 <i>Leucoagaricus. gongylophorus</i> creciendo en sustratos lavados o esterilizados observado por MEBA.....	36
7.3 Crecimiento fúngico observado microscopía óptica y electrónica de barrido ambiental.....	39
7.4 Cultivos sumergidos y sólido con residuos lignocelulósicos y sustratos modelo.....	41
7.5 Cultivo sólido con residuos lignocelulógicos.....	43
7.6 Cultivo sumergido con sustratos modelo.....	45
7.7 Actividad enzimática de endoglucanasa, xilanasa y lacasa.....	46
7.8 Ensayos de actividad endoglucanasa, xilanasa y cuantificación de CO <sub>2</sub> .....	49
7.9 Identificación de compuestos orgánicos volátiles durante la biodegradación de residuos lignocelulósicos.....	54
7.10 Perfiles de proteínas de <i>L. gongylophorus</i> creciendo con Xilano o Malta.....	57
7.11 Análisis elemental por microscopía electrónica de barrido de doble haz (SEM-FIB).....	60
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1</b> FIBRAS NATURALES, LOCALIZACIÓN Y DISPOSICIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES POLIMÉRICOS EN LA PARED CELULAR VEGETAL .....	5
<b>FIGURA 2.2</b> ESTRUCTURA DE LA CELULOSA FORMANDO UNIONES 1,4 D-GLUCÓSIDO .....	6
<b>FIGURA 2.3</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL XILANO, UNA HEMICELULOSA .....	7
<b>FIGURA 2.4</b> MONÓMEROS DE LA LIGNINA, CUMARÍLICO IZQUIERDA, CONIFERÍLICO CENTRO Y SINAPÍLICO DERECHA .....	8
<b>FIGURA 2.5</b> ESTRUCTURA PROPUESTA DEL POLÍMERO DE LA LIGNINA .....	9
<b>FIGURA 2.6</b> MICROGRAFÍAS DE GONGYLIDIA DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> . EN LAS GONGYLIDIA CONTIENEN LA MAYOR CANTIDAD DE ENZIMAS. (A) GONGYLIDIA (AUMENTO DE 50×) (B) CADA ESFERA CORRESPONDE A UN GONGYLIDIUM (AUMENTO DE 1000×). FUENTE: SCHNEIDER Y ODAIR, 2003 .....	10
<b>FIGURA 2.7</b> HORMIGA <i>ATTA CAPIGUARA</i> QUE CORTÓ Y ACARREA PASTO .....	11
<b>FIGURA 2.8</b> JARDÍN DEL HONGO Y DIAGRAMA DONDE SE MUESTRA EL CULTIVO DEL HONGO, <i>L. GONGYLOPHORUS</i> , POR LA HORMIGA CORTADORA DE HOJAS. PRIMERO, LA HORMIGA CORTA Y ACARREA LA HOJA AL NIDO, DESPUÉS LLEGA AL HONGO MASTICA LA HOJA, LA DEPOSITA SOBRE EL HONGO Y POSTERIORMENTE DEPOSITAN GOTITAS FECALES .....	12
<b>FIGURA 2.9</b> JARDÍN DEL HONGO DE LAS HORMIGAS <i>ATTA CEPHALOTES</i> , CON SU HORMIGA REINA .....	13
<b>FIGURA 2.10</b> NIDO DE HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS <i>ATTA LEAVIGATA</i> DONDE RELLENARON LOS TÚNELES CON 6,300 KG DE CEMENTO, (A) NIDO DE HORMIGA (B) Y (C) CÁMARAS DE LOS NIDOS Y SUS TÚNELES (D) CÁMARA QUE PUEDE SER PARA: DESECHOS, JARDÍN DEL HONGO O VACÍA. NIDO MOLDEADO Y EXCAVADO POR M. BOLLAZZI, S. MOREIRA, F. ROCES, L.C. FORTI Y ASISTENTES .....	14

<b>FIGURA 2.11</b> EL DESARROLLO DE UNA COLONIA DE <i>ATTA MEXICANA</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO. A) HORMIGA REINA; B) PRIMEROS OBRERAS Y JARDÍN DEL HONGO DE <i>LEUCOAGARICUS GONGYLOPHORUS</i> ; C) JARDÍN DEL HONGO CON DIFERENTES ESTRATOS. (FUENTE: FOTOS INFANTE-RODRÍGUEZ ET AL., 2020) .....	15
<b>FIGURA 6.12</b> JARDÍN DEL HONGO DE LA HORMIGA <i>ATTA MEXICANA</i> EN UN RECIPIENTE DE 250 ML, CONECTADO AL ÁREA FORRAJEO CON VÁLVULA MININERT PARA EL MONITOREO DEL CO <sub>2</sub> .....	26
<b>FIGURA 6.13</b> ÁREAS DE FORRAJEO CON HORMIGAS <i>ATTA MEXICANA</i> , EL AGUA SE PROPORCIONA CON UN VIAL CON ALGODÓN HUMEDECIDO, USANDO COMO SUSTRATO HOJAS Y PÉTALOS DE ROSA .....	26
<b>FIGURA 7.14</b> CRECIMIENTO PROGRESIVO DEL JARDÍN DEL HONGO DE UNA MINI COLONIA CON CA. 650 HORMIGAS <i>ATTA MEXICANA</i> , ALCANZANDO UN VOLUMEN DE 250 CM <sup>3</sup> EN 160 DÍAS .....	35
<b>FIGURA 7.15</b> MICROGRAFÍAS POR MEBA (A) BAGAZO DE AGAVE ESTERILIZADO; (B) BAGAZO DE AGAVE ESTERILIZADO CON CRECIMIENTO DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> DESPUÉS DE CINCO DÍAS .....	37
<b>FIGURA 7.16</b> MICROGRAFÍAS POR MEBA DEL CRECIMIENTO DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> EN: (A) BAGAZO DE CAÑA LAVADO; (B) BAGAZO DE CAÑA ESTERILIZADO; (C) PASTO LAVADO; Y (D) PASTO ESTERILIZADO .....	38
<b>FIGURA 7.17</b> <i>L. GONGYLOPHORUS</i> (A) JARDÍN DEL HONGO (B) JARDÍN DEL HONGO POR MICROSCOPIA ÓPTICA (C) GONGYLIDIA POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y (D) MICELIO Y GONGYLIDIA POR MEBA .....	39
<b>FIGURA 7.18</b> MICROGRAFÍAS DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> CRECIENDO EN SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS. (A) BAGAZO DE CAÑA; (B) MICROGRAFÍA POR MEBA DE BAGAZO DE CAÑA; (C) PASTO Y (D) MICROGRAFÍA POR MEBA DE PASTO .....	40

<b>FIGURA 7.19</b> PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> EN CULTIVOS DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> EN ESTADO SÓLIDO; HONGO-PASTO (●); HONGO-BAGAZO (▲). CULTIVO LÍQUIDO: HONGO-PASTO (○); HONGO- BAGAZO (Δ) .....	43
<b>FIGURA 7.20</b> CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> CULTIVADO CON RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS. LÍNEA AZUL: CO <sub>2</sub> PRODUCIDO; SOMBREADO GRIS; ERROR ESTÁNDAR; LÍNEA ROJA PUNTEADA: AJUSTE AL MODELO GOMPERTZ. IZQUIERDA: HONGO-PASTO. DERECHA: HONGO-BAGAZO .....	44
<b>FIGURA 7.21</b> PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> PRODUCIDO POR <i>L. GONGYLOPHORUS</i> EN CULTIVO SUMERGIDO: XILANO (●); CMC (■); LIGNINA (▲) .....	46
<b>FIGURA 7. 22</b> ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ENDOGLUCANASAS Y XILANASAS RESPECTIVAMENTE. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICA; U/MG PROTEÍNA (BLANCO Y MALLA); HALOS DE HIDRÓLISIS; CM <sup>2</sup> GRIS Y NEGRO .....	48
<b>FIGURA 7. 23</b> CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> (●)AJUSTADO A GOMPERTZ (LÍNEA PUNTEADA) Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ENDOGLUCANASA (□) Y XILANASA (■) DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> CRECIENDO CON PASTO EN CULTIVO SÓLIDO .....	50
<b>FIGURA 7.24</b> CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CO <sub>2</sub> (●) AJUSTADO A GOMPERTZ (LÍNEA PUNTEADA) Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ENDOGLUCANASA (□) Y XILANASA (■) DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> CRECIENDO CON BAGAZO DE CAÑA EN CULTIVO SÓLIDO .....	51
<b>FIGURA 7 25</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>L. GONGYLOPHORUS</i> AL CRECER CON XILANO (XYL-LG) O MALTA (MALT-LG). LA PRIMERA LÍNEA CORRESPONDE AL MARCADOR DEL PESO MOLECULAR (MW) .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 7.1</b> COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES IDENTIFICADOS EN CULTIVOS DE ESTADO SÓLIDO DE <i>L. GONGYLOPHORUS</i> DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS .....	55
<b>TABLA 7.2</b> ANÁLISIS ELEMENTAL DE JARDÍN DEL HONGO Y <i>L. GONGYLOPHORUS</i> AISLADO, DETERMINADO CON SONDA DISPERSIVA DE RAYOS X DE MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DE DOBLE HAZ .....	61

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
<b>ABTS</b>	Ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
<b>LDA</b>	Auxiliares en la degradación de lignina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSE</b>	Electrones retro dispersados
<b>C8</b>	Con 8 átomos de carbono
<b>CAR-PDMS</b>	Fibra de carboxeno / polidimetilsiloxano
<b>CAZymes</b>	Carbohydrate-Active Enzymes
<b>CG-MS</b>	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
<b>CL</b>	Cultivo sumergido
<b>ca</b>	Del latín circa, ‘ alrededor de’, aproximadamente
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa
<b>CS</b>	Cultivo sólido
<b>COVs</b>	Compuestos orgánicos volátiles
<b>CM-celulosa</b>	Carboximetil celulosa
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ESEM</b>	Environmental Scanning Electron Microscope
<b>EDS</b>	Espectrómetro de energía dispersiva
<b>GSE</b>	Electrones secundarios
<b>FOLymes</b>	Fungal Oxidative Lignin Enzymes
<b>GCMS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>HS</b>	Headspace



<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<b>IQR</b>	Tasa intercuartil
<b>KDa</b>	Kilo Daltons
<b>Lg</b>	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>
<b>LO</b>	Lignina oxidasa
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>MEBA</b>	Microscopía electrónica de barrido ambiental
<b>MS</b>	Espectrómetro de masas
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la información Biotecnológica
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>SPME</b>	Extracción por microextracción en fase sólida
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>U/mg proteína</b>	Unidad enzimática específica
<b>UNIBIO</b>	Unidad de Bioinformática para la Biodiversidad
<b>COV</b>	Compuestos Orgánicos Volátiles

## RESUMEN

Las hormigas cortadoras de hojas han aprovechado, aproximadamente desde hace quince millones de años, la capacidad metabólica del hongo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer) para hidrolizar polímeros vegetales con el fin de obtener nutrientes de las hojas. El hongo y las hormigas forman una relación simbiótica mutualista obligada, en la cual las hormigas proporcionan el material vegetal al hongo. Complementariamente, el hongo sintetiza y secreta un coctel de enzimas lignocelulolíticas, las cuales liberan azúcares que utiliza el hongo para su crecimiento y mantenimiento. Además, el hongo acumula una fracción de los azúcares en forma de glucógeno en las gongylidia, que son estructuras globulares que sirven de alimento a las hormigas. Este proceso se lleva a cabo dentro de los nidos de las hormigas en el llamado jardín de hongo, el cual se asemeja a una esponja y funciona como biorreactor de estado sólido.

Es importante mencionar que existen pocos estudios del hongo *L. gongylophorus* creciendo sin hormigas en condiciones de laboratorio; por lo que el objetivo de esta tesis se enfocó en evaluar el crecimiento de *L. gongylophorus* en sustratos lignocelulósicos en cultivo sólido y en cultivo sumergido, detectando actividades enzimáticas, identificando compuestos orgánicos volátiles que se producen durante la degradación de estos sustratos y la observación en su morfología por medio de microscopía electrónica ambiental. El hongo *L. gongylophorus* aislado de la hormiga cortadora de hojas *Atta mexicana*, proveniente de Coatepec-México, creció en cultivo sumergido (CL) y en cultivo sólido (CS), conjuntamente con biomasa lignocelulósica, bagazo de caña (hongo-bagazo) y pasto (hongo-pasto), así como con los sustratos modelo carboximetil-celulosa, xilano y lignina. La tasa de producción de CO<sub>2</sub> obtenida para el conjunto hongo-pasto en CL ( $V_{\max} 34.76 \text{ mg CO}_2 \text{ L}_{\text{gas}}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) fue casi cuatro veces mayor que en CS ( $V_{\max} 9.49 \text{ mg CO}_2 \text{ L}_{\text{gas}}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ). La tasa de producción obtenida para el conjunto hongo-bagazo en CL ( $V_{\max} 16.02$

mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) fue tres veces superior a la obtenida en CS (V<sub>max</sub> 5.42 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Similarmente, el hongo creció en CL usando sustratos modelo como fuente de carbono, observándose la relación de velocidades como xilano > carboximetil - celulosa > lignina. Las mayores actividades enzimáticas se obtuvieron en los cultivos hongo-pasto y hongo-bagazo tanto de endoglucanasas (73.1 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> al décimo día; 14.17 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> al noveno día), y de xilanasas (49.75 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> al doceavo día; 12.37 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> al décimo día) respectivamente. También se identificó actividad lacasa en las muestras hongo-jardín (44.8 U L<sup>-1</sup>) y hongo-pasto (10.9 U L<sup>-1</sup>). Por otra parte, al crecer el hongo en CS con xilano, se observó un perfil de proteínas con bandas de 36.1 kDa, 44.3 kDa y 59.9 kDa, las cuales se aproximan a las masas moleculares de CAZymes del tipo pectin metil esterasa, xilanasas XyLg1, endoglucanasas y glioxaloxidasas, respectivamente. En los cultivos se identificó estireno, 2-pentil furano, alcohol bencílico y benzaldehído, entre otros COV's, que son productos metabólicos de hongos filamentosos. Aunque la composición elemental del jardín del hongo y *L. gongylophorus* aislado mostró diferencias significativas, se evidenció que en el hongo aislado se conservan las enzimas que ablandan los residuos lignocelulósicos. Las estructuras de *gongylidia* observadas por MEBA registraron un tamaño promedio de ca. 40 μm y ancho de hifas de ca. 5 μm. Por lo tanto, la capacidad metabólica de este hongo podría aprovecharse para producir enzimas celulolíticas utilizando sustratos lignocelulósicos.

## ABSTRACT

For fifteen million years, leafcutter ants have taken advantage of the metabolic capacity of the basidiomycete fungus *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer) to hydrolyze plant polymers in order to obtain nutrients from the leaves. The fungus and the ants form an obligate mutualistic symbiotic relationship, in which the ants provide the plant material to the fungus. In addition, the fungus synthesizes and secretes a cocktail of lignocellulolytic enzymes, which release sugars that the fungus uses for its growth and maintenance. In addition, the fungus accumulates a fraction of the sugars in the form of glycogen in the *gongylidia*, the globular structures that serve as food for the ants. This process takes place inside the ants' nests in a so-called fungus garden, which resembles a sponge and functions as a solid-state bioreactor.

It is important to mention that there are few studies of the fungus *L. gongylophorus* growing without ants in laboratory conditions; Therefore, the objective of this thesis focused on evaluating the growth of *L. gongylophorus* using lignocellulosic substrates in solid culture and in submerged culture, in order to recover enzymes with lignocellulolytic activity and identify the volatile organic compounds that are produced. during the degradation of these substrates, as well as observing their morphology through environmental scanning electron microscopy. The fungus *L. gongylophorus* isolated from the Mexican *Atta leafcutter* ant, from Coatepec-Mexico, was grown in submerged culture (CL) and in solid culture (SC), together with lignocellulosic biomass, cane bagasse (fungus-bagasse). and grass (fungus-grass), as well as with the model substrates carboxymethyl-cellulose, xylane and lignin. The CO<sub>2</sub> production rate obtained for the fungus-grass set in CL ( $V_{\max}$  34.76 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) was almost four times higher than in CS ( $V_{\max}$  9.49 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>).

The production rate obtained for the fungus-bagasse group in CL ( $V_{\max}$  16.02 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) was three times higher than that obtained in CS ( $V_{\max}$  5.42 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). Similarly, the fungus grew in LC using model substrates as carbon source, the rate relationship was observed as xylane > carboxymethyl-cellulose > lignin. The highest enzymatic activities were obtained in the fungus-grass and fungus-bagasse cultures of both endoglucanases (73.1 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> on the tenth day; 14.17 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> on the ninth day), and xylanase (49.75 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> on the twelfth day; 12.37 U g<sup>-1</sup><sub>ss</sub> on the tenth day) respectively.

Also, laccase activity was identified in the fungus-garden (44.8 U L<sup>-1</sup>) and fungus grass (10.9 U L<sup>-1</sup>) samples. On the other hand, when the fungus was grown in CS with xylane, a protein profile with bands of 36.1 kDa, 44.3 kDa and 59.9 kDa was observed, which approximated the molecular masses of CAZymes of the type pectin methyl esterase, xylanase XyLg1, endoglucanases and glyoxaloxidase, respectively. Styrene, 2-pentyl furan, benzyl alcohol and benzaldehyde, among other VOCs, which are metabolic products of filamentous fungi, were identified in the cultures. Although the elemental composition of the fungus garden and *L. gongylophorus* showed significant differences, it was evidenced that enzymes that soften lignocellulosic residues are preserved in the isolated fungus. The structures of *gongylidia* observed by MEBA recorded an average size of ca. 40 μm and width of hyphae of ca. 5 μm. Therefore, the metabolic capacity of this fungus could be used to produce cellulolytic enzymes using lignocellulosic substrates.

## 1. INTRODUCCIÓN

La biomasa lignocelulósica es el principal componente de la pared celular de las plantas, está conformada principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, es considerada una fuente de carbono renovable que podría ser una alternativa para solucionar algunos problemas de energía y materia prima. La ventaja del aprovechamiento de residuos agrícolas, forestales y/o agroindustriales es que esta materia prima evita la competencia con los alimentos. En las últimas dos décadas, se ha incrementado el número de investigaciones enfocadas en obtener biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos (Sánchez, 2009; Camarero et al., 2014). Sin embargo, para poder aprovechar estos materiales aún falta resolver algunos problemas técnicos que permitan liberar los azúcares fermentables contenidos en la lignocelulosa (Sun y Cheng, 2002). Algunas propuestas consisten en usar tratamientos ácidos con alta temperatura y presión; sin embargo, estos procesos consumen energía y generan compuestos que inhiben el metabolismo de las levaduras en la fermentación (El-Zawawy et al., 2011). Una alternativa consiste en usar cocteles enzimáticos que liberan los azúcares de la celulosa en condiciones suaves; es decir, sin producir inhibidores (Cannella y Jørgensen, 2014), de ahí que existen diversas investigaciones enfocadas a encontrar enzimas en diferentes tipos de microorganismos, incluyendo los hongos que degradan materiales lignocelulósicos. Se ha reportado que las hormigas cortadoras de hojas aprovechan la capacidad que tiene un hongo para hidrolizar los polímeros vegetales, lo cual les ha permitido obtener energía (Aylward et al., 2013). Por lo que resulta, particularmente interesante la simbiosis que existe entre las hormigas cortadoras de hojas y *L. gongylophorus*, un hongo, con el cual han establecido una relación mutualista, donde el hongo proporciona las enzimas necesarias para degradar los polímeros vegetales y liberar azúcares, de los cuales una fracción es empleada por el mismo hongo para satisfacer sus

requerimientos energéticos, mientras que otra es acumulada en forma de glucógeno dentro de las gongylidia, las cuales sirven como fuente de energía para las hormigas. En México habitan las especies *Atta mexicana*, *A. cephalotes* y *A. texana*, la primera es endémica y la más abundante. En la literatura existen reportes sobre la simbiosis *L. gongylophorus* con las hormigas, sus actividades enzimáticas, sus secuencias de genes y proteínas, sin embargo, aún no se conocen todas sus capacidades metabólicas. No obstante, existe cierta controversia en cuanto a la capacidad que tiene *L. gongylophorus* para degradar los complejos lignocelulósicos. Algunos autores sugieren que las levaduras y bacterias que residen en el jardín de hongo también contribuyen en este proceso (Lange y Grell, 2014; Richard et al., 2005; Silva et al., 2006). Y otros autores reportan que el hongo es incapaz de metabolizar celulosa y lignina (Abril y Bucher, 2002).

En el grupo de investigación de la UAM-Cuajimalpa se aisló, identificó y se obtuvo el genoma de *L. gongylophorus* LEU18496, simbiote de *A. mexicana*, y en un primer trabajo se reportó que el hongo es capaz de crecer sin hormigas en cultivo sólido usando pasto o bagazo de caña (Vigueras et al., 2017). Recientemente el grupo obtuvo un ensamble y anotación funcional del genoma de *L. gongylophorus* (GenBank: KJ419350.1) proponiendo la primera red del metabolismo central del carbono de este hongo enfocada en la vía de síntesis de glucógeno como metabolito de interés (Cejas-Añón, 2022). Por todo lo anterior, se muestra el potencial que podría tener *L. gongylophorus* para ablandar residuos lignocelulósicos y obtener productos de valor agregado. Sin embargo, es necesario continuar las investigaciones al respecto. De ahí, que esta tesis se enfocó en evaluar el crecimiento de *L. gongylophorus* usando sustratos lignocelulósicos en cultivo sólido y en cultivo sumergido, con el fin de detectar enzimas con actividad

lignocelulolítica e identificar los COV's que se producen durante la degradación de estos sustratos, así como observar a través de microscopía su morfología.

La organización de la tesis es la siguiente: En la primera parte, se encuentra la introducción, seguida de la revisión de la literatura sobre los tópicos centrales: sustratos lignocelulósicos, así como una revisión acerca del fungicultivo realizado por las hormigas cortadoras de hojas, las interacciones de la asociación mutualista hormiga-hongo y sus beneficios al ecosistema. En segundo término, se presentan la justificación, hipótesis y objetivos de la tesis, así como el material y los métodos utilizados. A continuación, se presentan de forma detallada las metodologías y materiales utilizados para el desarrollo experimental. Posteriormente, se exhiben los resultados y su respectiva discusión; esta sección se concentra, sobre todo, en los perfiles de producción de CO<sub>2</sub>, en el análisis de las actividades de las enzimas lignocelulolíticas extracelulares de endoglucanasa, xilanasa y lacasa, en la identificación de los compuestos orgánicos volátiles liberados en los cultivos sólidos suministrados con residuos lignocelulósicos y, también, en la observación del *L. gongylophorus* mediante microscopía electrónica. Una última sección se presentan las principales conclusiones de esta investigación.

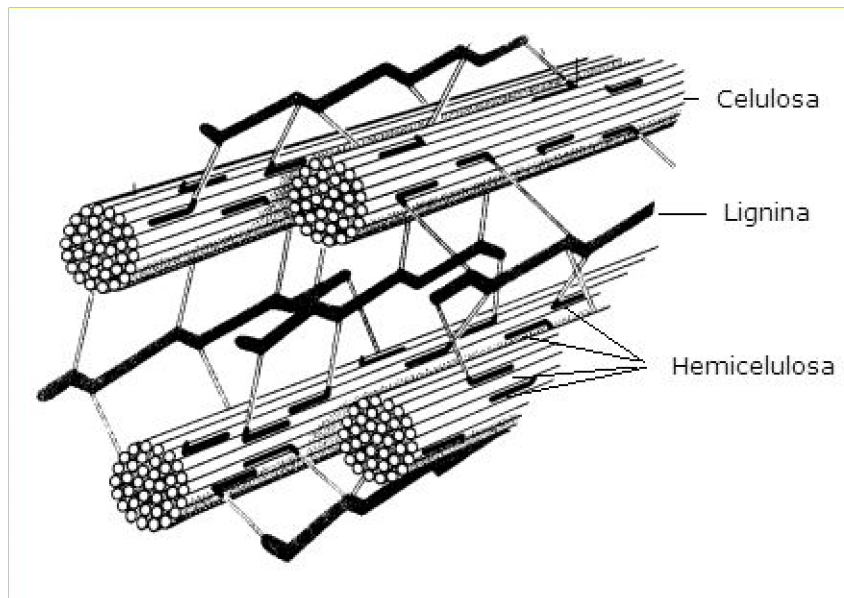


## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Las investigaciones sobre el aprovechamiento y producción de enzimas a partir de residuos lignocelulósicos han sido enfocadas para aprovechar un recurso renovable. Los residuos lignocelulósicos, en particular sus componentes celulosa y hemicelulosa, son ampliamente utilizados en los procesos de hidrólisis que puedan ser fermentadas para la producción de etanol. En las últimas dos décadas se ha incrementado el número de investigaciones enfocadas en la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Sin embargo, la presencia de lignina en estos recursos representa uno de los mayores obstáculos para alcanzar la conversión. Una alternativa consiste en usar cocteles enzimáticos, los cuales liberan los azúcares de la celulosa en condiciones suaves, sin producir inhibidores (Sun y Cheng, 2002; Sánchez, 2009; Camarero et al., 2014; Tellez et al., 2016). Los residuos agrícolas, constituyen un importante ejemplo de materiales de gran abundancia, además de ser renovables, no tóxicos y sustentables (Mathew et al., 2006).

### **2.1 Materiales lignocelulósicos**

La pared celular vegetal está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, que es el material lignocelulósico. La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en nuestro planeta y es considerado un recurso natural renovable. La estructura de la pared celular vegetal se asemeja a tubos apilados de dimensiones microscópicas, conocidas como fibras naturales, Figura 2.1.



**Figura 2.1** Fibras naturales, localización y disposición de los principales componentes poliméricos en la pared celular vegetal.

Fuente: <http://eprints.uanl.mx/9397/1/1080214894.pdf>

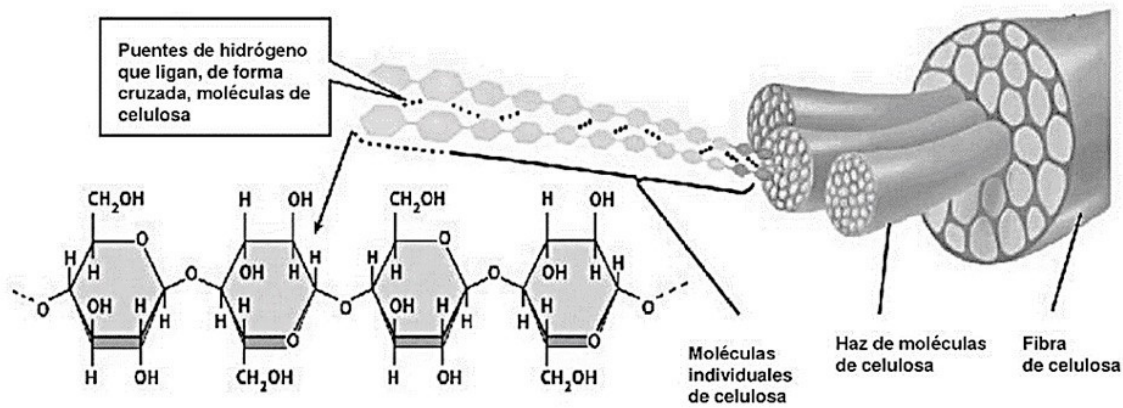
La composición de la pared celular permite a los vegetales resistir los cambios en la turgencia en el medio donde se desarrollan. Los materiales lignocelulósicos son difíciles de biodegradar, es decir, son recalcitrantes. Sus polímeros se encuentran entrecruzados en una matriz que le ofrece protección contra daño físico, químico y microbiológico. En las fibras lignocelulósicas el proceso de degradación ocurre en un rango de temperaturas entre los 200 °C y 400 °C para la celulosa; en cambio para la hemicelulosa y la lignina entre 400 °C y 600 °C (Kabir et al., 2012; Carrillo-González y Torres-Bustillos, 2019).

### 2.1.1 Celulosa

La celulosa es el principal componente del material lignocelulósico, su porcentaje dependerá por el tipo de biomasa o residuo. La estructura polimérica de la celulosa consiste en la unión de

moléculas de  $\beta$ -glucosa a través de enlaces  $\beta$  glucosídicos, lo que hace que sea insoluble en agua,

Figura 2.2.



**Figura 2.2** Estructura de la celulosa formando uniones 1,4 D-glucósido.

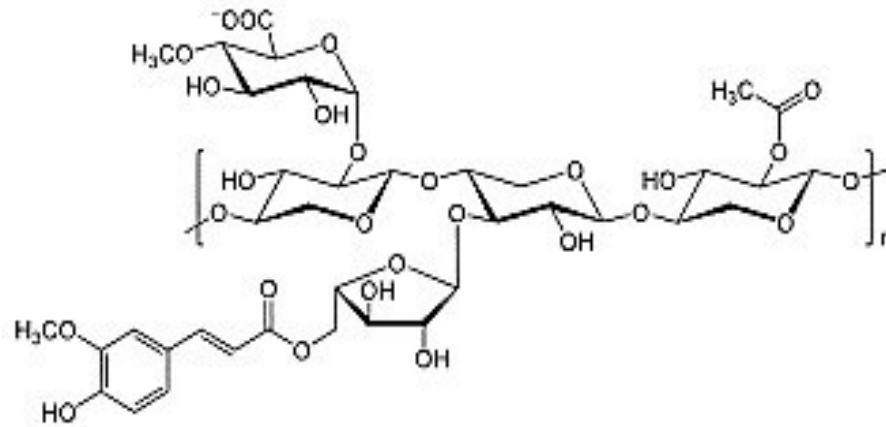
Fuente: <https://images.app.goo.gl/Kqyr857dmCwB4U8x7>

Las moléculas de celulosa están unidas en forma de microfibras altamente ordenadas generando una estructura cristalina que presenta en algunas regiones amorfas. La celulosa tiene una estructura en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas de glucosa yuxtapuestas, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua.

Los usos de la celulosa proveniente de maderas y plantas a nivel industrial, es la obtención de papel, recubrimientos, empaques y fibras para la industria textil (Carrillo-González y Torres-Bustillos, 2019).

### 2.1.2 Hemicelulosa

El segundo polímero más abundante es la hemicelulosa constituye alrededor del 15 al 35% de peso seco en las paredes celulares vegetales, recubriendo la superficie de las fibras de celulosa y permitiendo el enlace de pectina (Watanabe y Tokuda, 2010), Figura 2.3.



**Figura 2.3** Representación gráfica de la estructura molecular del xilano, una hemicelulosa

Fuente: Yikrazuul [Public domain] vía Wikimedia Commons.

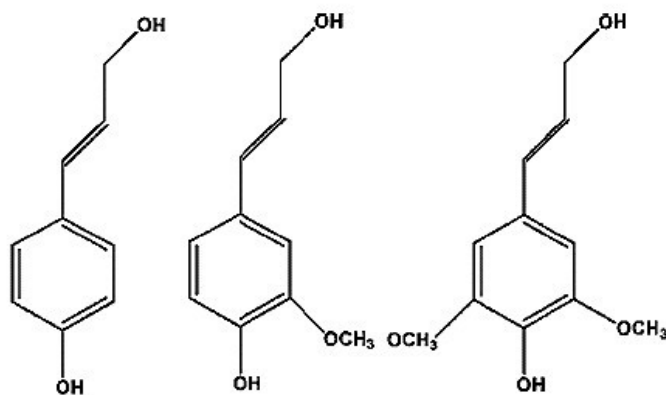
<https://www.lifeder.com/hemicelulosa/>

La hemicelulosa está constituida por heteropolisacáridos, es decir, polisacárido compuesto por más de un monómero, unidos por enlaces  $\beta$ -(1,4) glucosídicos fundamentalmente xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico, que forman una cadena lineal ramificada (Shallom y Shoham, 2003).

Algunos ejemplos de las aplicaciones son los galactomananos de la hemicelulosa, que son biopolímeros del tipo polisacárido formados por un esqueleto de manosa con ramificaciones formadas por unidades de galactosa. Los galactomananos forman hidrocoloides, que se utilizan como gomas para estabilizar emulsiones en la industria farmacéutica, en aplicaciones biomédicas y en la industria cosmética. Con la hemicelulosa y ácido acrílico se han preparado hidrogeles (Carrillo-González y Torres-Bustillos, 2019).

### 2.1.3 Lignina

El tercer polímero más abundante es la lignina, que está formada por polímeros aromáticos amorfos, varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), (Grabber, 2005), Figuras 2.4 y 2.5.



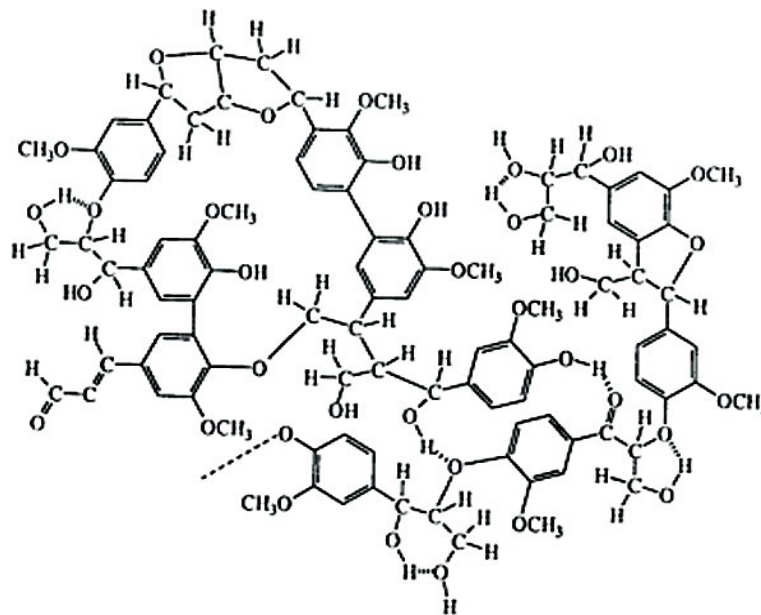
**Figura 2.4** Monómeros de la lignina, cumarílico izquierda, coniferílico centro y sinapílico derecha.

Fuente:[https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Monómeros-de-la-lignina-Deizquierdaa-la-derecha-se-observa-el-alcohol\\_fig4\\_322896144](https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Monómeros-de-la-lignina-Deizquierdaa-la-derecha-se-observa-el-alcohol_fig4_322896144).

La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular. En la pared celular vegetal estos compuestos constituyen entre 18 y 35 % de peso seco, este porcentaje juega un papel importante en la lignificación de la pared celular vegetal. La lignina es particularmente importante en la formación de las paredes celulares, especialmente en la madera y la corteza, ya que presentan rigidez y es recalcitrante.

El aprovechamiento de la lignina ha sido para: inmovilizar lipasas de *Aspergillus niger* Tieg (Eurotiales, Trichocomaceae); como estabilizante para la foto-degradación y la termooxidación

de materiales; también se ha obtenido materiales termoplásticos. En las posibles aplicaciones, la lignina, en el área biomédica es desde andamios hasta el uso de nanopartículas de lignina con capacidad de anti proliferación de células cancerígenas para la liberación de fármacos (Carrillo-González y Torres-Bustillos, 2019).

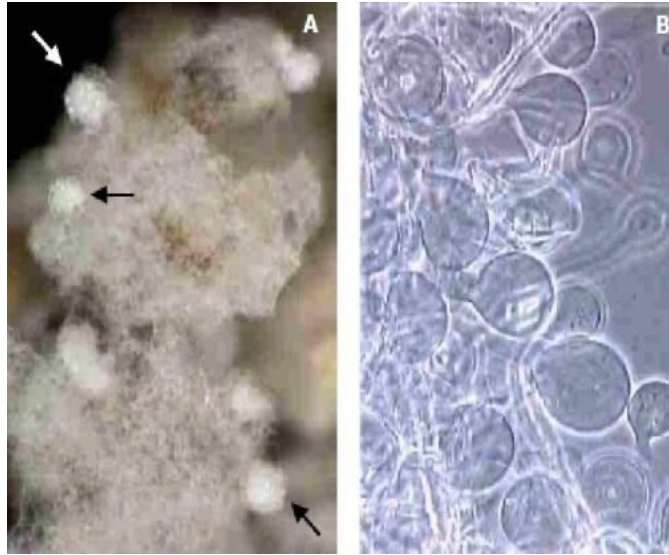


**Figura 2.5** Estructura propuesta del polímero de la lignina.

Fuente: [https://www.researchgate.net/figure/Estructura-de-la-Lignina\\_fig6\\_327097549](https://www.researchgate.net/figure/Estructura-de-la-Lignina_fig6_327097549)

## 2.2 Hormigas cortadoras de hojas

En la naturaleza las hormigas cortadoras de hojas han aprovechado la capacidad que tiene el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales, Agaricaceae) para hidrolizar los polímeros vegetales, liberar azúcares y acumular una parte como glucógeno en sus nódulos hifales llamados gongylidia, las cuales son el alimento de las hormigas (Aylward et al., 2012; De Fine et al., 2014), Figura 2.6.



**Figura 2.6** Micrografías de gongylidia de *L. gongylophorus*. En las gongylidia contienen la mayor cantidad de enzimas. (A) gongylidia (aumento de 50×) (B) Cada esfera corresponde a un gongylium (aumento de 1000×). Fuente: Schneider y Odair, 2003.

Fuente: <https://www.intechopen.com/books/insecticides-development-of-safer-ymore-effective-technologies/plant-derived-products-for-leaf-cutting-ants-control>

En los bosques neotropicales existen las hormigas cortadoras de hojas, *Atta* y *Acromyrmex*.

La población de hormigas se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina en nidos subterráneos donde construyen cámaras y cultivan a *L. gongylophorus*. Las hormigas del género *Atta* son reconocidas por formar largas filas de individuos que transportan pedazos de vegetales. Las especies *Atta mexicana* Smith (Himenoptera, Formicidae), *A. cephalotes* Linnaeus (Himenoptera, Formicidae) y *A. texana* Buckley (Himenoptera, Formicidae) habitan en México (Mueller et al., 2011).

### 2.3 Selección de hojas por las hormigas

Existen hormigas que seleccionan defoliar las dicotiledóneas, por ejemplo, las especies *A. mexicana*, *A. cephalotes*, *A. sexdens* Linnaeus (Himenoptera, Formicidae), *A. colombica* Guérin-

Méneville (Himenoptera, Formicidae) y *A. laevigata* Smith (Himenoptera, Formicidae) (Caldato et al., 2016). En contraste existen hormigas cortadoras de hojas que se les llama hormigas cortadoras de pasto, la *A. capiguara* Goncalves (Himenoptera, Formicidae), que recolecta exclusivamente monocotiledóneas (Moreira et al., 2004), Figura 2.7.



**Figura 2.7** Hormiga *Atta capiguara* que cortó y acarrea pasto.

Fuente: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8738/1/3933bel.pdf>

Cuando exfolian dicotiledóneas permiten el paso de la luz para que las otras plantas, principalmente monocotiledóneas, lleven a cabo el proceso de fotosíntesis. Disminuyendo la competencia por la luz solar, en los bosques húmedos y tropicales, lo cual promueve mayor biodiversidad de plantas (Ruiz, 2010).

#### **2.4 Jardín del hongo**

El material que cosechan las hormigas lo utilizan para cultivar al hongo basidiomiceto *L. gongylophorus*, con el cual han establecido una simbiosis. Al lugar donde se encuentran las hormigas y el hongo se le llama “el jardín del hongo”, el cual puede localizarse en una de las



cámaras del nido, Figura 2.8. En estos jardines del hongo se encuentran comunidades especializadas que constan de hongos, bacterias y hormigas (Aylward et al., 2012).



**Figura 2.8** Jardín del hongo y diagrama donde se muestra el cultivo del hongo, *L. gongylophorus*, por la hormiga cortadora de hojas. Primero, la hormiga corta y acarrea la hoja al nido, para colocarla sobre el hongo, donde la hormiga mastica la hoja y posteriormente deposita gotitas fecales.

Fuente: <https://www.pnas.org/content/110/2/583/tab-figures-data>

En un jardín del hongo *L. gongylophorus* tiene una forma que se asemeja a una esponja, donde hay un soporte el cual sirve a su vez de sustrato, las hormigas apilan las hojas formando una estructura con canales que permite el intercambio gaseoso, como se muestra en la Figura 2.9.

En sus nidos construyen canales que permiten el flujo de aire a fin de mantener el intercambio de gases y para mantener la temperatura entre  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  (Seipke et al., 2011). En la Figura 2.10 se muestra un nido de las hormigas cortadoras de hojas *Atta leavigata* en Brasil. El nido lo rellenaron con cemento para conocer las dimensiones de un nido de las hormigas cortadoras de hojas. Requirieron aproximadamente 6,300 kilogramos de cemento y 8,200 litros de agua.

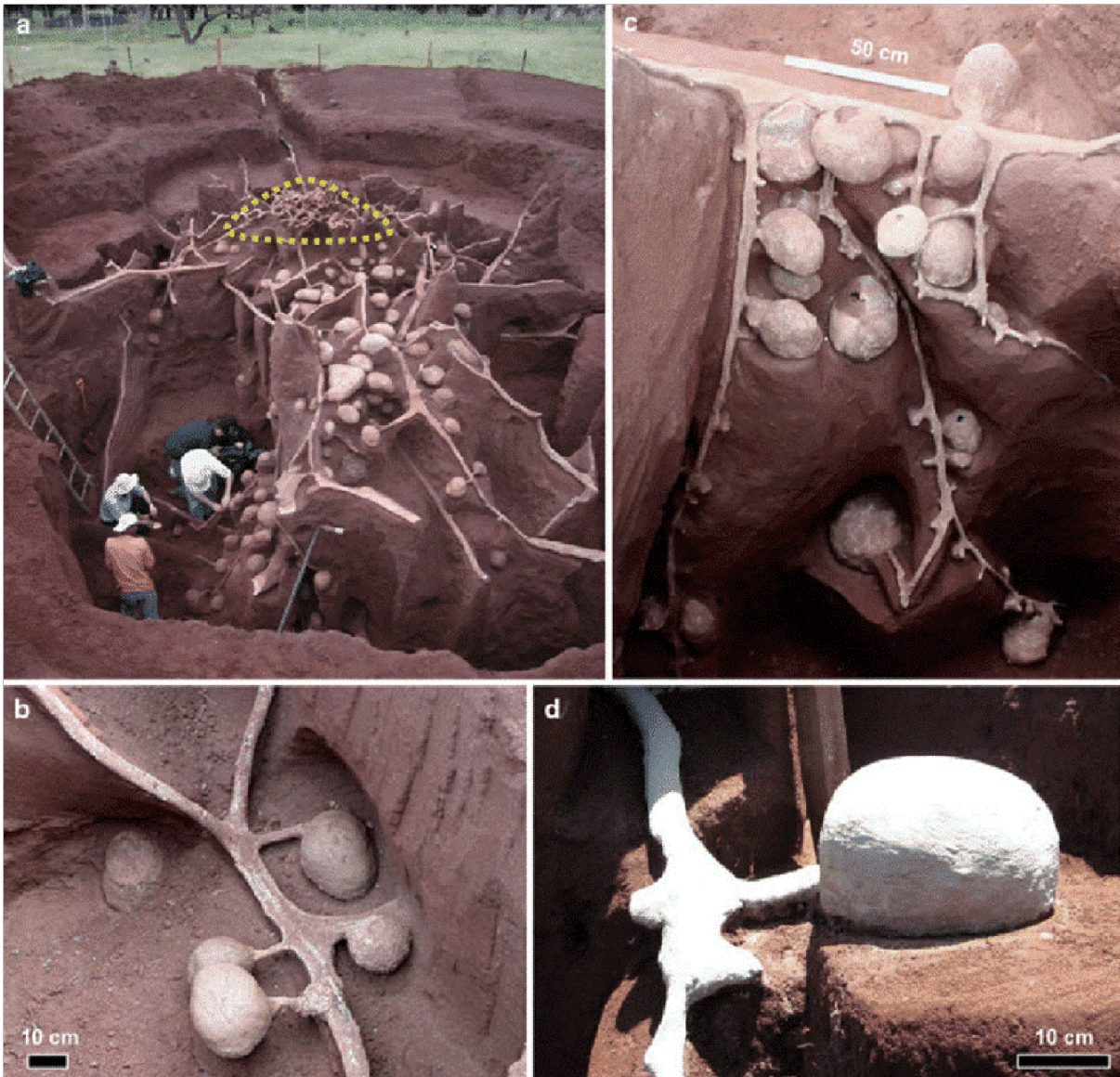
Encontraron que en las cámaras podrían contener al hongo *L gongylophorus*, desechos o incluso podrían estar desocupadas.



**Figura 2.9** Jardín del hongo de las hormigas *Atta cephalotes*, con su hormiga reina.

Fuente:<https://www.antshop.at/shop/en/ants/Ants-from-America/Atta-cephalotes-bicolor-.html>

En el área del nido, la actividad de las hormigas beneficia el ambiente, por lo que se consideran mejores que los gusanos y lombrices de tierra. En el suelo aceleran el ciclo de nutrientes por la alta porosidad (Whitford y Eldridge, 2013). Tanto las colonias que mueren como los nidos abandonados proporcionan cambios físico-químicos al suelo, incrementando porosidad y densidad, Figura 2.10, que consecuentemente coadyuvan en la regeneración de los bosques (Farji-Brener e Illes, 2000).



**Figura 2.10** Nido de hormigas cortadoras de hojas *Atta leavigata* donde rellenaron los túneles con 6,300 Kg de cemento, (a) Nido de hormiga (b) y (c) cámaras de los nidos y sus túneles (d) cámara que puede ser para: desechos, jardín del hongo o vacía. Nido moldeado y excavado por M. Bollazzi, S. Moreira, F. Roces, L.C. Forti y asistentes.

Fuente: [https://www.researchgate.net/figure/Cement-casts-of-Atta-leavigata-nests-aOverview-of-the-excavation-of-a-large-nest-The\\_fig5\\_257320036](https://www.researchgate.net/figure/Cement-casts-of-Atta-leavigata-nests-aOverview-of-the-excavation-of-a-large-nest-The_fig5_257320036)

## 2.5 Mutualismo obligado hormiga-hongo

Para la creación de un nuevo nido, las hembras aladas recogen un fragmento del micelio, perteneciente al hongo *L. gongylophorus*, de su colonia madre. Este fragmento se transporta con sus estructuras bucales especializadas llamadas micangios. Posteriormente, la hembra y los



machos alados (la única casta alada) abandonan el nido para aparearse y crear su nuevo nido mediante el proceso de fertilización conocido como vuelo nupcial. Este vuelo se sincroniza con la temporada de lluvias para que la humedad del suelo aumente y pueda ablandarse, permitiendo a las reinas fertilizadas cavar un pequeño túnel en la tierra. En dicho túnel es donde pierden las alas y comienzan la construcción de la cámara del claustro, donde depositan el fragmento del micelio. El hongo es cultivado y mantenido por la reina usando sus excrementos hasta el nacimiento de las primeras obreras, las cuales emergen y comienzan a buscar alimento (Holldobler y Wilson, 1990). El hongo permanece en una fase asexual mientras crece en una masa fúngica llamada bromatia (Fisher et al., 1994), Figura 2.11.



**Figura 2.11** El desarrollo de una colonia de *Atta mexicana* en condiciones de laboratorio. a) Hormiga reina; b) Nacimiento de las primeras obreras y jardín del hongo de *Leucoagaricus gongylophorus*; c) Jardín del hongo con diferentes estratos.

(Fuente: Fotos Infante-Rodríguez et al., 2020).

Los hongos cultivados por hormigas sirven principalmente como fuente de alimento para las larvas y sus reinas. Por otro lado, las obreras obtienen nutrientes de diversas fuentes, como la savia contenida en el material vegetal que forrajejan, los esporocarpos de otros hongos, tejidos de insectos y tejidos de animales vivos (Currie, 2001; De Fine Licht y Boomsma 2010; Lachaud et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, *L. gongylophorus* es cultivado por las hormigas en el nido y permanece en una fase asexual. Sin embargo, cuando muere la reina y / o se pierden las obreras asignadas para cultivar el hongo, *L. gongylophorus* puede producir esporocarpos (estructuras reproductivas sexuales). En cambio, las esporas producidas no se encuentran viables, lo que implica que existe una transmisión clonal del hongo entre los hormigueros; por lo que se ha sugerido que el hongo ha perdido su capacidad de sobrevivir por sí solo en la naturaleza (Fisher et al., 1994). El jardín del hongo sostiene a la colonia y alberga principalmente a las larvas y pupas; por lo que se sugiere que el hongo simbiote es monofilético (Lugo et al., 2013). El término monofilético abarca a todos los organismos descendientes de un mismo ancestro (Vanderlaan et al., 2013).

Los hongos aislados e identificados de nidos en diferentes especies de *Atta* y *Acromyrmex* son cepas de *L. gongylophorus* (Möller) Singer, una especie de hongo perteneciente a la familia Agaricaceae [Basidiomycota: Agaricales] (Silva-et al., 2006). Además, tanto los basidiocarpos como el análisis filogenético de las cepas obtenidas de los nidos demuestran que el hongo es una sola especie que ha co-evolucionado con la hormiga cortadora de hojas (Lugo et al., 2013), interacción que se ha descrito como una relación simbiótica mutualista obligada (Infante-Rodríguez et al., 2020).

En la relación simbiótica de las hormigas y el hongo se observó por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) que *L. gongylophorus* accede al tejido vegetal, lo hace por medio de sus hifas a través de los bordes expuestos que se generan durante el corte de hojas, cuando las hormigas cortan al masticarlas (Erthal et al., 2009).

## 2.6 Organismos asociados con el jardín del hongo

Varios estudios han demostrado que las hormigas cortadoras de hojas crean condiciones de microclima en sus nidos a nivel homeostático para cultivar eficazmente al hongo simbiote. Esto a su vez influye indirectamente en una gran variedad de organismos oportunistas que ocupan los nidos en diferentes estratos a lo largo del gradiente vertical. Por ejemplo, existen organismos que utilizan jardines del hongos, escombros, galerías, cavidades vacías o estratos intermedios que se asemejan tanto a los escombros como a las características de los jardines del hongo (Moser, 1963).

Independientemente del sustrato utilizado, los nidos de las hormigas cortadoras de hojas forman un ambiente de alta complejidad que permite el establecimiento de una gran cantidad de organismos asociados. Por ejemplo, dentro de los nidos se han reportado varios taxones de invertebrados con al menos 80 especies de artrópodos asociados (Dash et al., 2005; Barnett et al., 2013). Esto incluye cucarachas (como *Attaphila fungicola* Wheeler (Insecta, Blattodea) (Waller y Moser, 1990), moscas (como *Pholeomyia texensis* Wheeler (Blattodea, Blaberoidea)) y una variedad de insectos de los órdenes: Diptera, Orthoptera y Coleoptera (Moser, 1963; Waller 1980; Waller y Moser, 1990).

Es común observar que los organismos asociados utilizan los nidos de hormigas cortadoras de hojas para la oviposición, tal es el caso de diversas especies de serpientes de los géneros *Liotyphlops*, *Lampropeltis*, (Bruner et al., 2012; Rodriguez et al., 2015), *Leptodeira* y *Stenorrhina* (Velásquez-Múnica et al., 2008; Baer et al., 2009; Quevedo-Hidalgo et al., 2015) y *Amphisbaena* (Campos et al., 2013). Además, estos nidos se utilizan comúnmente como áreas de

refugio de las fuertes lluvias por culebrilla ciega (*Amphisbaenia*) (Stahel y Geijskes, 1939), y anfibios de la familia *Leotodactylidae* han sido ampliamente reportados en nidos de *A. cephalotes* en Perú (Schüter y Regös, 1981). Las formas en que estas asociaciones pasan desapercibidas por organismos tan territoriales como las hormigas cortadoras de hojas aún no han sido completamente comprendidas. Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que los organismos que ingresan a los nidos logran absorber el olor del nido antes de su ingreso, lo que les permite de esta manera imitar los químicos de las hormigas cortadoras de hojas (Campos et al., 2014).

En los nidos de las hormigas cortadoras de hojas también se encuentran microorganismos, principalmente en los jardines del hongo. Estos microorganismos son las bacterias actinomicetos, que producen antibióticos para proteger al hongo de la amenaza de otros microorganismos (Taerum, Cafaro, Little, Schultz y Currie, 2007). Las *Pseudonocardia* sp., *Streptomyces* sp. y *Amycolatopsis* sp., han sido los más investigados y están asociados con las hormigas. Por ejemplo, el género más destacado e identificado en el jardín del hongo de las colonias de *A. sexdens rubropilosa* son *Streptomyces* sp., su propiedad más notable es la producción de antibióticos polipeptídicos, dañinos para el parásito *Escovopsis* sp. y tomando en cuenta la limpieza que realizan las hormigas, en conjunto, permiten el mantenimiento de las condiciones asépticas, es decir, evitan la proliferación de otros microorganismos oportunistas y patógenos (Seipke et al., 2011).

Además, *Streptomyces* sp. sintetiza tanto el antibiótico Actinomicina D (que es el principio activo de un fármaco utilizado en quimioterapia exclusivamente para la terapia del cáncer) (Batey et al., 2020) como el antibiótico Candicidin D (que se utiliza para tratar la candidiasis) (Aylward et al., 2012).

Por otro lado, *Pseudonocardia* sp. ha mostrado una actividad antifúngica relativamente débil ya que producen un antifúngico poliénico llamado nistatina P1, así como otro antifúngico denominado dentigerumicina (Barke et al., 2010).

Los *Amycolatopsis* sp. sintetizan fármacos como rifampicina y vancomicina, ambos bactericidas. Además los *Amycolatopsis* sp. se han encontrado en la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas, (Barke, Seipke, Yu y Hutchings, 2011). Igualmente, en el jardín de hongo se ha identificado que el sustrato vegetal que colocan las hormigas en la parte superior del hongo crea un gradiente vertical de degradación de la biomasa denominado estrato superior, medio e inferior. En el estrato medio, se produce la mayor tasa de fijación de nitrógeno, debido a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Klebsiella* sp. y *Pantoea* sp. (Pinto-Tomás et al., 2009).

## **2.7 Compuestos orgánicos volátiles**

En algunas especies de *Atta*, se ha informado que las secreciones de las hormigas a través de sus glándulas metapleurales contienen sustancias antimicrobianas que también pueden proteger al jardín del hongo. Se han identificado los principales componentes de las sustancias antimicrobianas (citril, 4-metil-3-heptanol, 2-heptanona, 3-octanona, 4-metil-2-heptanona, b-citronelol, geraniol, fenilacético, indolacético, hexanoico y octanoico), contra patógenos humanos (*Escherichia coli* Migula (Gammaproteobacteria, Proteobacteria), *Staphylococcus aureus* Rosenbach (Bacillales, Bacilli) y *Candida albicans* Robin (Ascomycota, Saccharomycetaceae)). De éstos compuestos demostraron resultados más efectivos,



particularmente contra *C. albicans*, fueron citral, geraniol, 4-metil-3-heptanol, hexanoico y octanoico (Mendonça et al., 2009).

## **2.8 Capacidad metabólica del hongo**

Es importante mencionar que existe cierta controversia en cuanto a la capacidad que tiene *L. gongylophorus* para degradar los complejos lignocelulósicos. Algunos autores sugieren que las levaduras y bacterias que residen en la simbiosis hongo-hormiga pueden contribuir a la degradación de los complejos lignocelulósicos (Richard et al., 2005; Silva et al., 2006; Lange y Grell, 2014), y otros autores reportan que el hongo es incapaz de metabolizar celulosa y lignina (Abril y Bucher, 2002). En cambio, Sánchez (2009) reportó que *L. gongylophorus* tiene un eficiente sistema enzimático extracelular formado por hidrolasas. Cuando se reportó el primer borrador del genoma de *L. gongylophorus*, simbionte de *Atta cephalotes* originaria de Panamá, encontraron 145 lignocelulasas, incluyendo celulasas, xilanasas, lacasas, endogalactanasa, pectinasas y arabinofuranosidasa (Bacci et al., 1995; Sánchez, 2009; Aylward et al., 2012). Lo cual muestra el potencial que puede tener el hongo para aplicaciones biotecnológicas, tales como, el ablandamiento de residuos lignocelulósicos o como fuente de enzimas lignocelulolíticas.

## **2.9 Actividades enzimáticas**

Las celulasas son un conjunto de enzimas que hidrolizan la celulosa y con base al tipo de reacción que catalizan, se clasifican en: endocelulasas (rompen las interacciones no covalentes de la estructura amorfa de la celulosa); exocelulasas (hidrolizan los extremos de las cadenas rompiendo el polímero en azúcares más pequeños) y  $\beta$ - glucosidasas (hidrolizan disacáridos y tetrasacáridos, liberando los monómeros de glucosa). La familia de enzimas con actividad sobre carbohidratos complejos se conoce como CAZymes (CarbohydrateActive Enzymes), estas

enzimas están involucradas en la biosíntesis, catabolismo y transporte de carbohidratos, entre ellas se encuentran las glucosidasas, xilanasas, amilasas, pectinasas, xilosidasas y ramnosidasas. En cuanto a la degradación de lignina se encuentran las enzimas con actividad lignina oxidasa (LO) y auxiliares en la degradación de lignina (LDA), las cuales en conjunto se conocen como FOLymes (Fungal Oxidative Lignin Enzymes), entre las que se encuentran lacasas, peroxidadas, celobiosa deshidrogenasas, glicosil transferasas, carbohidratos esterasas. En la oxidación de la lignina también están involucrados algunos metabolitos de bajo peso molecular producidos por los hongos, los cuales se conocen como mediadores redox, entre los que hay ácidos orgánicos, ácidos grasos, fenoles, quinonas y otros compuestos aromáticos (alcohol veratrílico, anisilo y alcoholes anisilo clorados) (Camarero et al., 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El hongo *L. gongylophorus* vive en simbiosis con las hormigas cortadoras de hojas de la tribu Attini; sin embargo, esta investigación se enfocó en estudiar el hongo de las hormigas: *Atta mexicana*. En la simbiosis, las hormigas cortan, colectan y trasladan hojas frescas a su nido, donde cultivan y mantienen al *L. gongylophorus*. Al lugar donde se encuentran las hormigas y el hongo se le llama jardín del hongo. En esta relación simbiótica, ocurren varios acontecimientos: primero, las hormigas acarrear el material vegetal al jardín del hongo; posteriormente, lo mastican y lo colocan sobre el hongo; finalmente, depositan gotas fecales sobre el cultivo y adicionan, de esta manera, enzimas que ayudan a la biodegradación del material vegetal. Al cultivar al *L. gongylophorus*, se tiene una fuente de enzimas que degradan los polímeros vegetales y liberan azúcares, de los cuales una fracción es utilizada por el mismo hongo para satisfacer sus requerimientos energéticos, mientras que otra fracción es acumulada en forma de glucógeno dentro de unas estructuras globulares llamadas gongylidia, las cuales sirven de alimento a las hormigas (Mikheyev y col. 2007). Por otra parte, existe controversia respecto a la capacidad del *L. gongylophorus* de degradar los sustratos lignocelulósicos en ausencia de las hormigas. En un estudio de laboratorio investigadores cultivaron *L. gongylophorus* aislado al cual proporcionaron como fuente de carbono celulosa o lignina, reportando que el hongo es incapaz de metabolizarlos (Abril y Bucher, 2002). En cambio, otras investigaciones reportan que el jardín del hongo, tiene un eficiente sistema enzimático formado por hidrolasas (Erthal et al., 2009). Como se puede observar, en la literatura existen varios reportes sobre las actividades enzimáticas, secuencias de genes y proteínas de *L. gongylophorus* (De Fine y Boomsma, 2010; Aylward et al., 2013).

No obstante, aún no se conocen todas sus capacidades metabólicas; prueba de esto es el hecho de que actualmente se encuentra en la base de datos del NCBI para *L. gongylophorus* 1 genoma, 2 ensamblajes, 23, 990 secuencias de nucleótidos y 143 secuencias de proteínas, mientras que para

*A. niger* se encuentran 1 genoma, 22 ensamblados, 83,733 secuencias de nucleótidos y 180,330 secuencias de proteínas. Por último, se cuenta con poca información sobre las actividades enzimáticas de *L. gongylophorus* aislado, y se sabe que existen pocos datos cinéticos de *L. gongylophorus* en cultivo sumergido y de estado sólido usando sustratos lignocelulósicos. De ahí, la importancia de realizar la presente investigación en el laboratorio con *L. gongylophorus* el hongo simbiote de *A. mexicana* con el fin de conocer, resguardar y, en su caso, aprovecharlo para futuras aplicaciones biotecnológicas.

## 4. HIPÓTESIS

Cuando el hongo basidiomiceto *L. gongylophorus* se cultiva sin hormigas usando sustratos lignocelulósicos, bajo condiciones similares a las que se tienen en el jardín del hongo, se induce el crecimiento del hongo y la producción de enzimas hidrolíticas y oxidasas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento de *L. gongylophorus* en sustratos lignocelulósicos en cultivo sólido y en cultivo sumergido, detectando actividades enzimáticas, identificando compuestos orgánicos volátiles que se producen durante la degradación de estos sustratos y la observación de su morfología.

### 5.2 Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento de *L. gongylophorus* a través de la cuantificación de CO<sub>2</sub> en cultivos sólido y líquido con sustratos lignocelulósicos; determinar las actividades endoglucanasa, xilanasas y lacasa; y estudiar la morfología por microscopía, para observar su desarrollo en residuos lignocelulósicos, sus parámetros cinéticos y la detección de enzimas.
- Obtener perfiles de proteínas secretadas por *L. gongylophorus* durante la degradación de sustratos modelo para mostrar las diferentes proteínas cuando el hongo crece con diferentes tipos de sustrato.
- Analizar los compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo para identificar metabolitos involucrados en la degradación de sustratos lignocelulósicos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepa fúngica**

*Leucoagaricus gongylophorus* LEU18496 (GenBank: KJ419350.1), fue aislado del nido de hormigas cortadoras de hojas *Atta mexicana*, Coatepec-México. La cepa fue propagada en agar extracto de malta (MEA-LP) (Miyashira et al., 2010), conteniendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): extracto de malta 20; peptona bacteriológica 5; extracto de levadura 2; y agar 20; el pH fue ajustado a 5.0 y el medio de cultivo fue esterilizado ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 psi durante 15 min). Los cultivos fueron incubados a  $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ., durante el tiempo correspondiente de cada experimento. Una suspensión de hongo se obtuvo añadiendo unos mililitros de medio mineral y raspando la superficie del agar con perlas de vidrio.

La biomasa presente en la suspensión de hongo se determinó como peso seco y proteína total por el método de Bradford (1976). La suspensión de inóculo contenía  $\sim 30\text{ mg peso seco mL}^{-1}$  ( $\sim 4.8\text{ mg proteína mL}^{-1}$ ). La cepa se mantuvo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en tiras de papel de filtro empapadas con glicerol 20% (v/v) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vigueras et al., 2017).

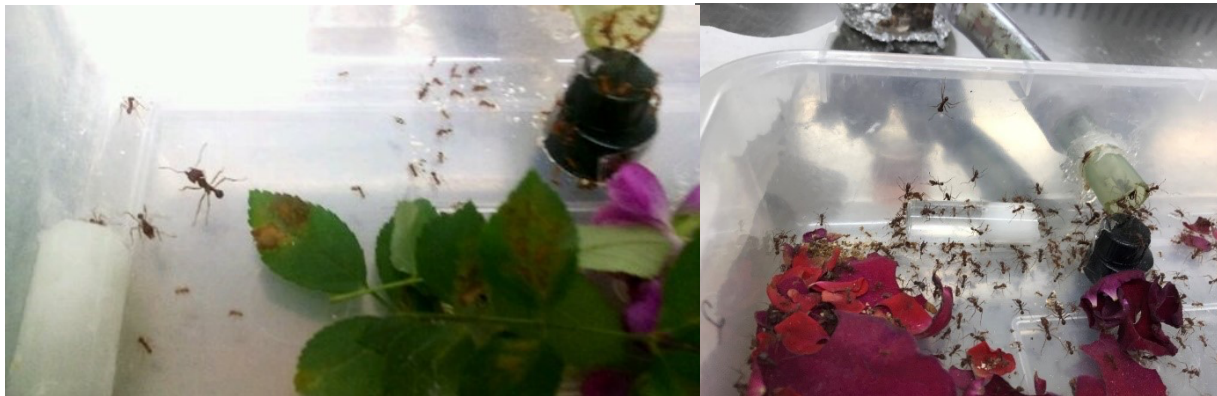
### **6.2 Mantenimiento del jardín del hongo**

El Instituto de Ecología (INECOL), Xalapa, Veracruz, México, proporcionó minicolonias de ca. 650 hormigas de *A. mexicana* sin reina con  $\sim 10\text{ g}$  de jardín del hongo. Las colonias se les proporcionó hojas de rosal o pétalos de rosa dos veces por semana y viales con algodón empapado en agua. Las minicolonias se mantuvieron en una cámara a  $26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 70 % de humedad relativa, con periodos de luz oscuridad de 12 h. El jardín del hongo se mantuvo en la oscuridad dentro de un recipiente de 250 mL. Este fue conectado a través de un tubo de plástico al área de forrajeo,

Figura 6.12. Durante la limpieza del área de forrajeo se untaba talco simple (silicato de magnesio hidratado) en los bordes del recipiente, para que las hormigas resbalen y se mantengan dentro del recipiente, Figura 6.13. El contenedor del jardín del hongo fue cerrado con una tapa de Nylamid® adaptada con una válvula mininert para tomar muestras de gas con una jeringa de precisión (VICI Precision Sampling).



**Figura 6.12** Jardín del hongo de la hormiga *Atta mexicana* en un recipiente de 250 mL, conectado al área forrajeo con válvula mininert para el monitoreo del CO<sub>2</sub>.



**Figura 6.13** Áreas de forrajeo con hormigas *Atta mexicana*, el agua se proporciona con un vial con algodón humedecido, usando como sustrato hojas y pétalos de rosa.

### **6.3 Medio mineral definido**

El medio mineral contenía (g L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5; Urea 0.3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2; CaCl<sub>2</sub> ·2H<sub>2</sub>O 0.36; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3; CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25; y 4 mL/L de solución de elementos traza conteniendo (g L<sup>-1</sup>): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.015; MnSO<sub>4</sub> 0.012; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.013; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0023 y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0015. El pH se ajustó a 5.0 y el medio mineral fue esterilizado.

### **6.4 Medio YNB**

Se utilizó medio YNB base de nitrógeno sin aminoácidos (Difco 291940) composición (μg L<sup>-1</sup>): biotina 2; polifosfato de calcio 400; ácido fólico 2; niacina 400; ácido p-aminobenzoico 200; piridoxina HCl 400; riboflavina 200; tiamina HCl 400; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 500; CuSO<sub>4</sub> 40; KI 100; FeCl<sub>3</sub> 200; MnSO<sub>4</sub> 400; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 200; ZnSO<sub>4</sub> 400; 2 mg/L de inositol; y en (g L<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub> 0.5; NaCl 0.1; CaCl<sub>2</sub> 0.1. La fuente de nitrógeno fue (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en una concentración de 4.6 g/L. Con pH 5.3

### **6.5 Medición de CO<sub>2</sub> por cromatografía de gases**

La concentración de CO<sub>2</sub> se determinó en un cromatógrafo de gases (Gow-Mac series 580) equipado con un detector de conductividad térmica y columna concéntrica CTR1 (Altech). Las condiciones de funcionamiento fueron inyector 50 °C, horno 40 °C, detector 115 °C, usando como gas acarreador helio con flujo de 4.4 mL/min. La inyección fue de 100 μL obtenida con una jeringa de precisión (VICI Precision Sampling). El análisis se realizó por triplicado, se muestreó cada tercer día.



## **6.6 Microscopía óptica y electrónica de barrido ambiental (MEBA)**

Las micrografías fueron adquiridas con un microscopio óptico (Carl Zeiss) equipado con una cámara digital (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss) y software Zeiss-Zen 2.0. Además, se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, Philips XL30) trabajando en modo ambiental. Las imágenes fueron tomadas con detector de electrones retrodispersados y con electrones secundarios, el valor en torr corresponde a la presión en el área de la muestra.

## **6.7 Análisis elemental por microscopía electrónica de barrido de doble haz (SEM-FIB)**

Microscopio Electrónico de Barrido de Doble Haz, un Haz de Electrones y un Haz de Iones Focalizado (SEM-FIB) Nova-200 Nanolab con Filamento de Emisión de Campo (FEG), con un rango de amplificación de 30× a 1,250,000× y una resolución de 1.1 nm. Acoplado a un Espectrómetro de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDS), con una ventana ultrafina de rayos X Si (Li) para detectar elementos desde el berilio en adelante. Se realizó el análisis elemental del jardín del hongo y del *L. gongylophorus* aislado con 4 muestras de cada uno. Posteriormente se llevó a cabo el análisis estadístico donde se identificaron las diferencias significativas entre el *L. gongylophorus* aislado y el jardín del hongo, se utilizaron las pruebas de Shapiro, t-student, Wilcoxon y con un nivel de significancia de 0.05 con el programa R, versión 4.0.5.

## **6.8 *Leucoagaricus. gongylophorus* creciendo en sustratos lavados o esterilizados observado por MEBA**

Los residuos lignocelulósicos, pasto (*Pennisetum clandestinum*) y bagazo de caña de azúcar, fueron lavados con detergente (Roma®) diluido (1:30), seguido por un enjuague exhaustivo con agua Milli-Q filtrada con 0.45µm, y finalmente fueron secados a 55 °C durante 12 h. Por otra

parte, fueron esterilizados una fracción de los residuos lignocelulósicos, además de hojas de rosal y bagazo de agave, usando calor húmedo en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 15psi. Se realizaron cultivos en cajas Petri usando medio mineral con agar (5 ml), con residuos lignocelulósicos (1.5 g) lavados o esterilizados e inoculados con el hongo *L. gongylophorus*. Los cultivos se incubaron a  $26 \pm 2$  °C durante 23 días. Se tomaron micrografías usando un microscopio electrónico de barrido ambiental.

### **6.9 Cultivo de sólido con residuos lignocelulógicos**

Se realizaron cultivos sólido en botellas de 0.5 L usando 4 g de pasto o bagazo de caña de azúcar humedecidos con 30 mL de medio mineral. Los cultivos se esterilizaron y posteriormente se inocularon con 5 mL de suspensión de la cepa fúngica (30 mg de peso seco mL<sup>-1</sup>). Todos los cultivos se incubaron en condiciones estáticas a  $26 \pm 2$  °C. La producción de CO<sub>2</sub> fue monitoreada con un sensor de gas infrarrojo BCP-CO<sub>2</sub> (BlueSens, Herte, Germany), con carcasa adaptada para conectar la botella de cultivo, la adquisición de datos se realizó cada 30 minutos utilizando el software FermVis®. La concentración de CO<sub>2</sub> se realizaron sin recambio de atmósfera gaseosa. Las concentraciones utilizadas en los perfiles de acumulación de CO<sub>2</sub> se graficaron y se ajustaron al modelo Gompertz. Los parámetros del modelo se calcularon utilizando el software OriginPro 8SR0. Estos experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

### **6.10 Cultivos sumergidos y de sólido con residuos lignocelulósicos y sustratos modelo**

El hongo fue cultivado en botellas serológicas de 125 mL selladas con septos de goma. El cultivo sumergido (CL) contenía 30 mL de medio de mineral y 1.2 g de pasto de jardín (*Pennisetum clandestinum*) o bagazo de caña de azúcar. Además, se realizaron CL con sustratos modelo, los

cultivos contenían 30 mL de medio mineral adicionados con 20 g L<sup>-1</sup> de CM-celulosa (CAS 9004-32-4), Xilano (CAS 9014-63-5) o Lignina (CAS 8068-05-1). Para los cultivos de sólido (CS), se mezclaron 5 mL de medio de mineral con 1.2 g de sustratos lignocelulósicos. El tamaño de las partículas del sustrato fue de alrededor de 1-2 mm de longitud (pasó a través de un tamiz de malla #10 y fue retenido por malla #20). El contenido inicial de humedad relativa fue del 70% (De Fine Licht et al.,2013). El pH del medio mineral se ajustó a 5.0. Los cultivos fueron esterilizados y posteriormente se inocularon con 1 mL de la suspensión de hongo (30 mg peso seco mL<sup>-1</sup>) para CS y 5 mL (6 mg peso seco mL<sup>-1</sup>) para CL, y todos los cultivos fueron incubaron a 26 ± 1 °C. Los CL fueron colocados en un agitador a 150 rpm y los CS se incubaron bajo condiciones estáticas. Los experimentos de control fueron preparados sin fuente de carbono. La concentración de CO<sub>2</sub> fue monitoreada por cromatografía de gases, sin recambio de atmósfera gaseosa. Todos los experimentos y mediciones fueron realizados por triplicado. Los perfiles de CO<sub>2</sub> se realizaron restando los valores obtenidos de los experimentos del control. La tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> fue calculada con el modelo integrado de Gompertz,  $V_{max} = 0.368 \alpha k$ , donde  $\alpha$  = concentración máxima de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>) y  $k$  = CO<sub>2</sub> constante de tasa de producción (días<sup>-1</sup>). Los parámetros del modelo se calcularon utilizando el software OriginPro 8SR0.

### **6.11 Ensayos de actividad endoglucanasa y xilanasa y cuantificación de CO<sub>2</sub>**

Las actividades de endoglucanasa y xilanasa se determinaron mediante halos de hidrólisis y ensayos enzimáticos espectrofotométricos. Los extractos enzimáticos fueron obtenidos como sigue: 0.1 g de CS liofilizado con bagazo de caña de azúcar (CS-bagazo), pasto (CS-pasto) o jardín del hongo, fueron reconstituidos en 1.5 mL de tampón de fosfatos 1M pH 6.5, las muestras

fueron homogeneizadas, seguido por centrifugación (7500g por 15 min a 4 °C). Los sobrenadantes (extracto enzimático) fueron usados para los ensayos enzimáticos.

El ensayo de halo de hidrólisis fue realizado como sigue, se colocaron 10 µL de extracto enzimático en placas Petri con agar y CM-celulosa o xilano conteniendo (por litro): 2 g de CM-celulosa o 2 g xilano, 15 g de agar; en tampón de fosfatos 1 M pH 6.8. Las placas Petri se incubaron a 40 °C en condiciones estáticas durante 12 h. Los halos de hidrolisis fueron revelados con solución de Lugol al 20 % (v/v).

En cambio, el ensayo enzimático espectrofotométrico fue realizado como sigue: se mezclaron 100 µL de extracto enzimático con 1000 µL de sustrato (2 g /L de CM-celulosa o xilano) en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.0 (PBS), se agregaron 2 mL de PBS y 2 mL de H<sub>2</sub>O desionizada, los tubos se incubaron a 40 °C durante 60 minutos, y los controles sin extracto enzimático o sustrato fueron también analizados. Los azúcares reductores se determinaron mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El contenido proteínico total de los extractos enzimáticos fue cuantificado mediante el método de Lowry (1951). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Las unidades de actividad enzimática, endoglucanasa y xilanasas, fueron definidas como la cantidad de enzima necesaria para liberar un umol de azúcar reductor por minuto (U) y la unidad enzimática específica (U mg proteína<sup>-1</sup>). Los ensayos enzimáticos por el método espectrofotométrico para la cuantificación de la actividad enzimática de endoglucanasa y

xilanasa y que después se compararon con los halos de hidrólisis se realizaron por triplicado. En cambio, para las cinéticas de producción de CO<sub>2</sub> (como los ensayos de la sección 6.5) y las actividades enzimáticas, se realizaron con medio YNB por duplicado y se realizaron muestreos destructivos cada 24 horas, durante 20 días.

### **6.12 Ensayo de actividad lacasa**

La actividad enzimática lacasa fue determinada por oxidación del ABTS (ácido 2, 2'-azinobis - 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). La mezcla de reacción para el ensayo ABTS contenía: 100 µL de ABTS (5 mM), 300 µL de tampón de acetato de sodio 0.1 M pH 4.0, y 600 µL de extracto enzimático (hongo-pasto y hongo-jardín). Esta reacción fue incubada por 10 min a 25 °C. La oxidación del ABTS fue determinada a 420 nm (coeficiente de extinción de ABTS oxidado, 20,300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Los ensayos fueron realizados por triplicado. Una unidad de actividad lacasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar un micromol de sustrato por minuto.

### **6.13 Identificación de compuestos orgánicos volátiles**

Se realizó la identificación de compuestos orgánicos volátiles (COV's) aplicando la técnica de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HS-SPME) y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Rojas-Flores et al., 2019). El muestreo se realizó usando fibras de carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR-PDMS, 75 µm, Supelco). La fibra fue acondicionada a 200 °C por 1 h en el inyector de un CG 7890B (Agilent Technologies). La extracción de los compuestos volátiles de las muestras (cultivos de 40 días, sección 6.9, hongo-pasto, hongo-bagazo y hongo-hoja de rosal) se realizó por HS-SPME, la fibra fue expuesta durante 30 min en el interior de los microcosmos los cuales fueron introducidos en un campo ultrasónico previamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. La desorción térmica de los

COV's adsorbidos en la fibra fue realizada a 200 °C (Saucedo-Lucero y Revah, 2018). En un cromatógrafo de gases Agilent (CG. 6850 N / VL MSD modelo 597B) acoplado al espectrómetro de masas (MS) (Agilent Technologies, EE. UU.). La separación se llevó a cabo en una columna capilar HP 5 (30 m x 0.30 mm y 1 mm de longitud, diámetro interno y espesor de película, Agilent Technologies), usando helio como gas acarreador a un flujo de 100 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del horno se mantuvo en 35 °C durante 25 minutos, y se incrementó hasta 80 °C a una tasa de 10 °C min<sup>-1</sup>, y finalmente se mantuvo durante 10 minutos. El inyector y el detector se mantuvieron a 200 °C y 220 °C, respectivamente. El helio se usó como portador de gas a una velocidad de flujo de 60-90 mL min<sup>-1</sup> (Rojas-Flores et al., 2019). El detector de masas se ajustó para realizar un barrido en el intervalo de 50 a 450 m/z (masa/carga). Para la identificación de los picos se utilizó la librería de espectros de masas NIST 05, sólo se consideraron como compuestos correctamente identificadas los espectros con una concordancia superior o igual al 80%.

#### **6.14 Perfiles de proteínas analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida**

A partir de 0.2 g de muestras liofilizadas del hongo creciendo en xilano o extracto de malta (control) se realizó la extracción de proteínas, a cada muestra se añadió 2 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.4 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M) con 0.07 % (p/v) de DTT y 2 uL de inhibidor de proteasas (P8215, Sigma-Aldrich). Posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. El sobrenadante fue concentrado en tubo Amicon con membrana de 3 kDa. El retenido fue colectado en microtubo de 1 mL y se adicionó 10µL de TCA al 20% (p/v) en acetona con 0.14 % (p/v) de DTT. Se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, sin agitar, se centrifugó a 5,000 rpm a 4 °C durante 15 min, cuando fue necesario se repitió este paso hasta observar el pellet. El pellet se lavó con 500 µL de acetona al 80 % (v/v) fría (mantenida a -20 °C) centrifugado a 10,000 rpm a 4 °C durante 15 min. Finalmente se dejó

secar la acetona en la campana de flujo laminar. El pellet fue rehidratado y solubilizado con 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de rehidratación/solubilización 4 % (p/v) CHAPS y 1.5 % (p/v) DTT. Posteriormente se agitó en vortex por 3 min, se sónico por 1 min, y nuevamente vortex durante 5 min. La proteína solubilizada se colectó en un microtubo. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se colectó para su posterior análisis por SDS-PAGE. Los perfiles de las proteínas fueron analizados con base a la masa molecular por SDS-PAGE utilizando la técnica de Laemmli, usando un gel al 12 % de poliacrilamida, y corriendo a 95 V durante 1.5 h. Los geles fueron visualizados con azul de Coomassie G-250 coloidal (BioRad). Las concentraciones de proteína cargada en el gel fueron 1.86  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para Xyl-Lg y 1.99  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para Malt-Lg. Las bandas fueron analizadas con un programa para el procesamiento de imágenes (ImageJ versión 1.47), utilizando un estándar de proteínas de pesos moleculares de amplio intervalo (Bio-Rad).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Mantenimiento del Jardín del hongo

Como primer resultado el jardín del hongo alcanzó un volumen de  $250 \text{ cm}^3$  en 160 días (Figura 7.14), mostrando una densidad aparente de  $0.8 \pm 0.07 \text{ g del jardín del hongo cm}^{-3}$ , lo cual corresponde a una tasa de crecimiento aproximada de  $1.5 \text{ cm}^3 \text{ día}^{-1}$ . La concentración promedio de  $\text{CO}_2$  en el jardín del hongo fue de  $1.5 \pm 0.1 \%$  (v/v) con recambio de aire cada vez que se aseaba y se colocaba sustrato fresco, pétalos y/o hojas de rosal. Asimismo, en la mini-colonia de hormigas, se constató que estas llevaban trozos de hojas y pétalos de rosa para hacer crecer el hongo. Sin embargo, cuando se colocó pasto o bagazo de caña en el área de forrajeo, las hormigas no llevaron estos materiales al jardín del hongo.



**Figura 7. 14** Crecimiento progresivo del jardín del hongo de una mini colonia con ca. 650 hormigas *Atta mexicana*, alcanzando un volumen de  $250 \text{ cm}^3$  en 160 días.



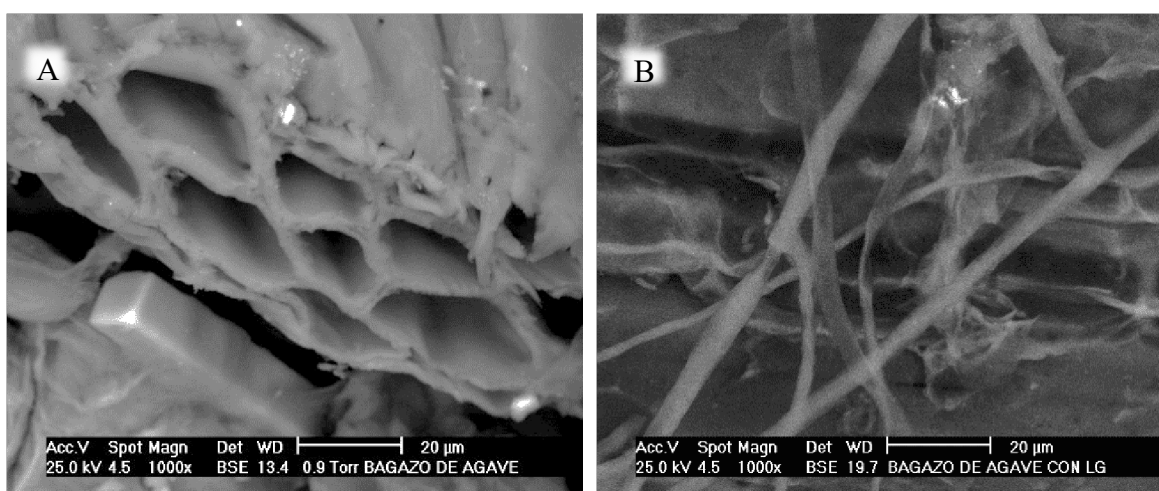
Cabe mencionar que existen hormigas cortadoras de pasto en la naturaleza, la especie *A. capiguara* recolecta pasto (exclusivamente monocotiledóneas), en contraste, las especies *A. mexicana*, *A. cephalotes*, *A. sexdens*, *A. colombica* y *A. laevigata* solo cosechan dicotiledóneas (Caldato et al., 2016). Kleineidam et al., (2000) reportaron que el jardín del hongo de una colonia de laboratorio de *A. sexdens* ocupó, en 3 años, un volumen de ca. 12 L. Las mini-colonias de *A. mexicana* que se utilizaron en nuestra investigación no tenían reinas y, en consecuencia, la duración de las mini-colonias fue alrededor de 5 meses.

Por otra parte, la respiración microbiana y de las hormigas dentro del nido de las hormigas u hormiguero se produjo un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub>, en este caso, fue alrededor del 1.5% (v/v), lo cual aproximadamente equivale a 300 veces el contenido de CO<sub>2</sub> atmosférico. En este sentido, Fernandez-Bou et al., (2019) reportaron que la concentración de CO<sub>2</sub> en un nido bien ventilado se encuentra entre 1-3 % (v/v); en cambio, los nidos grandes de hormigas cortadoras de hojas pueden alcanzar hasta 5.7 % (v/v), de CO<sub>2</sub> por lo cual las hormigas construyen canales de ventilación que aseguran el adecuado intercambio de gases.

## **7.2 *Leucoagaricus. gongylophorus* creciendo en sustratos lavados o esterilizados observado por MEBA**

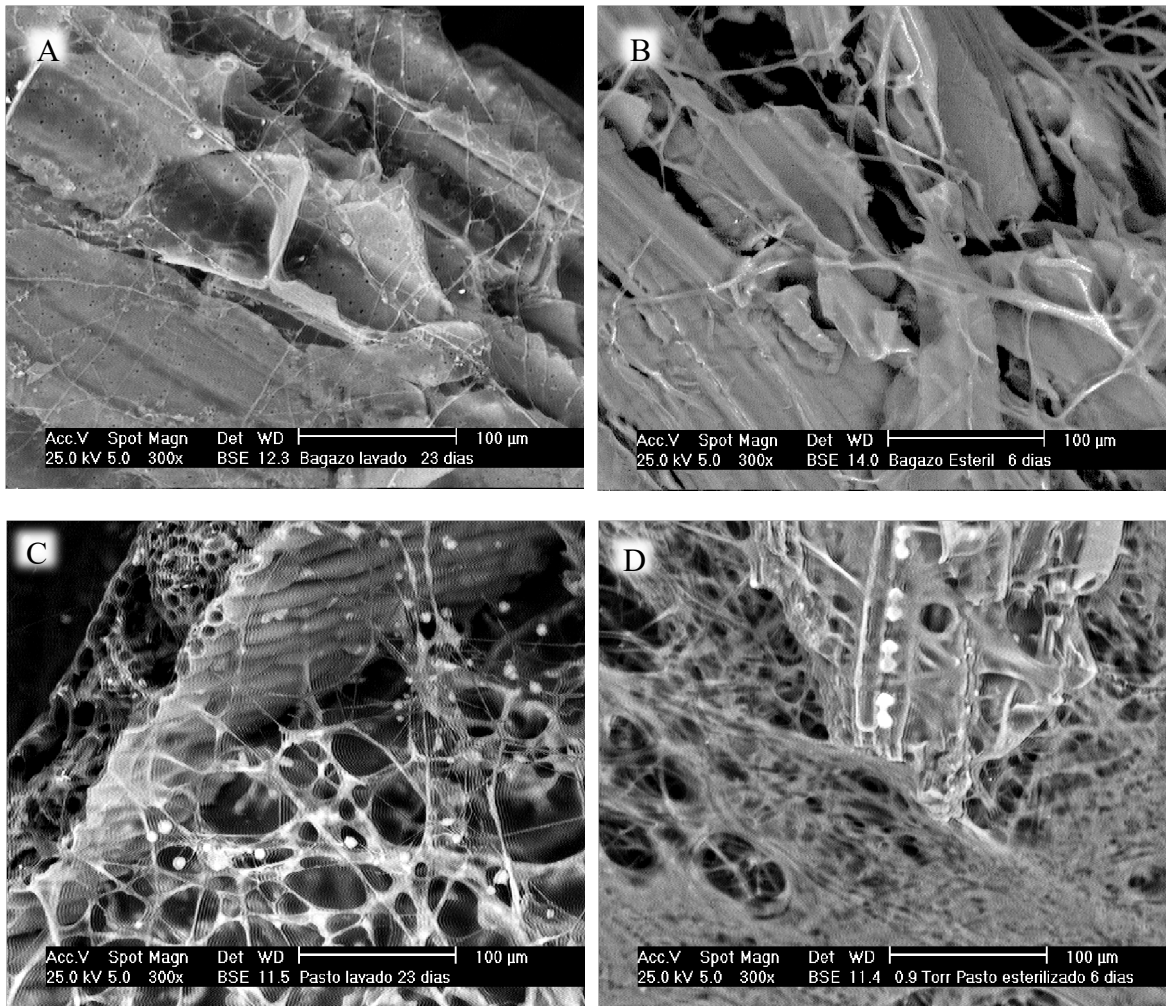
En la Figura 7.15, se muestran las micrografías de bagazo de agave esterilizado con y sin el hongo *L. gongylophorus*, después de cinco días de crecimiento. De igual forma, en la Figura 7.16 se aprecian las micrografías de *L. gongylophorus* creciendo sobre pasto o bagazo de caña (lavados o esterilizados). En los sustratos lavados se observan las fibras del material vegetal completo; por otro lado, en los materiales esterilizados, las fibras se perciben fragmentadas.

Además, también se observó que el crecimiento del micelio de *L. gongylophorus* fue abundante a los cinco y seis días en los sustratos esterilizados, lo cual puede atribuirse a la mayor apertura y fragmentación de las fibras. Esto a su vez, permitió el acceso de las hifas del hongo dentro del material y facilitó la biodisponibilidad de los componentes de la pared vegetal. Este proceso es similar a lo que ocurre en el jardín del hongo, cuando las hormigas mastican las hojas para facilitar la degradación del material vegetal (Figuras 7.15 y 7.16). Por el contrario, el crecimiento del hongo en los sustratos lignocelulósicos lavados se observó hasta los veintitrés días, con hifas más delgadas y menos abundantes, Figura 7.16.



**Figura 7.15** Micrografías por MEBA (A) Bagazo de agave esterilizado; (B) Bagazo de agave esterilizado con crecimiento de *L. gongylophorus* después de cinco días.

En este sentido, Moreira-Soto et al., (2017) observaron, mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, el crecimiento de *L. gongylophorus* de un jardín del hongo de hormigas cortadoras de hojas. Estos autores describen que, inicialmente, el micelio del hongo entra en contacto con la pared celular vegetal y, posteriormente, penetra los tejidos internos al mismo tiempo que secreta las enzimas que degradan el material lignocelulósico.

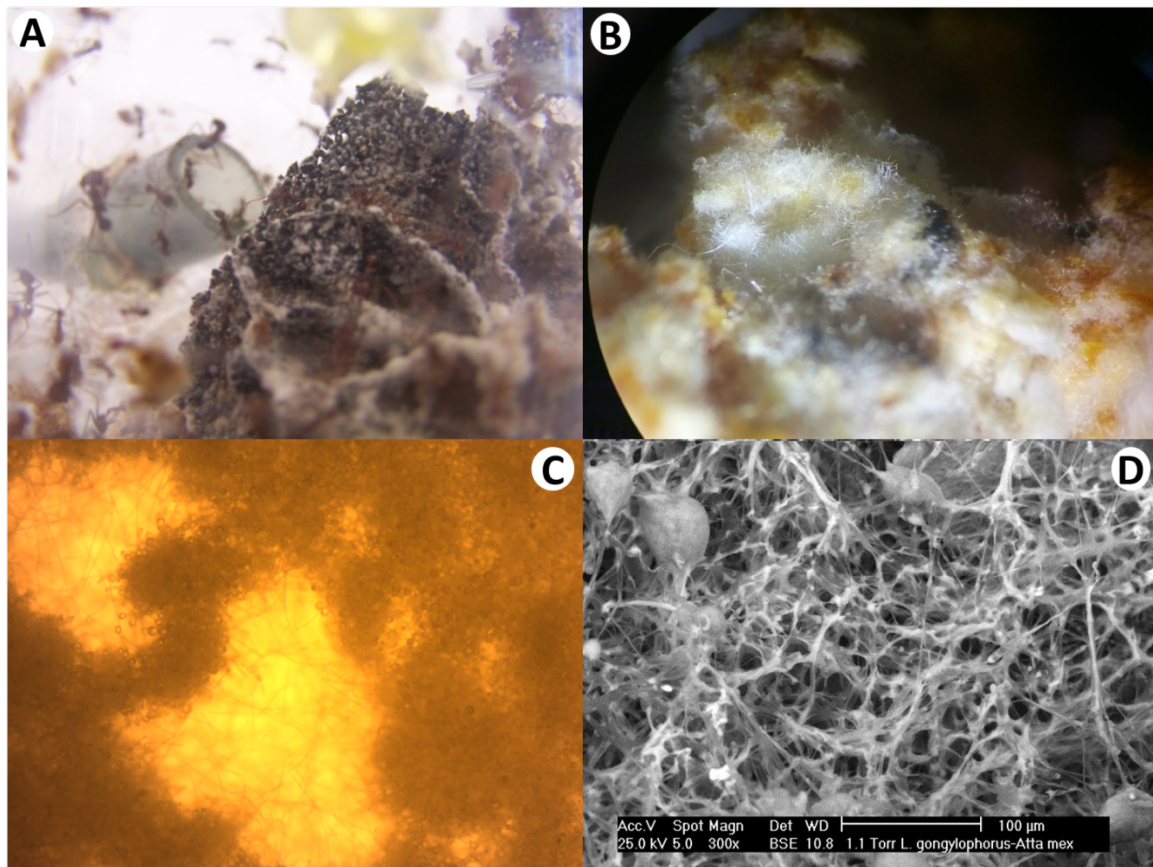


**Figura 7. 16** Micrografías por MEBA del crecimiento de *L. gongylophorus* en: (A) Bagazo de caña lavado; (B) Bagazo de caña esterilizado; (C) Pasto lavado; y (D) Pasto esterilizado.

Los resultados muestran que el hongo fue capaz de crecer tanto en los sustratos lavados como en los esterilizados, aunque fue más abundante en este último; por ello, los experimentos subsiguientes se realizaron con sustratos esterilizados.

### 7.3 Crecimiento fúngico observado microscopía óptica y electrónica de barrido ambiental

La Figura 7.17 muestra el crecimiento de *L. gongylophorus* en el jardín del hongo, las hormigas colocan el material vegetal en la parte superior, producen pequeños agujeros y forman una estructura porosa.

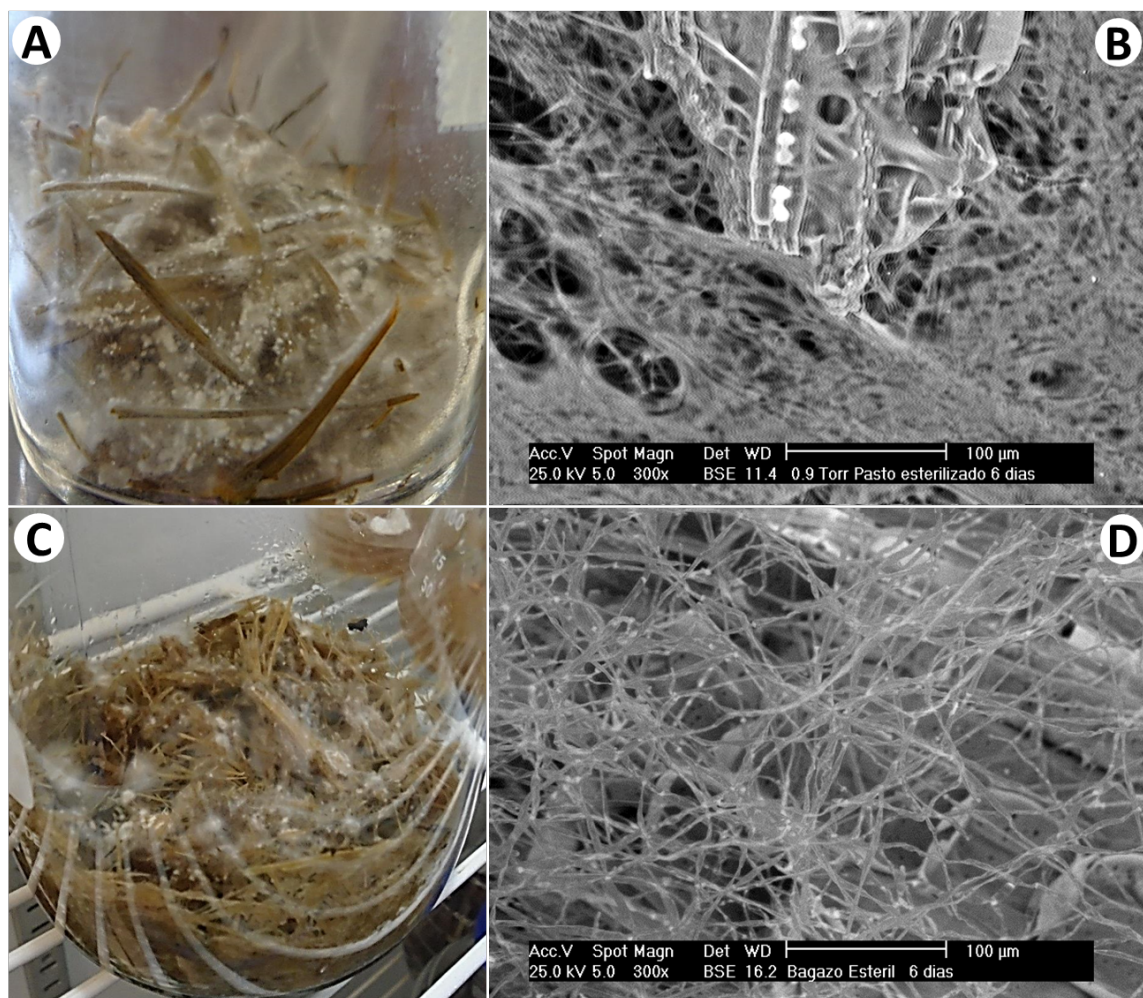


**Figura 7. 17** *L. gongylophorus* (A) Jardín del hongo (B) Jardín del hongo por microscopía óptica (C) Gongylidia por microscopía óptica y (D) micelio y gongylidia por MEBA.

Por otra parte, las micrografías muestran hifas cenocíticas de 5 µm de ancho en promedio, con racimos de gongylidia en las puntas y en la parte central de las hifas, estas estructuras constan de un diámetro promedio de 40 µm. Asimismo, se observó el crecimiento del hongo sobre los sustratos lignocelulósicos, con colonias blancas irregulares formadas por estructuras filamentosas de aspecto algodonoso de elevación tipo umbonato.



La morfología del hongo que se observó en este estudio fue similar a la de otros *L. gongylophorus* aislados de colonias de hormigas cortadoras de hojas (Carlson et al., 2017). La principal fuente de alimento de las hormigas cortadoras de hojas son las gongylidia, que se encuentran principalmente en las puntas de las hifas y se observó en las partes medias de las hifas por primera vez. En la relación mutualista, las hormigas estimulan la producción de gongylidia al masticar estas estructuras globulares, lo que provoca su crecimiento activo (De Fine et al., 2013; Grell et al., 2013; Masiulionis et al., 2014).



**Figura 7.18** Micrografías de *L. gongylophorus* creciendo en sustratos lignocelulósicos. (A) bagazo de caña; (B) micrografía por MEBA de bagazo de caña; (C) pasto y (D) micrografía por MEBA de pasto.

Moreira-Soto et al., (2017) describen que inicialmente las hifas del hongo entran en contacto con la pared celular, Figura 7.18, luego colonizan los tejidos internos y secretan las enzimas que degradan el material lignocelulósico, lo cual se evidencia en la descomposición de los tres componentes principales del polímero, celulosa, hemicelulosa y lignina.

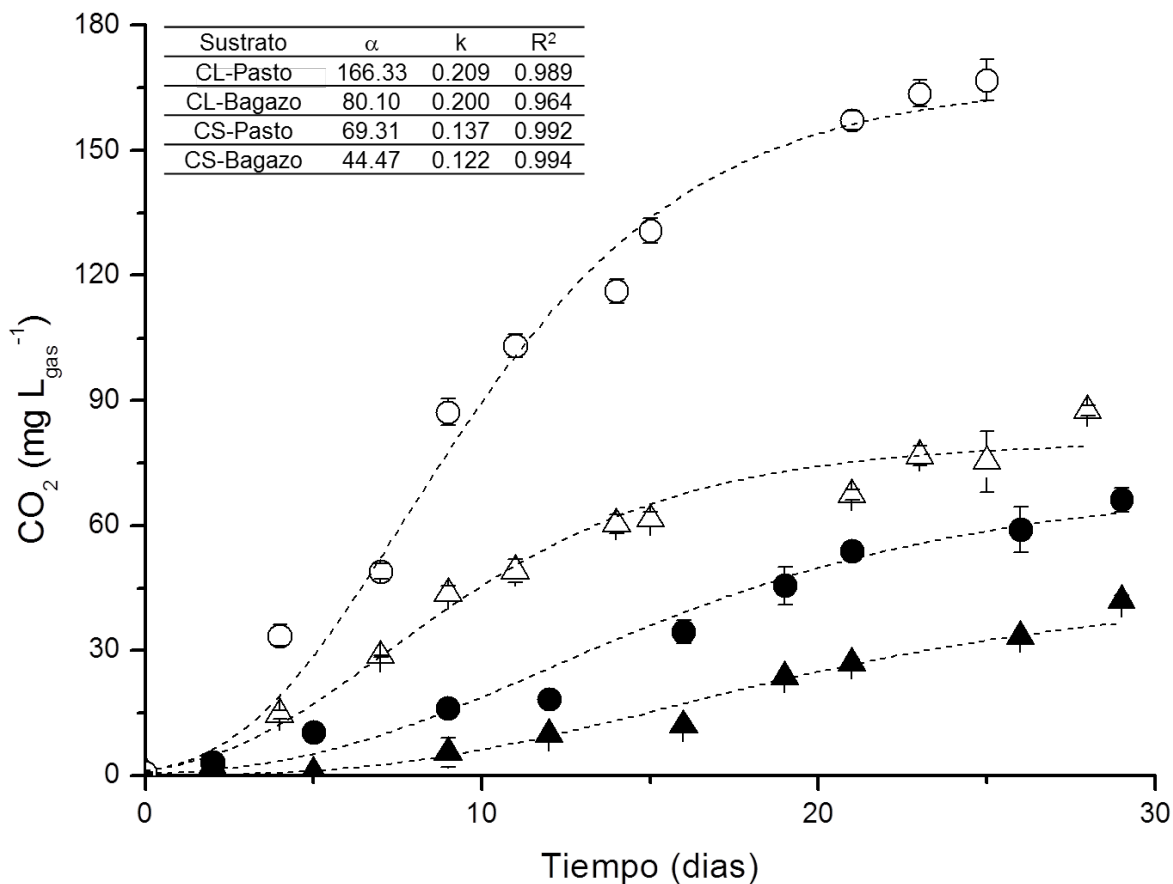
#### **7.4 Cultivos sumergidos (CS) y sólido (CS) con residuos lignocelulósicos y sustratos modelo**

En la Figura 7.19, *L. gongylophorus* se cultivó tanto en CL como en CS con pasto y bagazo de caña como fuentes de carbono. Como medida indirecta del crecimiento microbiano se realizó un seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub>. La producción de CO<sub>2</sub> registrada en CL en microcosmos fue mayor que la obtenida en CS. Además, la concentración máxima de CO<sub>2</sub> obtenida en CL con pasto-hongo fue mayor (166.33 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>) que en CS (69.31 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>). En tanto, la producción de CO<sub>2</sub> obtenido con bagazo-hongo en CL (80.1 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>) duplicó el valor obtenido en CS (44.47 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>).

El ajuste de las curvas al modelo de Gompertz mostraron valores de correlación aceptables ( $R^2 > 0.96$ ), la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en el CL pasto-hongo ( $V_{max}$  34.76 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) fue casi cuatro veces mayor que la obtenida en CS ( $V_{max}$  9.49 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Al mismo tiempo, la tasa máxima de producción obtenida en el hongo-bagazo ( $V_{max}$  16.02 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) fue casi tres veces mayor que la del CS ( $V_{max}$  5.42 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>), (Figura 7.19). Otras investigaciones que comparan el crecimiento de hongos en CL y CS reportan diferentes resultados. Cordova-Lopez et al., (1996) informaron que el crecimiento de *A. niger* fue mayor en CS que en CL, con concentraciones de 30-450 g<sub>Glucosa</sub> L<sup>-1</sup>, los autores refieren que las altas concentraciones iniciales de glucosa causaron represión catabólica en CL. Por el contrario, Téllez-Téllez et al., (2008) reportaron mayor crecimiento del hongo *P. ostreatus* en CL respecto a CS utilizando 10 g<sub>Glucosa</sub> L<sup>-1</sup>.

Por su parte, Nwe et al., (2002) encontraron que la biomasa fúngica y la producción de quitosano fue 1.5 mayor en CL en comparación con CS; en esta investigación un factor importante fue la fuente de nitrógeno adicionada al medio de cultivo, en el estudio usaron sulfato de amonio, nitrato de sodio o urea. Por último, Viguera et al., (2017) reportaron el crecimiento de *L. gongylophorus* sobre celulosa y biomasa lignocelulósica utilizando  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno adicionada al medio mineral. En el presente estudio se utilizó sulfato de amonio y urea como fuente de nitrógeno, lo cual mejoró el crecimiento. La diferente tasa de crecimiento del hongo en CL con respecto a CS se debe a varios factores, tal como son, la agitación, la actividad de agua, el oxígeno disuelto y la biodisponibilidad de los sustratos. Tanto el cultivo sumergido como el cultivo de estado sólido son métodos de uso común en la producción de enzimas. El CS se asemeja a la forma natural como crece *L. gongylophorus* en el jardín de hongo, sin embargo, el CL facilita el control del pH, la temperatura y la agitación, lo cual es útil para el escalamiento de los procesos.

Por otra parte, los sustratos lignocelulósicos son polímeros complejos ramificados de composición heterogénea, que contienen en mayor proporción cadenas poliméricas insolubles. Por ello, los mecanismos para inducir la expresión de los genes codificadores de las enzimas lignocelulolíticas deberían permitir la presencia de moléculas solubles, tal como, soforosa, celobiosa y xilobiosa. Además, algunos compuestos modelos poliméricos como CM-celulosa, xilano, pectina, almidón y lignina se han utilizado en cultivo líquido para inducir la producción de enzimas (Aro et al., 2005; Hanif et al., 2004; López et al., 2018).



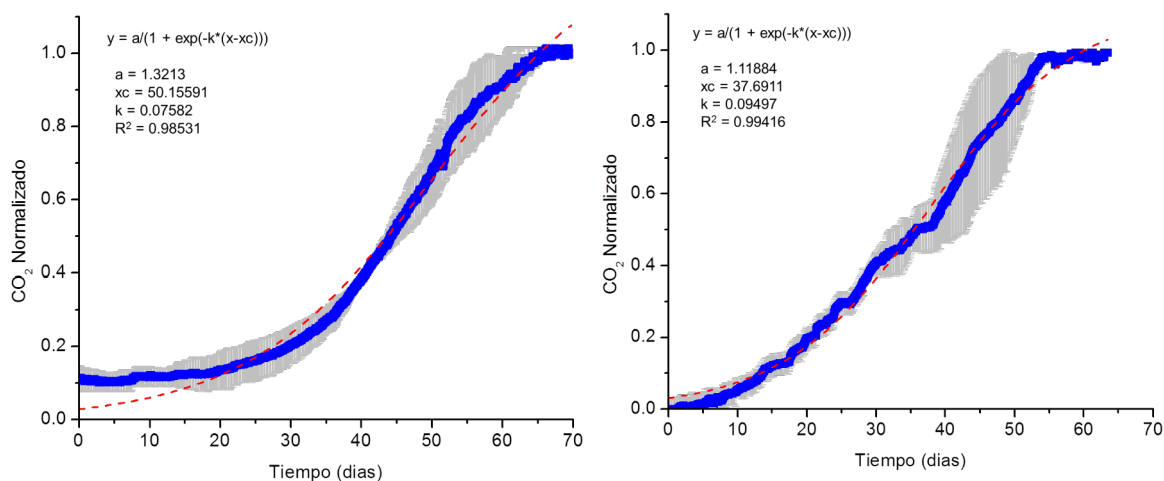
**Figura 7.19** Producción de CO<sub>2</sub> en cultivos sólido de *L. gongylophorus* en suspensión; hongo-pasto (●); hongo-bagazo (▲). Cultivo líquido: hongo-pasto (○); hongo-bagazo (Δ).

### 7.5 Cultivo sólido con residuos lignocelulógicos

Se realizó la cinética de CO<sub>2</sub> para medir de forma indirecta el crecimiento del hongo y también se corroboró la mineralización de los sustratos. El monitoreo del CO<sub>2</sub> se realizó usando un sensor de infrarrojo con adquisición de datos en línea, durante setenta días. Los resultados de la producción de CO<sub>2</sub> del hongo-pasto y el hongo-bagazo se normalizaron y ajustaron a un modelo no lineal (Figura 7.20). Ambos perfiles se ajustaron al modelo de Gompertz, con un coeficiente de correlación de 0.98 y 0.99, respectivamente. A medida que la producción de CO<sub>2</sub> se aproxima a la capacidad de carga del parámetro  $\alpha$  ( $\alpha$  = concentración máxima de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>)), la producción de CO<sub>2</sub> en el hongo-pasto ( $\alpha$  = 1.32), que resultó ser mayor que en el hongo-bagazo



( $\alpha = 1.11$ ). La desaceleración en la producción de CO<sub>2</sub> para el hongo-pasto comienza a los sesenta y cinco días, mientras que el hongo-bagazo comienza a los cincuenta y cinco días (Figura 7.20).



**Figura 7.20** Cinética de producción de CO<sub>2</sub> de *L. gongylophorus* cultivado con residuos lignocelulósicos. Línea azul: CO<sub>2</sub> producido; sombreado gris; error estándar; línea roja punteada: ajuste al modelo Gompertz. Izquierda: hongo-pasto. Derecha: hongo-bagazo.

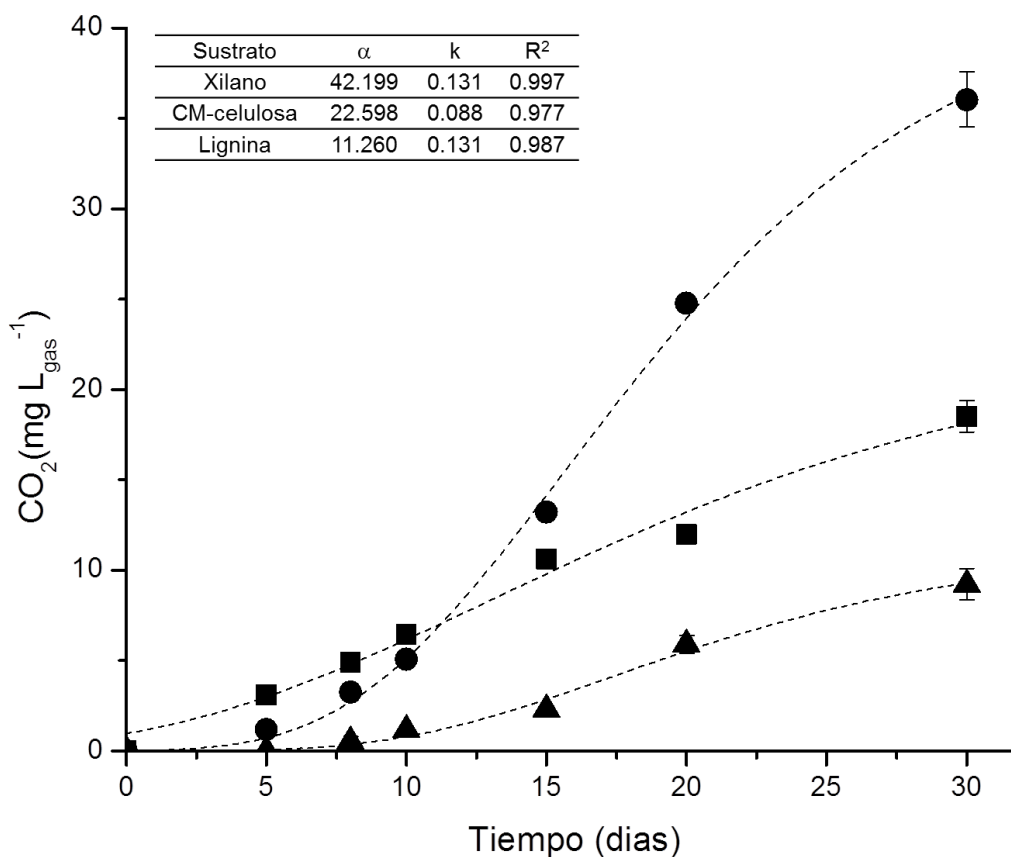
Asimismo, la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $k$ ), donde  $k = \text{CO}_2$  constante de tasa de producción (días<sup>-1</sup>), en el hongo-pasto ( $k = 0.07 \text{ día}^{-1}$ ) que es aproximada al de hongo-bagazo ( $k = 0.09 \text{ día}^{-1}$ ) La mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> de los cultivos fue hongo-pasto de entre veinte y sesenta días; el hongo-bagazo, en cambio, fue de entre diez y cincuenta días. Analizando la cinética de crecimiento, la mayor producción de CO<sub>2</sub> fue en el cultivo de hongo-pasto con respecto al hongo-bagazo. Esta investigación manifiesta dos diferencias principales en comparación con el trabajo de Vigueras et al., (2017), quienes realizaron ensayos de veintiún días. Por un lado, estos autores adicionaron NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno, mientras que nosotros utilizamos urea. Por otra parte, en esta investigación se utilizó un inóculo previamente aclimatado al crecimiento con los sustratos lignocelulósicos correspondientes, lo que aportó a tener un mayor crecimiento y mayor producción de CO<sub>2</sub>.

## 7.6 Cultivo sumergido con sustratos modelo

*L. gongylophorus* fue capaz de crecer en todos los sustratos modelo probados en CL. La producción inicial de CO<sub>2</sub> se detectó al quinto día en los cultivos con xilano y CM-celulosa; además, con lignina, la producción fue más lenta y se registró hasta el décimo día. Como se puede apreciar en la Figura 7.21, la concentración máxima de CO<sub>2</sub> obtenida después de 30 días en cultivo de xilano (42.19 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>) fue dos veces mayor que en CM-celulosa (18.5 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>) y cuatro veces mayor que en lignina (9.22 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>).

Por otro lado, en la Figura 7.21 también se observa que la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en xilano (V<sub>max</sub> 5.53 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) fue casi cuatro veces mayor que la CM-celulosa (V<sub>max</sub> 1.99 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) y lignina (V<sub>max</sub> 1.47 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Estos perfiles de CO<sub>2</sub> mostraron que el hongo era capaz de utilizar como fuente de carbono y energía los tres tipos de sustratos modelo, con diferentes tasas de crecimiento: primero, xilano; seguido de CM-celulosa y, finalmente, lignina.

Asimismo, varios estudios reportan la inducción de enzimas lignocelulolíticas con la adición de sustratos modelo, como son la celulosa microcristalina, α-celulosa, CM-celulosa, xilano, pectina, almidón y lignina; estos sustratos modelo representan algunos componentes de la pared celular de plantas. Además, algunos resultados muestran que *L. gongylophorus* tiene la capacidad de biodegradar y utilizar estos compuestos como única fuente de carbono y energía (Aline Silva et al., 2006; Viguera et al., 2017). Al respecto, Kooij et al., (2016) encontraron enzimas que biodegradan celulosa y hemicelulosa en el jardín del hongo de *Acromyrmex echinator* Forel (Hymenoptera, Formicidae); sin embargo, no detectaron las enzimas que biodegradan la lignina.



**Figura 7.21** Producción de CO<sub>2</sub> producido por *L. gongylophorus* en cultivo sumergido: Xilano (●); CMC (■); Lignina (▲).

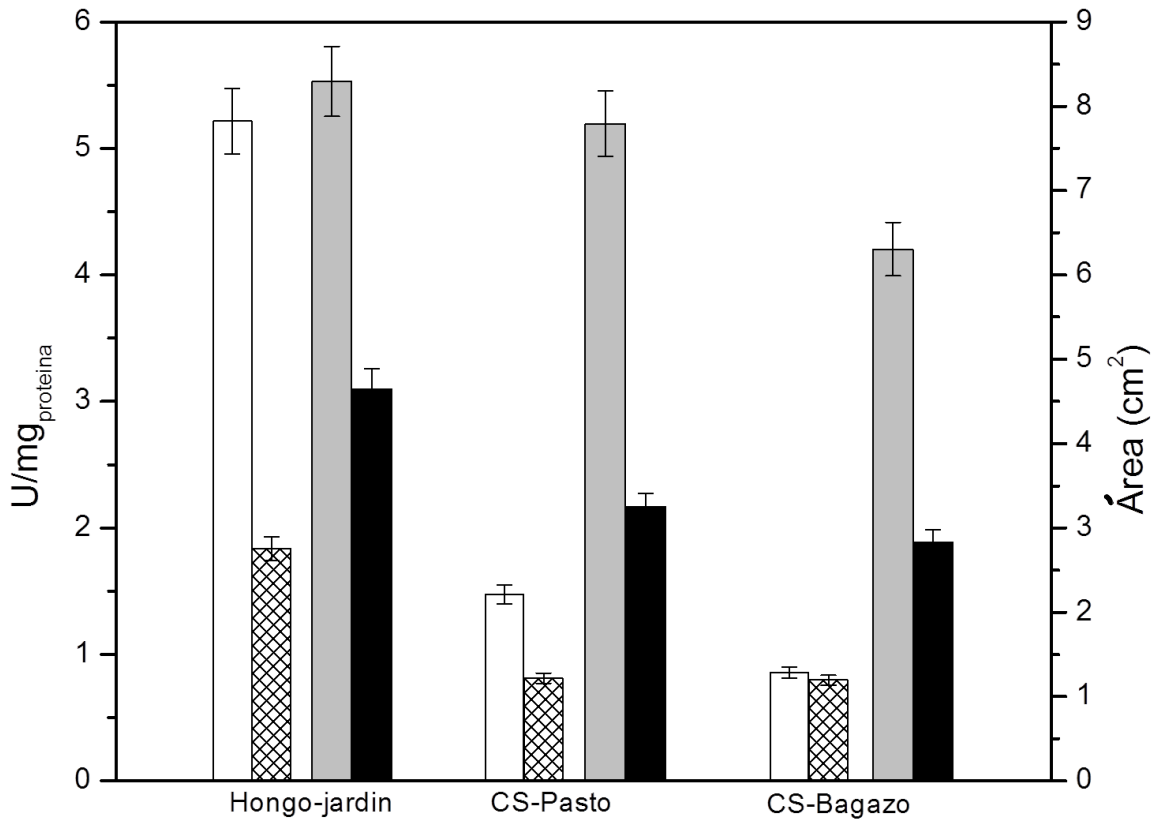
### 7.7 Actividad enzimática de endoglucanasa, xilanasas y lacasa

Los halos de hidrólisis de las actividades endoglucanasa y xilanasas obtenidas del hongo-jardín tuvieron el área más alta: 8.3 cm<sup>2</sup> y 4.6 cm<sup>2</sup>, seguidos por CS-pasto: 7.8 cm<sup>2</sup> y 3.2 cm<sup>2</sup>, y CS-bagazo: 6.3 cm<sup>2</sup> y 2.8 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Mientras que la actividad enzimática específica (U/mg<sub>proteína</sub>) del hongo-jardín también tuvo la mayor actividad endoglucanasa y xilanasas: 5.2 y 1.8; en CS-pasto fue de 1.5 y 0.8; y en CS-bagazo de 0.9 y 0.8, respectivamente (Figura 7.22). En todos los casos, el jardín del hongo tuvo la mayor actividad y la más baja se obtuvo en el CS-bagazo. Por otra parte, la actividad lacasa (U L<sup>-1</sup>) determinada en hongo-jardín fue cuatro veces

mayor que en CS-pasto, 44.8 y 10.9, respectivamente, mientras que en CS-bagazo no fue detectada. La actividad endoglucanasa y xilanasas de *L. gongylophorus*, referidas respecto al sustrato, fueron 414 y 152 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub> para hongo-jardín, 80 y 40 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub> para CS-pasto, 9 y 8 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub> para CS-bagazo, respectivamente.

Camassola y Dillon, (2010) reportaron actividades endoglucanasa y xilanasas de 290.5 y 36.4 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub>, para *Penicillium echinulatum* M.Basu y B.S. Mehrotra (Eurotiales, Trichocomaceae) cultivado en bagazo de caña en CS. Por otro lado, Tian y et al., (2018) reportaron la producción de actividad endoglucanasa y xilanasas de 17.3 y 189.2 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub>, respectivamente, utilizando desechos de alimentos y obtenidas en CS con *A. niger*. La actividad endoglucanasa obtenida del hongo-jardín fue mayor que la reportada para *P. echinulatum*, y la actividad xilanasas es similar a la observada en *A. niger*. Además, la actividad lacasa de *L. gongylophorus* determinada del hongo-jardín, y del CS-pasto fueron 6.5 y 1.6 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub>, respectivamente.

Algunos informes sobre la actividad lacasa de hongos de pudrición blanca cultivados con diferentes sustratos en CS, usando ABTS como sustrato enzimático, reportaron 32 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub> para *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm (Agaricales, Pleurotaceae) cultivado con salvado de trigo y paja de maíz; y 8.5 y 49 U g<sup>-1</sup><sub>sustrato-seco</sub> para *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Polyporales, Polyporaceae), cultivados con desechos de mazorcas de maíz y orujo de manzana, respectivamente (Wang et al., 2019). Por lo tanto, solo la actividad lacasa obtenida del jardín del hongo fue similar a lo reportado para *T. versicolor* cultivado con desechos de mazorcas de maíz.



**Figura 7. 22** Actividad enzimática de endoglucanasas y xilanasas respectivamente. Actividad enzimática específica; U/mg proteína (Blanco y Malla); Halos de hidrólisis; cm<sup>2</sup> Gris y Negro.

Comparado por dos métodos, ensayos enzimáticos espectrofotométricos ( $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores) / min / mg proteína (U / mg proteína) y halos de hidrólisis (Área, cm<sup>2</sup>) respectivamente.

Finalmente, el jardín del hongo contiene importantes actividades lignocelulolíticas debido a la presencia de hormigas que dispersan y depositan sobre el material vegetal las enzimas ingeridas de las gongylidia (De Fine et al., 2013). Muchos hongos han sido reportados como productores de enzimas lignocelulolíticas, pero *L. gongylophorus* es un hongo que produce una gran diversidad de CAZymes y FOLymes, el primer borrador del genoma encontró 145 lignocelulasas (Aylward y et al., 2013). Ike et al., (2019) informaron que *L. gongylophorus* produce una lacasa

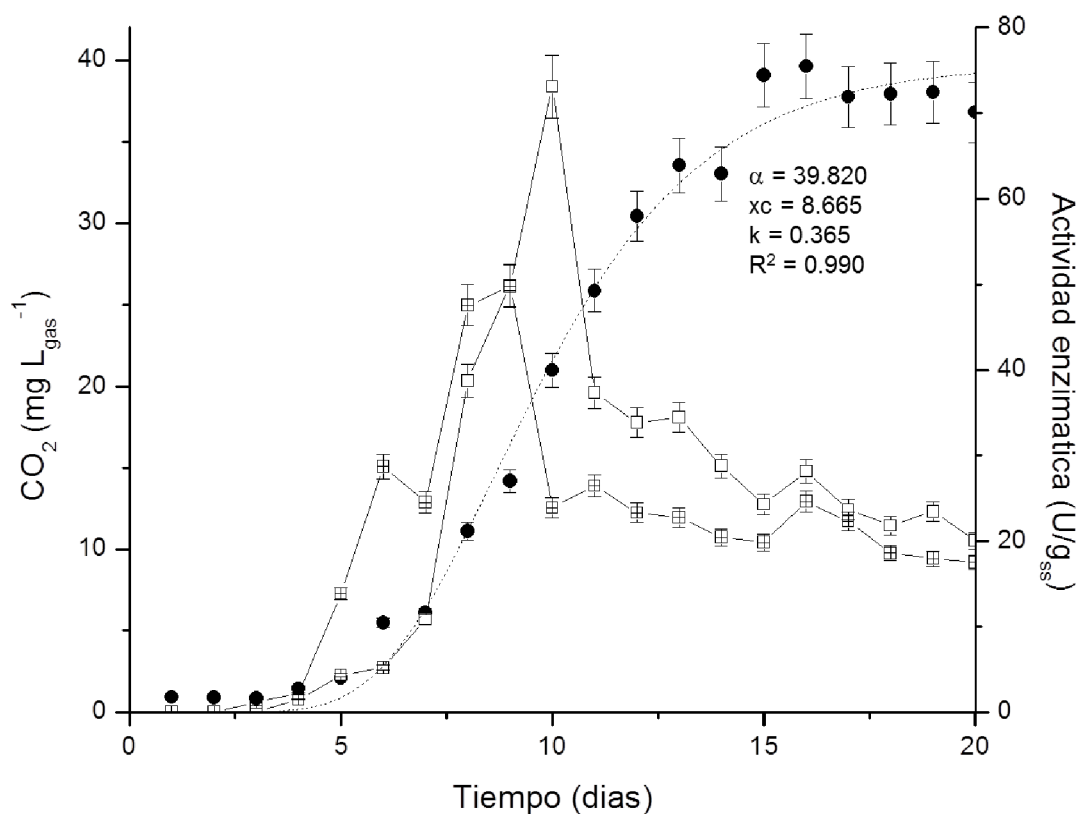
amarilla con potencial aplicación para la degradación del antraceno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales podrían usarse en la biorremediación ambiental. Aunque otros hongos también tienen la capacidad de degradar sustratos lignocelulósicos para obtener nutrientes, *L. gongylophorus* almacena una fracción de los carbohidratos liberados como glucógeno en las estructuras de gongylidia.

### **7.8 Ensayos de actividad endoglucanasa, xilanasa y cuantificación de CO<sub>2</sub>**

En las Figuras 7.23 y 7.24, se muestran las cinéticas de producción de CO<sub>2</sub> al crecer en cultivo sólido usando residuos lignocelulósicos como pasto o bagazo de caña; en ambos casos se corroboró la degradación de los sustratos hasta su mineralización. Los datos ajustados al modelo de Gompertz tuvieron una correlación aceptable ( $R^2 > 0.98$ ), con una concentración máxima estimada de CO<sub>2</sub> de 39.820 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> para el cultivo de hongo-pasto; mientras que para el cultivo de hongo-bagazo, el estimado fue de 21.231 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>. La tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en el cultivo de hongo-pasto (5.35 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup>día<sup>1</sup>) fue mayor que la obtenida en el cultivo de hongo-bagazo (3.02 mg CO<sub>2</sub> L<sub>gas</sub><sup>-1</sup> día<sup>1</sup>).

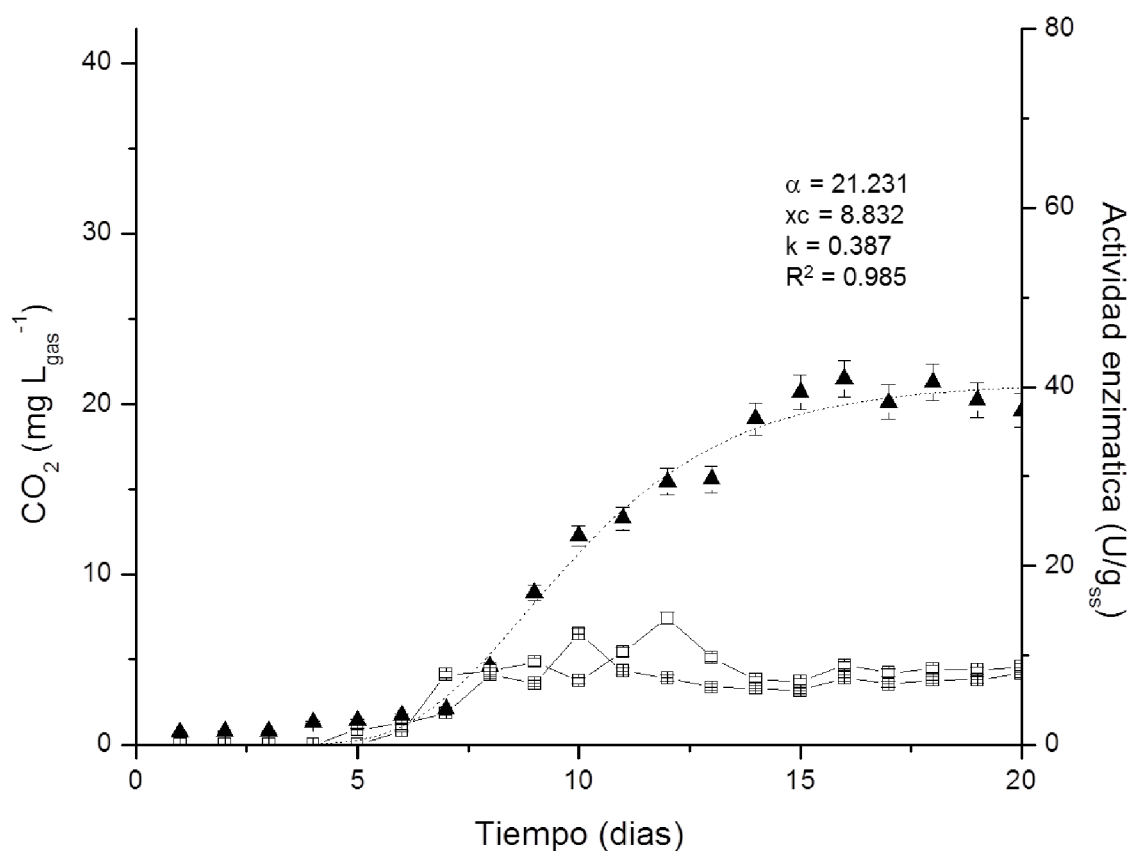
Por otra parte, las cinéticas del cultivo hongo-pasto mostraron un incremento de las actividades endoglucanasa y xilanasa a partir del cuarto día, mientras que en el cultivo de bagazo el incremento de actividad se registró hasta el sexto día. Las mayores actividades tanto de endoglucanasas (73.1 U g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) y de xilanasa (49.75 U g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) se registraron en el cultivo de hongo-pasto en el décimo y noveno día, respectivamente. En cambio, para el cultivo de hongo-bagazo, la mayor actividad endoglucanasa (14.17 U g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) y xilanasa (12.37 U g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) se obtuvo hasta el

décimo segundo y décimo día respectivamente (Figuras 7.23 y 7.24). La producción de CO<sub>2</sub> registrada en los cultivos indica que el hongo fue capaz de crecer con los residuos lignocelulósicos como fuente de carbono. Se puede observar, Figura 7.23, que la fase exponencial del cultivo hongo-pasto se registró alrededor del décimo día, lo cual coincidió con la mayor actividad endoglucanasa y fue ligeramente posterior al alcance del valor máximo de actividad xilanasa.



**Figura 7. 23** Cinética de producción de CO<sub>2</sub> (●) ajustado a Gompertz (línea punteada) y actividad enzimática endoglucanasa (□) y xilanasa (⊞) de *L. gongylophorus* creciendo con pasto en suspensión heterogénea.

Por otro lado, en el cultivo hongo-bagazo, la fase exponencial se observa alrededor del décimo segundo día e, igualmente, coincide con la mayor actividad endoglucanasa seguida de la xilanasa (Figura 7.24).



**Figura 7.24** Cinética de producción de CO<sub>2</sub> (●) ajustado a Gompertz (línea punteada) y actividad enzimática endoglucanasa (□) y xilanasa (⊞) de *L. gongylophorus* creciendo con bagazo de caña en suspensión heterogénea.

En este sentido, Costa et al., (2010) muestran cinéticas de producción de enzimas celulasas y xilanasas de *Aspergillus ficuum* (Reichard) Tom y Currie (Eurotiales, Trichocomaceae) en cultivo sólido usando pomaza de arándano como sustrato. Dichos autores observaron que



alrededor del cuarto día se incrementó la actividad enzimática y alcanzó los máximos entre el décimo y décimo segundo día. Estos datos son semejantes a los de esta investigación.

Por su parte, Nava-Cruz et al., (2016) realizaron cinéticas de producción de enzimas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieck y Nirenberg (Hypocreales, Hypocreaceae) cultivado con fibras de *Agave atrovirens* como sustrato y soporte; en este estudio, la actividad endoglucanasa se incrementó desde el primer día y registró la máxima actividad alrededor del décimo día, seguido de una rápida disminución de esta actividad. Este comportamiento también fue similar al observado en nuestro perfil de actividad de endoglucanasas, el cual disminuyó de forma marcada en los cultivos de hongo-pasto a partir del décimo día, mientras que, en los cultivos de hongo-bagazo, la disminución se observó alrededor del décimo primer día, pero no fue tan acentuada.

Por otro lado, la actividad xilanasa obtenida en hongo-bagazo ( $12.37 \text{ U g}^{-1}_{\text{sustrato-seco}}$ ) fueron aproximadamente una tercera parte de las reportadas por Camassola y Dillon (2010) con el hongo *Penicillium echinulatum* que creció en bagazo de caña ( $36.4 \text{ U g}^{-1}_{\text{sustrato-seco}}$ ); en cambio, comparado con el valor obtenido con hongo-pasto ( $49.75 \text{ U g}^{-1}_{\text{sustrato-seco}}$ ), los valores fueron más cercanos. La actividad de endoglucanasa obtenida con hongo-bagazo ( $14.17 \text{ U g}^{-1}_{\text{sustrato-seco}}$ ) fue similar a la reportada por Thian et al., (2018), que usaron desechos de alimentos con *Aspergillus niger* ( $17.3 \text{ U g}^{-1}_{\text{sustrato-seco}}$ ).

Comparando los resultados anteriores (sección 7.7: Actividad enzimática de endoglucanasa, xilanasa y lacasa), se puede apreciar, en ambos estudios, que la actividad endoglucanasa es mayor que la actividad de la xilanasa y que las actividades obtenidas en los cultivos de bagazo son menores que en pasto. La principal diferencia respecto a la sección 7.7 es que las actividades se obtuvieron de cultivos frescos del hongo creciendo en YNB en lugar de cultivos liofilizados; sin embargo, estos valores fueron menores que los obtenidos en el jardín del hongo liofilizado, 414  $U\ g_{ss}^{-1}$  para endoglucanasas y 152  $U\ g_{ss}^{-1}$  para xilanasas.

Aviz et al., (2021) reportaron un valor de actividad xilanasa ( $49.55\ U\ g_{ss}^{-1}$ ) similar obtenido con hongo-pasto ( $49.75\ U\ g_{ss}^{-1}$ ) con *Trichoderma* sp. En el mismo estudio, también reportaron actividades CMCase ( $4.65\ U\ g_{ss}^{-1}$ ) y xilanasa ( $56.67\ U\ g_{ss}^{-1}$ ) con una cepa tipificada como *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieck y Nirenberg (Hypocreales, Hypocreaceae) PEC-6, mientras que con un consorcio que formularon con *Trichoderma asperellum* PEC-6 y *P. ostreatus* (PEC-6/Pleo) reportaron actividades CMCase ( $1.56\ U\ g_{ss}^{-1}$ ) y xilanasa ( $187.32\ U\ g_{ss}^{-1}$ ), siendo ésta última notablemente superior.

El proceso de biodegradación comienza con compuestos que poseen alto valor nutricional, como las proteínas, y termina con la degradación de los polisacáridos de la pared celular de la planta. La relevancia reside en el hecho de que muchos genes xilanolíticos y celulolíticos están correlacionados en los microorganismos, teniendo en cuenta que la descomposición natural de la celulosa y la hemicelulosa normalmente está unida. Ambos tipos de enzimas son inducidas por D-xilosa, xilobiosa, xilano y celobiosa mientras que son reprimidas por glucosa (Schiøtt et al., 2008). La mayor producción de  $CO_2$  se presentó cuando se utilizó pasto como fuente de carbono

lo cual puede estar correlacionado con mayor contenido de proteínas en comparación con el bagazo de caña que contiene un bajo contenido de estas macromoléculas. Finalmente es un hecho que a partir de cultivos de estado sólido de *L. gongylophorus* usando residuos lignocelulósicos se podría producir enzimas CAZymes.

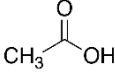


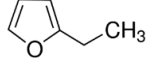
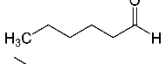
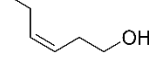
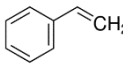
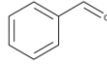
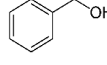
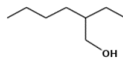
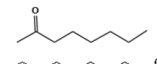
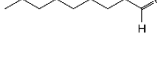

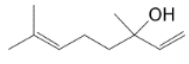
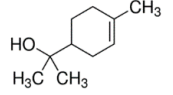
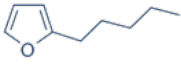
## **7.9 Identificación de compuestos orgánicos volátiles durante la biodegradación de residuos lignocelulósicos**

La actividad biológica de *L. gongylophorus* durante la biodegradación de residuos lignocelulósicos produjo metabolitos volátiles que pudieron ser identificados por GC-MS. En la tabla 7.1, se muestran los COV's identificados con una concordancia mayor o igual al 80%.

En los tres cultivos (hongo-pasto, hongo-bagazo y hongo-hoja de rosal), se identificaron ácido acético, furfural y estireno; mientras que el 2-etil furano y 2-pentil furano sólo fueron identificados en los cultivos de hongo-pasto y hongo-bagazo. Además, los compuestos hexanal, alcohol bencílico y linalol se encontraron en hongo-pasto y hongo-hoja de rosal.

Algunos COVs solamente se encontraron en un tipo de sustrato, entre estos tenemos el 1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexeno que solo se encontró en los cultivos de hongo-pasto; mientras que el terpineol únicamente se identificó en los cultivos de hongo-bagazo. En los cultivos de hongo-pasto, también se encontraron 2-etil, éster metílico, benzaldehído, 2-heptanona, 2-octanona, 2-etil hexanol y sucato. Finalmente, en los cultivos con hongo-hoja de rosal se encontró nonanal, 3-hexen-1-ol, y octano.

**Tabla 7.1** Compuestos orgánicos volátiles identificados en cultivos de estado sólido de *L. gongylophorus* durante la biodegradación de residuos lignocelulósicos.

Compuesto	PM	Estructura	Hongo-Bagazo	Hongo-Pasto	Hongo-Hrosal
Ácido acético	60		+	+	+
2-heptanona	86		-	+	-
Furfural	96		+	+	+
2-etilfurano	96		+	+	-
Hexanal	100		-	+	+
3-hexen-1-ol	100		-	-	+
Estireno	104		+	+	+
Benzaldehído	106		-	+	-
Alcohol bencílico	108		-	+	+
2-etil hexanol	130		-	+	-
2-octanona	142		-	+	-
Nonanal	142		-	-	+
Octano	114		-	-	+
Linalol	154		-	+	+
Terpineol	154		+	-	-
2-pentil furano	154		+	+	-

El ácido acético y el furfural se encontraron en todos los cultivos, estos compuestos son conocidos por ser inhibidores de los procesos de fermentación. Dichos compuestos son

producidos cuando se aplica calor y en condiciones ácidas para liberar azúcares de los materiales lignocelulósicos (Modenbach y Nokes, 2012). La presencia de estos compuestos no inhibió el crecimiento del hongo *L. gongylophorus*. Asimismo, se ha reportado que el ácido acético y el furfural afectan el crecimiento de las levaduras productoras de xilitol, producto del metabolismo de la xilosa (Ramírez-Amador et al., 2012; Rangel-León et al., 2006).

El ácido acético también es un intermediario metabólico producido por una gran cantidad de microorganismos. El estireno se identificó también en todos los cultivos; de hecho, Pinches et al., (2007) reportaron que *Trichoderma* sp. produce los COVs, estireno y 1,3-pentadieno, durante la descomposición de alimentos. El 2-pentil furano, identificado en hongo-bagazo y hongo-pasto, es un compuesto producido por hongos filamentosos que incluso ha sido utilizado como un marcador para evidenciar la presencia del hongo *Aspergillus fumigatus* Fresenius (Eurotiales, Trichocomaceae) (Syhre et al., 2008).

Por otra parte, el alcohol bencílico encontrado en hongo-pasto y hongo-hojas de rosál es un compuesto producido por diversos hongos, entre ellos el *Bjerkandera adusta* (Wild) P. Karst (Polypolares, Meruliaceae) (Lapadatescu et al., 2000). El hexanal es el principal compuesto volátil que se encuentra en el cacahuete (Noge, 2019). Los COVs de linalol se encontraron solamente en hongo-bagazo y hongo-hoja de rosál. En cambio el terpineol en hongo-bagazo, el cual es un compuesto que ha sido extraído de la planta *Croton cajucara*, tiene un olor agradable similar al aroma de las lilas y es un ingrediente común en perfumes; además, junto con el linalol, se usa como antimicrobiano y que se encontró solamente en hongo-bagazo (Alviano et al., 2005; SoonNang et al., 2012).

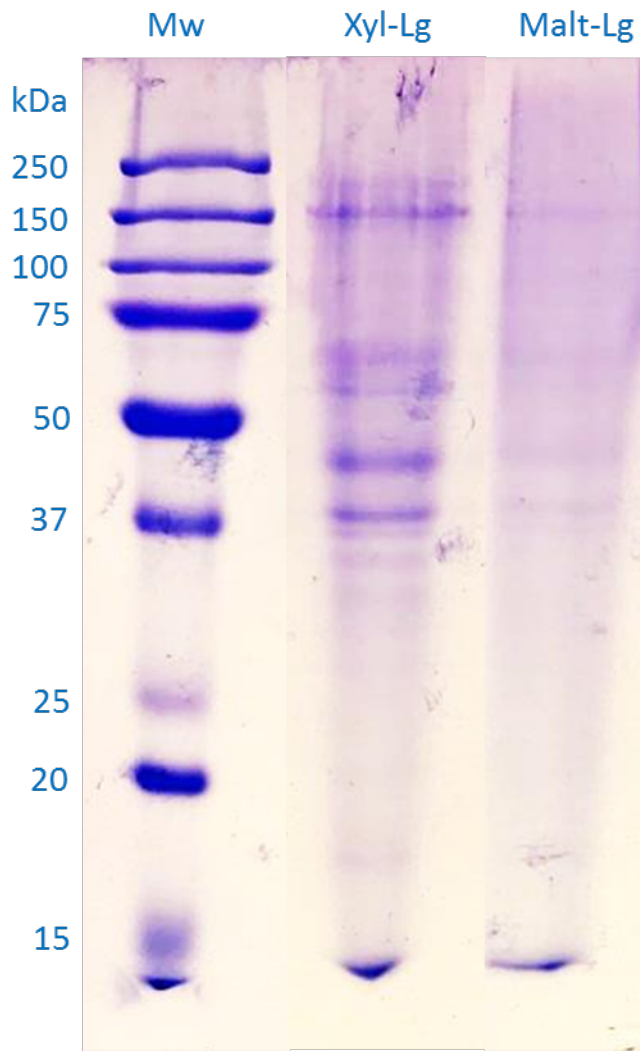
La 2-heptanona fue identificada en hongo-pasto, este compuesto es uno de los principales componentes de las secreciones generadas en las mandíbulas de las glándulas metapleurales de las hormigas *A. sexdens*, *A. texana* y *A. cephalotes* (Riley et al., 1974; Mendonça et al., 2009). También es un compuesto encontrado en la naturaleza, para algunos insectos es una feromona que provoca reacciones de evitación y huida en situaciones de alarma (LópezRiquelme et al., 2006). En el hongo-pasto, se encontró benzaldehído, 2-heptanona y 2-octanona. El benzaldehído se ha identificado en cultivos de *Trichoderma* sp., mientras que la 2-heptanona y 2-octanona son cetonas producidas durante la descarboxilación de los ácidos grasos (Wheatley et al., 1997; Ryu et al., 2004).

En los cultivos de hongo-hoja de rosal, se encontró el 3-hexen-1-ol, este compuesto se ha encontrado en extractos de la planta *Eruca sativa* que junto con 3-hexenil acetato se ha reportado que tiene actividad nematocida. Estos dos compuestos son los predominantes y a los que se les atribuye una potente actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita* Kofoid y White Chitwood (Tylenchina, Tylenchomorpha) que parasita plantas (Aissani et al., 2015). El 2-etil furano, alcohol bencílico y benzaldehído son COVs que, según algunas investigaciones, son producidos por algunos hongos filamentosos; de ahí que, al encontrarlos en nuestros cultivos, podríamos sugerir que son producto del metabolismo de *L. gongylophorus*; sin embargo, para corroborarlo se requieren más estudios al respecto.

También, algunos de los volátiles encontrados han sido reportados con actividad antibacteriana o antifúngica, lo que deja abierta línea para estudios posteriores.

### **7.10 Perfil de proteínas de *L. gongylophorus* creciendo con Xilano o Malta**

El análisis de proteínas por SDS-PAGE (Figura 7.25) muestra diferentes perfiles de las proteínas secretadas cuando el hongo crece con xilano o en extracto de malta (control).



**Figura 7 25** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las muestras de proteínas secretadas por *L. gongylophorus* al crecer con xilano (Xyl-Lg) o malta (Malt-Lg). La primera línea corresponde al marcador del peso molecular (Mw).

En la muestra Xyl-Lg, se observan bandas de 36.1 kDa y, en Malt-Lg, una banda de 37.2 kDa, las cuales tienen una masa molecular cercana a la reportada para pectin metil esterasa de 37 kDa, XylG1 de 38 kDa o aspartil proteasa de 39 kDa (Aylward et al., 2013; Moreira et al., 2014; Salas-Tovar et al., 2017). Tanto en Xyl-Lg como en Malt-Lg, se encontró una banda de 44.3 kDa y 45.9 kDa respectivamente, valores cercanos a las masas moleculares reportadas para endoglucanasa III de 42 kDa, endoglucanasa I de 46 kDa, o  $\alpha$ -glucosidasa de 47 kDa (Macarron,

1992; Rangel-Alfaro et al., 2011; Khadempour et al., 2016). En Xyl-Lg y MaltLg, se encontró una banda de 69.1 y 69.9 kDa, respectivamente, dichos valores se aproximan a las masas moleculares de metaloproteasa (72 kDa).

Por otro lado, solamente en Xyl-Lg se encontró una banda de 59.9 kDa, valor cercano a la masa molecular de una glioxaloxidasa (57 kDa) (Aylward et al., 2013). En el caso de la xilanas reportada por Moreira et al., (2014), se usó como fuente de carbono xilano de madera de Haya para crecer a *L. gongylophorus* y se nombró a esta enzima XylLg1. En cuanto a las endoglucanasas I y III que reportaron Khadempour et al., (2016), se obtuvieron estas enzimas de jardín del hongo de *L. gongylophorus* cultivado por hormigas de la especie *Atta cephalotes*, usando como sustrato flores.

Los perfiles que se obtuvieron por SDS-PAGE corresponden a las proteínas secretadas por el hongo *L. gongylophorus* con xilano. Las bandas coinciden con endoglucanasas, xilanasas, y pectin estereasa, enzimas relacionadas con la biodegradación de los compuestos celulósicos que conforman la pared celular de los vegetales (celulosa, hemicelulosa y pectina), pertenecientes a la familia de las CAZymes, además de otras hidrolasas de interés como es la aspartil proteasa. Estas enzimas tienen potencial aplicación en biotecnología, para la liberación de azúcares fermentables que pueden ser aprovechados para la producción de biocombustibles y en la industria alimenticia.



### 7.11 Análisis elemental por microscopía electrónica de barrido de doble haz (SEM-FIB)

Por SEM-FIB se obtuvo el análisis elemental del jardín del hongo y de *L. gongylophorus* aislado; en la tabla 7.2, se muestran los porcentajes de los elementos detectados, la cantidad de C, O y Fe no presenta diferencias significativas entre las muestras. Por el contrario, entre los siguientes elementos N, Mg, Na, Al, Si, P, Mo, S, Cl, K y Ca sí hubo diferencias significativas. Por otra parte, hubo elementos, tal como Al, Si, Mo y Ca que solo se encontraron en el jardín del hongo y, por el contrario, el Na solo se encontró en el *L. gongylophorus* aislado. En cuanto a macroelementos, en ambas muestras, el contenido de C y O fue de 48% y 39%, respectivamente; mientras que el contenido de nitrógeno fue mayor en el hongo aislado (9%) que en el jardín del hongo (6.7 %). En cuanto al contenido de P, el hongo aislado (2.11) fue tres veces mayor que en el jardín del hongo (0.69%). En contenido de S, elemento que se encuentra en proteínas, se determinó que en el hongo aislado (0.67%) fue aproximadamente cuatro veces más que en jardín del hongo (0.17%).

En cambio, el ion Mg (microelemento fundamental en procesos bioquímicos) se encontró aproximadamente la mitad, 0.23% Mg de lo contenido en el jardín del hongo 0.58%. El contenido de K, determinado en *L. gongylophorus* fue aproximadamente dos veces mayor que en el jardín del hongo.

**Tabla 7.2** Análisis elemental de Jardín del hongo y *L. gongylophorus* aislado, determinado con sonda dispersiva de rayos X de microscopio electrónico de barrido de doble haz.

<b>Elemento</b>	<b>Jardín del hongo Porcentaje (%)</b>	<b><i>L. gongylophorus</i> aislado Porcentaje (%)</b>
C	48.65 ± 0.27	47.92 ± 0.19
O	38.1 ± 0.22	39.93 ± 0.76
N	6.73 ± 0.12	8.99 ± 0.15
P	0.69 ± 0.01	2.11 ± 0.01
S	0.17 ± 0.03	0.67 ± 0.03
Fe	2.76 ± 0.05	2.18 ± 0.14
Mg	0.58 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Na	ND	1.37 ± 0.04
Al	0.28 ± 0.01	ND
Si	0.23 ± 0.01	ND
Mo	0.34 ± 0.03	ND
Cl	0.23 ± 0.02	2.06 ± 0.02
K	0.95 ± 0.02	2.09 ± 0.01
Ca	0.22 ± 0.01	ND

\*ND: No detectado

En el análisis estadístico, se muestran los valores medios; los elementos C, O y Fe cumplieron normalidad con  $p > 0.05$  y homogeneidad de varianzas y, a través de una comparación de medias, se encontró que no existe diferencia significativa entre las dos muestras en esos elementos. Por otro lado, la prueba T de Wilcoxon aplicada a los elementos N, Mg, Na, Al, Si, P, Mo, S, Cl, K y Ca mostró una  $p < 0.05$  en todos los casos. Ello permite concluir que sí hay diferencia significativa entre los elementos del jardín del hongo con respecto a los del hongo aislado. Los

resultados en porcentaje que obtuvo Manzoor en 2018, de C y O son similares a los obtenidos de *L. gongylophorus* sólo que ellos los determinaron en cepas de *Candida dubliniensis* Sullivan, Western, Haynes, Dés, Benn y Coleman (Saccharomycetales, Saccharomycetaceae), *Candida tropicalis* (Castell) Berkout (Saccharomycetales, Saccharomycetaceae) y *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkout (Saccharomycetales, Saccharomycetaceae) con valores de entre 46-48 % y 38-40 % respectivamente (Manzoor, 2018).

El caso del *L. gongylophorus* aislado tiene diferencias estadísticas significativas comparado con el jardín del hongo, en el elemento primario (N) y en los elementos secundarios (Mg, Na, Al, Si, P, Mo, S, Cl, K y Ca). Cuando se comparó el jardín del hongo con el hongo aislado, se presentaron en menor proporción N, P, S y Cl; y Mg y K en mayor proporción. Uno de los factores por los que hubo variación elemental del *L. gongylophorus* aislado fueron las sales del medio mineral. En el caso del jardín del hongo, se encontró que el suelo en nidos de las hormigas cortadoras de hojas aumentó los niveles de nutrientes (elementos N, Ca, Na, P, K, Mg; humedad y materia orgánica), los cuales benefician al crecimiento de las plantas (Montoya-Lerma et al., 2012; Sternberg et al., 2007). Los elementos Mg, Na, Al, Si, P, Mo, S, Cl, K y Ca son los llamados oligoelementos, es decir, se encuentran en pequeñas cantidades en los seres vivos y tanto su ausencia como presencia puede afectar al ser vivo. En cuanto al jardín del hongo, otra posible variación fue en la selección de hojas por parte de las hormigas, por ejemplo, Berish en 1986 reportó que las hormigas prefieren hojas con un alto contenido de N y P, pero con bajas concentraciones de Mn y Al.

De los elementos Al, Si, Mo y Ca, que no se encuentran en el hongo aislado, el Al es capaz de inhibir el crecimiento de algunos hongos, aunque los reportes mencionan que sí se encuentra en el jardín del hongo (Berish, 1986). Por otro lado, el Si es un elemento abundante que fácilmente se encuentra en el suelo y se ha reportado que las dicotiledóneas (*i.e.* hojas de rosal) y otros vegetales lo contienen (Da Silva, 2014). En el caso del Ca encontrado en el jardín del hongo, este se obtiene a partir de las hojas que colectan las hormigas y es una aportación valiosa al suelo de los bosques tropicales y sabanas, ya que es un nutriente limitado en este tipo de suelos (Sternberg et al., 2007).

Es importante que se consideren los iones metálicos, que son el cofactor de algunas enzimas que secreta *L. gongylophorus* para su actividad enzimática. En el jardín del hongo, se ha sugerido que estos cofactores los adquieren del suelo de las cámaras de cultivo del hongo y/o de las hojas que le llevan las hormigas al hongo como sustrato (Burgmayer y Stiefel, 1985; Wichmann y Vasic-Racki, 2005). Por otro lado, Adalberto et al., (2016) investigaron la susceptibilidad de la enzima poligaracturonasa de *L. gongylophorus* e identificaron que la actividad de la enzima depende de la concentración de algunos cationes, con el siguiente orden de importancia:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ . El Mo participa como cofactor junto con el Fe en el complejo nitrogenasa de las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  atmosférico; el K interviene en la activación de varias enzimas, incluyendo las que participan en la síntesis de proteínas; el Mg es un cofactor importante en las reacciones que implican transferencia de grupos fosfato; y el S, a partir de sulfato, se activa con ATP, luego se reduce hasta sulfito y, finalmente, sulfhídrico, que ya tiene el estado de reducción adecuado para la incorporación del S (Burgmayer y Stiefel, 1985; Todar, 2005; Ruiz-Herrera et al., 2011).

Las variaciones de composición elemental del hongo aislado y del jardín del hongo fueron las siguientes: al hongo aislado se le adicionaron sales minerales a través del medio cultivo; en cambio, el jardín del hongo fue cultivado por las hormigas *A. mexicana* con hojas y pétalos de rosas sin la adición externa de sales minerales; otra diferencia importante es que *L. gongylophorus* aislado perdió la microbiota asociada al jardín del hongo. Cabe resaltar que en el jardín del hongo también se encuentran bacterias, principalmente de los géneros *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Citrobacter*. Estos microorganismos se han asociado con la biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis de la vitamina B, además de producir compuestos con actividad antimicrobiana, así como en procesos asociados a la fijación de nitrógeno y de la degradación de la pared celular vegetal (Shawabkeh et al., 2007; Taerum et al., 2007; Pinto-Tomás et al., 2009; Suen et al., 2010; Aylward et al., 2012; Huang et al., 2014; Bejarano, 2014;). Al respecto, Suen et al., (2010) identificaron que aproximadamente el 58% de las enzimas en el jardín del hongo son de origen bacteriano como las esterasas de carbohidratos y liasas de polisacáridos.

## 8. CONCLUSIONES

En primer lugar, se acepta la hipótesis: Cuando el hongo basidiomiceto *L. gongylophorus* se cultiva sin hormigas usando sustratos lignocelulósicos, bajo condiciones similares a las que se tienen en el jardín del hongo, se induce el crecimiento del hongo y la producción de enzimas hidrolíticas y oxidasas. En cuanto a los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> de *L. gongylophorus* LEU18496 en cultivos usando residuos lignocelulósicos, pasto o bagazo de caña, y en cultivos sumergidos con sustratos modelo, CM-celulosa, xilano o lignina, se encontraron actividades enzimáticas endoglucanasa, xilanasas y lacasa asociadas a la biodegradación de los sustratos lignocelulósicos. Los cultivos sólidos mostraron que el crecimiento de *L. gongylophorus* fue mejor en los cultivos hongo-pasto en comparación con los hongo-bagazo; además, las actividades de endoglucanasas y xilanasas fueron mayores en hongo-pasto. Las micrografías de MEBA mostraron los tamaños de las gongylidia, estas estructuras se encontraron en las puntas y en las partes medias de las hifas, habiendo más cantidad de gongylidia en el jardín del hongo que en el hongo aislado, lo que podría estar relacionado con la mayor producción de enzimas encontradas en el jardín del hongo. Asimismo, algunos de los COV's identificados en los cultivos de *L. gongylophorus* son también producidos por otros hongos, como el 2-etil furano, alcohol bencílico y benzaldehído que se identificaron como metabolitos asociados con la degradación de material vegetal. Otros COV's como linalol junto con el terpineol reportan que presentan actividad antimicrobiana. La capacidad metabólica de *L. gongylophorus* aislado de la hormiga *A. mexicana* puede utilizarse para recuperar enzimas lignocelulolíticas que contribuyan a la transformación en productos de valor agregado a partir de residuos lignocelulósicos, como bagazo de caña y pasto, utilizados como materias primas alternativas sin interferir con el suministro de alimentos. Las enzimas endoglucanasa, xilanasas y lacasa, por su parte, tienen diferentes aplicaciones tecnológicas, pero se necesitarían estudios adicionales

para acelerar la producción de enzimas en condiciones controladas en biorreactores de CS o CL. Finalmente, este estudio muestra que el hongo *L. gongylophorus* puede ser utilizado para la recuperación de enzimas con actividades de endoglucanasas, xilanasas y lacasas; además, se confirma que el hongo aislado mantiene su capacidad para crecer con materiales vegetales, aun sin la presencia de las hormigas. El estudio, además muestra el potencial que puede tener este hongo para aplicaciones biotecnológicas, tal como el ablandamiento de residuos lignocelulósicos y la obtención de azúcares para la obtención del bioetanol por medio de un proceso de fermentación.

## 9. PERSPECTIVAS

- ❖ Cuantificar el contenido de glucógeno tanto del jardín del hongo como en el hongo *L. gongylophorus* aislado, para comparar producción en la síntesis del glucógeno.
- ❖ Realizar una identificación por espectrometría de masas las bandas de proteínas encontradas en los geles de electroforesis para la identificación de las enzimas que secreta el hongo *L. gongylophorus*.
- ❖ Usar otros residuos lignocelulósicos por ejemplo bagazo de agave, olote de maíz o cáscaras de cítricos, para determinar y evaluar la producción de enzimas CAZymes y FOLymes.
- ❖ Realizar la desorción térmica de los COVs del jardín del hongo y compararlo con los resultados obtenidos en éste trabajo con *L. gongylophorus* aislado para la identificación de antibióticos o de inhibidores de crecimiento bacterial o micelial.
- ❖ A partir del jardín del hongo se aislen específicamente el grupo de bacterias actinomicetos (*Streptomyces* sp, *Pseudonocardia* sp y *Amicolaptosis* sp) que por su actividad metabólica sintetizan antibióticos como por ejemplo: Actinomicina D (que es el principio activo de un fármaco utilizado en quimioterapia exclusivamente para la terapia del cáncer), dentigerumicina (antifúngico), rifampicina y vancomicina (bactericidas), entre otros.



## 10. REFERENCIAS

- Abril, A.B., Bucher, E.H., 2002. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolize cellulose. *Ecol. Lett.* 5, 325–328. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00327.x>
- Adalberto, P.R., Golfeto, C.C., Moreira, A.C., Almeida, F.G., Ferreira, D., Cass, Q.B., Souza, D.H.F., 2016. Characterization of an Exopolygalacturonase from *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens*. *Adv. Enzym. Res.* 04, 7–19. <https://doi.org/10.4236/aer.2016.41002>
- Aissani, N., Urgeghe, P.P., Oplos, C., Saba, M., Tocco, G., Petretto, G.L., Elo, K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Ntalli, N., Caboni, P., 2015. Nematicidal Activity of the Volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6120–6125. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02425>
- Alviano, W.S., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, D.S., Bizzo, H.R., Souto-Pradón, T., Rodrigues, M.L., Bolognese, A.M., Alviano, C.S., Souza, M.M.G., 2005. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 101–105. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00201.x>
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 719–739. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006>

- Aviz, T.W.F., Dias, B.R., Auler, do A.S.C.C., Freitas, J.A.C., Fanchini, T.C.R., Pinheiro, de S.M.W.R., de Siqueira, F.G., de Paula-Elias, F.C., de Almeida, A.F., 2021. Minimal Enzymes Cocktail Development by Filamentous Fungi Consortia in Solid-State Cultivation and Valorization of Pineapple Crown Waste by Enzymatic Saccharification. *Waste and Biomass Valorization* 12, 2521–2539. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01199-8>
- Aylward, F.O., Burnum-Johnson, K.E., Tringe, S.G., Teiling, C., Tremmel, D.M., Moeller, J.A., Scott, J.J., Barry, K.W., Piehowski, P.D., Nicor, C.D., Malfatti, S.A., Monroe, M.E., Purvine, S.O., Goodwin, L.A., Smith, R.D., Weinstock, G.M., Gerardo, N.M.,
- Suen, G., Lipton, M.S., Currie, C.R., 2013. *Leucoagaricus gongylophorus* Produces Diverse Enzymes for the Degradation of Recalcitrant Plant Polymers in Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3770–3778.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.03833-12>
- Aylward, F.O., Burnum, K.E., Scott, J.J., Suen, G., Tringe, S.G., Adams, S.M., Barry, K.W., Nicora, C.D., Piehowski, P.D., Purvine, S.O., Starrett, G.J., Goodwin, L.A., Smith, R.D., Lipton, M.S., Currie, C.R., 2012. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *ISME J.* 6, 1688–1701.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.10>
- Bacci, M., Anversa, M.M., Pagnocca, F.C., 1995. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 385–386. <https://doi.org/10.1007/BF00872939>

- Batey, S.F.D., Greco, C., Hutchings, M.I., Wilkinson, B., 2020. Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 59, 172–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.001>
- Berish, C.W., 1986. Leaf-Cutting Ants (*Atta cephalotes*) Select Nitrogen-Rich Forage. *Am. Midl. Nat.* 115, 268. <https://doi.org/10.2307/2425863>
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254
- Bruner, G., Fernández-Marín, H., Touchon, J.C., Wcislo, W.T., 2012. Eggs of the blind snake, *Liotyphlops albirostris*, are incubated in a nest of the lower fungus-growing ant, *Apterostigma* cf. *goniodes*. *Psyche* (London) 2012.  
<https://doi.org/10.1155/2012/532314>
- Burgmayer, S.J.N., Stiefel, E.I., 1985. Molybdenum enzymes, cofactors, and systems: The chemical uniqueness of molybdenum. *J. Chem. Educ.* 62, 943. <https://doi.org/10.1021/ed062p943>
- Caldato, N., Forti, L.C., Bouchebti, S., Lopes, J.F.S., Fourcassié, V., 2016. Foraging activity pattern and herbivory rates of the grass-cutting ant *Atta capiguara*. *Insectes Soc.* 63, 421–428. <https://doi.org/10.1007/s00040-016-0479-x>
- Camarero, S., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2014. Understanding lignin biodegradation for the improved utilization of plant biomass in modern biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 8, 615–625. <https://doi.org/10.1002/bbb.1467>

- Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2010. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1889–1900. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8967-3>
- Cannella, D., Jørgensen, H., 2014. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? *Biotechnol. Bioeng.* 111, 59–68. <https://doi.org/10.1002/bit.25098>
- Carlson, A.L., Ishak, H.D., Kurian, J., Mikheyev, A.S., Gifford, I., Mueller, U.G., 2017. Nuclear populations of the multinucleate fungus of leafcutter ants can be dekarotized and recombined to manipulate growth of nutritive hyphal nodules harvested by the ants. *Mycologia* 109, 1–15. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1400304>
- Carrillo-González, G., Torres-Bustillos, L., 2019. *Biorefinerías y Economía Circular*, Primera. ed. Sección de Publicaciones División de Ciencias Sociales y Humanidades, México.
- Cordova-Lopez, Gutierrez-Rojas, M., E.Huerta, S., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, 1996. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnol. Tech.* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00161075>
- Costa, M., Torres, M., Magariños, H., Reyes, A., 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12, 163–175.
- Da Silva, L.C., 2014. Preparação e incorporação do substrato em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) emorfofuncionalidade mandibular em espécies de *Atta*. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Facultad de Ciencias Agronomicas Campus De Botucatu.

- De Fine, L.H.H., Boomsma, J.J., 2010. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. *Ecol. Entomol.* 35, 259–269.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01193.x>
- De Fine, L.H.H., Boomsma, J.J., Tunlid, A., 2014. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6675>
- De Fine, L.H.H., Schiott, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Nygaard, S., Roepstorff, P., Boomsma, J.J., 2013. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leafcutting ants and fungus-garden symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 583–587.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212709110>
- Erthal, M., Silva, C.P., Cooper, R.M., Samuels, R.I., 2009. Hydrolytic enzymes of leafcutting ant fungi. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 152, 54–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.09.086>
- Farji-Brener, Illes, 2000. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forests?: a critical review of the evidence. *Ecol. Lett.* 3, 219–227.  
<https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00134.x>
- Fernandez-Bou, A.S., Dierick, D., Swanson, A.C., Allen, M.F., Alvarado, A.G.F., ArtaviaLeón, A., Carrasquillo-Quintana, O., Lachman, D.A., Oberbauer, S., PintoTomás, A.A., Rodríguez-Reyes, Y., Rundel, P., Schwendenmann, L., Zelikova, T.J., Harmon, T.C., 2019. The Role of the Ecosystem Engineer, the Leaf-Cutter Ant *Atta cephalotes*, on Soil CO<sub>2</sub> Dynamics in a Wet Tropical Rainforest. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 124, 260–273. <https://doi.org/10.1029/2018JG004723>

- Grabber, J.H., 2005. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Sci.* 45, 820–831.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>
- Grell, M.N., Linde, T., Nygaard, S., Nielsen, K.L., Boomsma, J.J., Lange, L., 2013. The fungal symbiont of *Acromyrmex* leaf-cutting ants expresses the full spectrum of genes to degrade cellulose and other plant cell wall polysaccharides. *BMC Genomics* 14, 928.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-928>
- Hanif, A., Yasmeen, A., Rajoka, M.I., 2004. Induction, production, repression, and derepression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 94, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.013>
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. Host Tree Selection by the Neotropical Ant *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae). *Biotropica* 22, 213.  
<https://doi.org/10.2307/2388416>
- Ike, P.T. L., Birolli, W.G., dos Santos, D.M., Porto, A.L.M., Souza, D.H.F., 2019. Biodegradation of anthracene and different PAHs by a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 8675–8684. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04197-z>
- Infante-Rodríguez, D.A., Monribot-Villanueva, J.L., Mehltreter, K., Carrión, G.L., Lachaud, J.P., Velázquez-Narváez, A.C., Vásquez-Reyes, V.M., Valenzuela-González, J.E., Guerrero-Analco, J.A., 2020. Phytochemical characteristics of leaves determine foraging rate of the leaf-cutting ant *Atta mexicana* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*. <https://doi.org/10.1007/s00049-020-00306-4>

- Kabir, M.M., Wang, H., Lau, K.T., Cardona, F., 2012. Chemical treatments on plant-based natural fibre reinforced polymer composites: An overview. *Compos. Part B Eng.* 43, 2883–2892. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2012.04.053>
- Khadempour, L., Burnum-Johnson, K.E., Baker, E.S., Nicora, C.D., Webb-Robertson, B.J.M., White, R.A., Monroe, M.E., Huang, E.L., Smith, R.D., Currie, C.R., 2016. The fungal cultivar of leaf-cutter ants produces specific enzymes in response to different plant substrates. *Mol. Ecol.* 25, 5795–5805. <https://doi.org/10.1111/mec.13872>
- Kooij, P.W., Pullens, J.W.M., Boomsma, J.J., Schiøtt, M., 2016. Ant mediated redistribution of a xyloglucanase enzyme in fungus gardens of *Acromyrmex echinator*. *BMC Microbiol.* 16, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0697-4>
- Lange, L., Grell, M.N., 2014. The prominent role of fungi and fungal enzymes in the ant–fungus biomass conversion symbiosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4839–4851. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5708-5>
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quéré, J.L., Bonnarme, P., 2000. Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1517–1522. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1517-1522.2000>
- López-Riquelme, G.O., Malo, E.A., Cruz-López, L., Fanjul-Moles, M.L., 2006. Antennal olfactory sensitivity in response to task-related odours of three castes of the ant *Atta mexicana* (hymenoptera: formicidae). *Physiol. Entomol.* 31, 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2006.00526.x>

- López, S.C., Peng, M., Issak, T.Y., Daly, P., de Vries, R.P., Mäkelä, M.R., 2018. Induction of genes encoding plant cell wall-degrading carbohydrate-active enzymes by lignocellulose-derived monosaccharides and cellobiose in the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.00403-18>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lugo, M.A., Crespo, E.M., Cafaro, M., Jofré, L., 2013. Hongos asociados con dos poblaciones de *Acromyrmex lobicornis* (formicidae) de San Luis, Argentina. *Bol. la Soc. Argentina Bot.* 48, 5–15.
- Manzoor, S., 2018. Identificación y discriminación de microorganismos mediante espectroscopía láser (LIBS) y algoritmos matemáticos. Universidad Complutense de Madris, Facultad de Ciencias Químicas Departamento Química Analítica.
- Masiulionis, V.E., Rabeling, C., De Fine Licht, H.H., Schultz, T., Bacci, M., Santos Bezerra, C.M., Pagnocca, F.C., 2014. A Brazilian population of the asexual fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (formicidae, myrmicinae, attini) cultivates fungal symbionts with gongylidia-like structures. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103800>
- Mathew, A.P., Oksman, K., Sain, M., 2006. The effect of morphology and chemical characteristics of cellulose reinforcements on the crystallinity of polylactic acid. *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 300–310. <https://doi.org/10.1002/app.23346>
- Maya-Yescas, M.E., Revah, S., Le Borgne, S., Valenzuela, J., Palacios-González, E.,



- TerrésRojas, E., Viguera-Ramírez, G., 2021. Growth of *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer) and production of key enzymes in submerged and solid-state cultures with lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Lett.* 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03057-y>
- Mendonça, A. de L., da Silva, C.E., de Mesquita, F.L.T., Campos, R. da S., Do Nascimento, R.R., Ximenes, E.C.P. de A., Sant'Ana, A.E.G., 2009. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95, 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9312-0>
- Miyashira, C., Tanigushi, D., Gugliotta, A., Santos, D.Y.A., 2010. Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. *Brazilian J. Microbiol.* 41, 506–511. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200035>
- Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2012. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment- a review. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1430–1442. <https://doi.org/10.1002/bit.24464>
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z., 2012. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* 58, 225–247. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>
- Moreira-Soto, R.D., Sanchez, E., Currie, C.R., Pinto-Tomás, A.A., 2017. Ultrastructural and microbial analyses of cellulose degradation in leaf-cutter ant colonies. *Microbiology* 163, 1578–1589. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000546>

- Moreira, A.A., Forti, L.C., Andrade, A.P.P., Boaretto, M.A.C., Lopes, J.F.S., 2004. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). Stud. Neotrop. Fauna Environ. 39, 109–116. <https://doi.org/10.1080/01650520412331333756>
- Moser, J.C., 1963. Contents and Structure of *Atta texana* Nest in Summer. Ann. Entomol. Soc. Am. 56, 286–291. <https://doi.org/10.1093/aesa/56.3.286>
- Mueller, U.G., Mikheyev, A.S., Solomon, S.E., Cooper, M., 2011. Frontier mutualism: coevolutionary patterns at the northern range limit of the leaf-cutter ant–fungus symbiosis. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 278, 3050–3059. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0125>
- Nava-Cruz, N.Y., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar-González, M.A., Nuncio, A., Rodríguez Herrera, R., Aguilar, C.N., 2016. Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. 3 Biotech 6. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0426-6>
- Noge, K., 2019. Hexanal, a major volatile found in fresh peanut seed, elicits foraging behavior in the laboratory-reared brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae). J. Pestic. Sci. 44, 15–19. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-053>
- Pinches, S.E., Apps, P., 2007. Production in food of 1,3-pentadiene and styrene by *Trichoderma* species. Int. J. Food Microbiol. 116, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.001>

Rangel-León, E., Guzmán-Lagunes, F., Gómez-Rodríguez, J., Agiolar-Uscanga, M.G., 2006.

Establecimiento de las condiciones de hidrólisis del Bagazo de caña para la obtención máxima de xilosa y mínima De inhibidores. VII Simp. Int. Prod. alcoholes y levaduras 4435.

Richard, F.J., Mora, P., Errard, C., Rouland, C., 2005. Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. J.

Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 175, 297–303.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-005-0485-1>

Riley, R.G., Silverstein, R.M., Moser, J.C., 1974. Isolation, identification, synthesis and biological activity of volatile compounds from the heads of *Atta* ants. J. Insect Physiol. 20, 1629–1637. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(74\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(74)90092-4)

Rodriguez, J., Montoya-Lerma, J., Calle, Z., 2015. Effect of *Tithonia diversifolia* Mulch on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) Nests. J. Insect Sci. 15, 32–32.

<https://doi.org/10.1093/jisesa/iev015>

Ruiz, J., 2010. Hormigas zompopas (*Atta cephalotes*) influyen positivamente en la biodiversidad vegetal de bosques húmedos tropicales. Encuentro 29–41.

<https://doi.org/10.5377/encuentro.v42i86.64>

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Paré, P.W., 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 134, 1017–1026.

<https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>

Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.

Biotechnol. Adv. 27, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

- Schiøtt, M., De Fine Licht, H.H., Lange, L., Boomsma, J.J., 2008. Towards a molecular understanding of symbiont function: Identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. *BMC Microbiol.* 8, 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-40>
- Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D.W., Goss, R.J.M., Hutchings, M.I., 2011. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One* 6, 4–11.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022028>
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–28.  
[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00056-0)
- Silva, Aline, Bacci, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., 2006. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. *Curr. Microbiol.* 53, 68–71. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0431-1>
- Silva, A., Bacci, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., 2006. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiol. Res.* 161, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.11.001>
- Soon-Nang, P., Yun, K.L., Oliveira, F.M., Cho, E., Jin, D., Joong Ki, K., 2012. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe* 18, 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.001>

- Sternberg, L.D.S.L., Pinzon, M.C., Moreira, M.Z., Moutinho, P., Rojas, E.I., Herre, E.A., 2007. Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 315–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3746>
- Sun, Y., Cheng, J., 2002 Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00212-7)
- Syhre, M., Scotter, J.M., Chambers, S.T., 2008. Investigation into the production of 2Pentylfuran by *Aspergillus fumigatus* and other respiratory pathogens in vitro and human breath samples. *Med. Mycol.* 46, 209–215. <https://doi.org/10.1080/13693780701753800>
- Tellez, A., Arana, A., Aducho, M., Mercado, Y., 2016. Enzimas Lignocelulolíticas: Producción, Usos Y Perspectivas. *Panor. La Ind. Celul. Y Pap. Y Mater. Lignocelulósicos 2016* 64.
- Tian, M., Wai, A., Guha, T.K., Hausner, G., Yuan, Q., 2018. Production of Endoglucanase and Xylanase Using Food Waste by Solid-State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization* 9, 2391–2398. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0192-7>
- Vanderlaan, T.A., Ebach, M.C., Williams, D.M., Wilkins, J.S., 2013. Defining and redefining monophyly: Haeckel, Hennig, Ashlock, Nelson and the proliferation of definitions. *Aust. Syst. Bot.* 26, 347–355. <https://doi.org/10.1071/SB13031>
- Vigueras, G., Paredes-Hernández, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernández, R., Le Borgne, S., 2017. Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. *Lett. Appl. Microbiol.* 65, 173–181. <https://doi.org/10.1111/lam.12759>

- Waller, D.A., Moser, J.C., 1990. Invertebrate enemies and nest associates of the leaf-cutting ant *Atta texana* (Buckley) (Formicidae, Attini). *Appl. myrmecology, a world Perspect.* 256–273.
- Watanabe, H., Tokuda, G., 2010. Cellulolytic Systems in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 609–632. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085319>
- Wheatley, R., Hackett, C., Bruce, A., Kundzewicz, A., 1997. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. Inhibitory to wood decay fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 39, 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00015-2)
- Whitford, W.G., Eldridge, D.J., 2013. Effects of Ants and Termites on Soil and Geomorphological Processes, *Treatise on Geomorphology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374739-6.00335-3>
- Wichmann, R., Vasic-Racki, D., 2005. Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 92, 225–260. <https://doi.org/10.1007/b98911>
- <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:CNIN?f=Formicidae>

## 11.

## ANEXOS

### 11.1. Técnicas Analíticas

#### I. Determinación de proteína por el método de Bradford

Se determinaron las proteínas por el método de Bradford (1976), que consiste en la cuantificación de la unión del colorante, Azul de Coomassie G-250, a la proteína. Se comparó esta unión con diferentes cantidades de proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino (BSA 0.5 mg/ml). La cuantificación se hace midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a la longitud de onda de 595 nm. Se graficó la absorbancia vs la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de proteína estándar. Con esta curva de calibración, se pudo interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm.

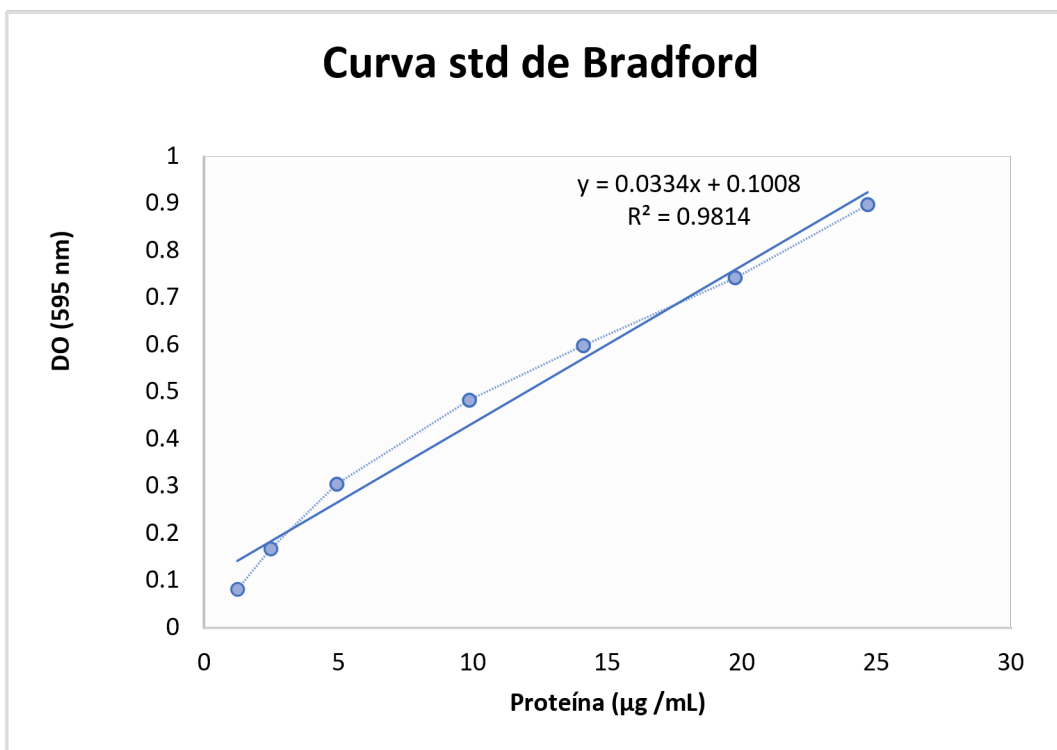
Almacenaje: Reactivo de Bradford 1x:2-8°C; Solución de Dilución: TA y Estándar de Proteína: -20°C

#### **Procedimiento:**

Se prepararon diluciones del estándar de proteína de 25, 50, 75 y 100 µg/mL, por triplicado. En 4 tubos Eppendorf, se añadió 5, 10, 15 y 20µL del estándar de proteína (BSA, 1.41 ug proteína/mL) y se aforaron a 100µL con Solución de Dilución. En otro tubo, que es el blanco, se le añadió 100µL Solución de Dilución. Se prepararon las muestras tomando un volumen de 100µL; Se adicionó a cada tubo 1 mL del reactivo de Bradford, se mezcló con agitador vórtex, se cubren de la luz a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, en un plazo no mayor de 1 hora. Se realizó la curva de calibración estándar graficando la Absorbancia vs la concentración de proteína estándar. Se determinó la concentración de proteína en las muestras a partir de la curva de calibración estándar y los valores de absorbancia a 595 nm. Cuando la concentración fue muy alta (queda fuera del rango del estándar), se diluyeron las muestras para la determinación.

## Resultados

Tubo	Proteína (µL)	PBS (µL)	Concentración de Proteína (mg de proteína/mL)	Volumen total (µL)	Concentración de Proteína (µg de proteína/mL)
1	14	786	0.025	800	24.675
2	28	1972	0.020	2000	19.74
3	8	792	0.014	800	14.1
4	0.020	1000	0.010	2000	9.87
5	0.010	1000	0.005	2000	4.935
6	0.005	1000	0.0025	2000	2.4675
7	0.0025	1000	0.0012	2000	1.23375
Blanco	0	1000	0	1000	0





## II. Determinación de proteínas por el método de Lowry

La cuantificación de la concentración de proteínas en la biomasa se realizó con el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951) modificado por Peterson (1977). El principio del método se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría entre 600 y 900 nm (con una absorbancia máxima a 750 nm).

Esta coloración se refuerza por el acomplejamiento de sulfato de cobre con los enlaces peptídicos de las proteínas. La intensidad de la coloración obtenida depende del número y de la naturaleza de los residuos que constituyen la proteína presente en la muestra a analizar ya que a iguales concentraciones dos proteínas diferentes no desarrollan la misma intensidad de color.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas:

1) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción.

El  $\text{Cu}^{2+}$ , se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador.

El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

## Procedimiento

### Curva estándar

En tubos Eppendorf: Se aforó con H<sub>2</sub>O la solución patrón a un ml. Posteriormente se adicionó 200 microlitros de la mezcla anterior en tubos, se realizó por triplicado. Se agregó 100 µL de solución A del Kit de Lowry y 800 µL de solución B del Kit de Lowry (volumen total 1.1 mL). Se dejó reposar esta mezcla durante 15 minutos en la obscuridad, y se midió a la densidad óptica (DO) de 750 nm.

### Muestra

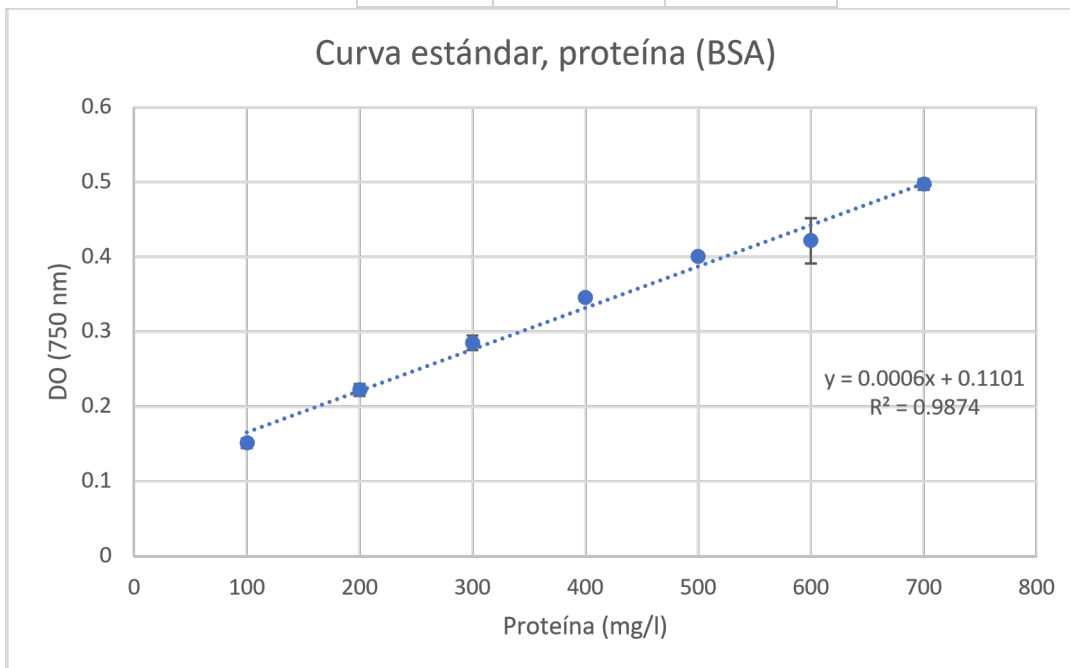
En tubos Eppendorf se adicionaron 400 µL de cada muestra, 400 µL de una solución de NaOH 0.2 N (vol. total = 800 µL). En baño María 15 min a baño María (100 °C). Se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm. Volumen total de 200 µL y se agregan nuevamente a otros tubos después al mismo volumen que para la curva patrón de solución A y solución B

Se dejó reposando durante 15 minutos en la obscuridad y posteriormente tomó lecturas de DO a 750 nm

### Resultados

Concentración, BSA		D.O. = 750 nm				
mg/L	muestra 1	muestra 2	muestra 3	Promedio	Desv Est	
100	0.1469	0.1581	0.1478	0.15093333	0.00622281	
200	0.2184	0.2167	0.2312	0.2221	0.00792654	
300	0.2802	0.2791	0.2964	0.28523333	0.00968624	
400	0.3511	0.3428	0.3422	0.34536667	0.00497427	
500	0.398	0.3982	0.4046	0.40026667	0.00375411	
600	0.4422	0.4354	0.3867	0.42143333	0.03027149	
700	0.5048	0.4917	0.4936	0.4967	0.00707884	

Concentración, BSA		
mg/L	Promedio	Desv Est
100	0.15093333	0.00622281
200	0.2221	0.00792654
300	0.28523333	0.00968624
400	0.34536667	0.00497427
500	0.40026667	0.00375411
600	0.42143333	0.03027149
700	0.4967	0.00707884



### III. Curva de calibración del CO<sub>2</sub>

Durante la descomposición de la materia orgánica, los nutrientes orgánicos se convierten en formas inorgánicas disponibles para las plantas. Esta conversión se conoce como mineralización. La mineralización del carbono, es decir, la evolución del CO<sub>2</sub> es un parámetro ligado al manejo de materiales orgánicos el cual representa una medición integral de la respiración, y representa la estimación de la actividad microbiana.

<b>Cromatógrafo</b>	<i>Gow-Mac (series 580)</i>
<b>Detector</b>	CT
<b>Columna</b>	CTRI
<b>Inyector</b>	50°C
<b>Horno</b>	40°C
<b>Detector</b>	115 °C
<b>Gas acarreador</b>	Helio, 4.4mL/min

Datos para la realización de la curva de calibración

<b>T (K)</b>	293	Temperatura ambiente 20°C
<b>Vol (L)</b>	0.125	
<b>R (atm.L/K.mol)</b>	0.082	
<b>P (atm)</b>	0.76	
<b>PM</b>	44	
<b><math>n = PV/RT</math></b>		para determinar el número de moles
<b><math>m = n * PM</math></b>		
<b><math>(0.125L) * (1m^3/100 0L)</math></b>		para determinar la masa

conocido										conc
Vol CO <sub>2</sub> ml	Vol CO <sub>2</sub> L	%CO <sub>2</sub>	Area	Area	Promedio	DS	n	g		[gm-3]
0.01	0.00001	0.008	24.711	21.21	22.9605	2.47558084	3.1632E-07	1.3918E-05		0.11
0.02	0.00002	0.016	24.17	20.343	22.2565	2.70609765	6.3265E-07	2.7837E-05		0.22
0.03	0.00003	0.024	25.598	26.952	26.275	0.95742258	9.4897E-07	4.1755E-05		0.33
0.075	0.000075	0.06	35.914	41.228	38.571	3.75756544	2.3724E-06	0.00010439		0.84
0.15	0.00015	0.12	58.022	79.556	68.789	15.2268374	4.7449E-06	0.00020877		1.67
0.312	0.000312	0.2496	82.611	97.774	90.1925	10.7218601	9.8693E-06	0.00043425		3.47
0.624	0.000624	0.4992	146.471	136.167	141.319	7.28602827	1.9739E-05	0.0008685		6.95
1.25	0.00125	1	245.075	256.108	250.5915	7.80150912	3.954E-05	0.00173978		13.92
2.5	0.0025	2	529.473	484.193	506.833	32.0177951	7.9081E-05	0.00347956		27.84
3.75	0.00375	3	692.812	720.284	706.548	19.4256375	0.00011862	0.00521935		41.75
6.25	0.00625	5	1002.026	1087.499	1044.7625	60.4385379	0.0001977	0.00869891		69.59
12	0.012	9.6	1.91E+03	1910.883	1.91E+03	3.21E+00	0.00037959	0.01670191		133.62

#### IV. DNS Azúcares reductores

El método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico), es un método indirecto se basa en que los productos de reacción serán detectados espectrofotométricamente, se lleva a cabo una reacción redox que ocurre entre el DNS (de color amarillo) y los azúcares reductores presentes en la muestra, tras su conversión en derivados coloreados (color rojo ladrillo). Es una técnica colorimétrica que emplea un procedimiento, seguido de la determinación espectrofotométrica a lectura de la absorbancia en la zona de 540-570 nm de los azúcares reductores. Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores para cuantificar los productos de una reacción enzimática o producidos durante una fermentación. Este método sus principales ventajas son su alta sensibilidad y su productividad debido a que es un método espectrofotométrico.

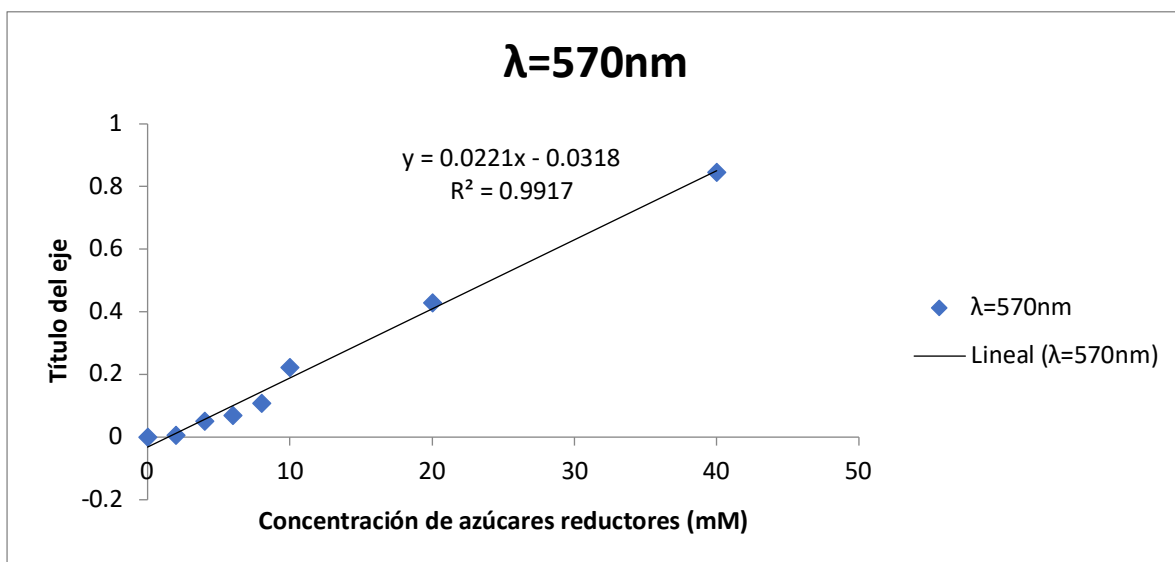
#### Procedimiento

##### Curva de calibrado de glucosa utilizando el método del DNS

A partir de una solución stock de glucosa 40 mM por dilución con 1% CMC en buffer de fosfatos, (pH 6.8) preparar una gama de soluciones del azúcar de distinta concentración, tal y como se indica en la Tabla. Hacer las diluciones en tubos de ensayo. Una vez hechas las mezclas, agitar bien para homogeneizar la solución.

**Tabla. Preparación de una gama de soluciones de glucosa de diferente concentración a partir de una solución stock de glucosa 40 mM.**

Tubo	Concentración (mM)	Buffer de fosfatos (ml)	Glucosa 40 mM (ml)
0 (Blanco)	0	5.0	0.0
1	2	4.75	0.25
2	4	4.5	0.5
3	6	4.25	0.75
4	8	4.0	1.0
5	10	3.75	1.25
6	20	2.5	2.5
7	40	0.0	5.0



## Procedimiento

### Blancos

Buffer fosfatos pH 6.8 1000uL + 1% CMC en buffer 500uL + DNS 1000uL

Buffer fosfatos pH 6.8 1000uL + 1% Xilano en buffer 500uL + DNS 1000uL

### Muestras

Extracto enzimático 500 uL + Buffer fosfatos pH 6.8 1000uL + DNS (control) 1000uL + 1%

CMC en buffer 500uL

Extracto enzimático 500 uL + Buffer fosfatos pH 6.8 1000uL + DNS (control) 1000uL + 1% Xilano en buffer 500uL

Después se incubaron a 100°C durante 10 minutos se colocaron en hielo y se

determinaron la absorbancia a 570nm. Por triplicado.

## **V. Oxidación del ABTS**

Algunos hongos poseen un sistema multienzimático sofisticado, que les permite desdoblar los nutrientes. Este sistema enzimático sofisticado es capaz de romper enlaces altamente polimerizados. Una de las principales enzimas que son causantes esta despolimerización es la lacasa. Estas enzimas se encuentran en hongos con una capacidad ligninolítica.

### **SOLUCIONES**

Solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M, 2000uL pH 4.

Solución de ABTS 5 mM, 250 mL en amortiguador de fosfatos pH6.

### **PROCEDIMIENTO**

Blanco: Solución amortiguador de acetato de sodio 0.1 M, 2000uL + Solución de ABTS 5 mM,, 100 uL.

Extracto enzimático, 600 uL + Solución amortiguador de acetato de sodio 0.1 M, 2000uL + Solución de ABTS 5 mM, 100 uL.

Homogeneizar agitando en el vortex. Incubarlo a 25 °C durante 10 minutos. Para la determinación con ABTS a  $\lambda=420$  nm

Una vez preparados todos los tubos, ajustar el blanco espectométrico y medir las demás muestras anotar las lecturas. Realizarlo por triplicado.



## **VI. Halos de hidrólisis**

Actividad Enzimática en cajas Petri de endoglucanasa y xilanasa

### **Actividad enzimática**

#### **Reactivos:**

Carboximetilcelulosa y Xilano de madera de abedul

#### **Procedimiento Halos de hidrólisis**

##### **Cajas Petri con los sustratos para la identificación de enzimas**

Se prepara medio de cultivo con 2 g/L de sustrato y 15 g/L agar bacteriológico. Se calienta hasta ebullición durante un minuto. Se esteriliza por 15 minutos, 15 psi y 121 °C y se vacía 10 mL de medio del correspondiente sustrato en cajas Petri en condiciones estériles.

Se van a realizar las cajas Petri con los diferentes sustratos (xilano, carboximetil celulosa)

Los análisis se realizaron por triplicado. Se agregó 10 uL, de extracto enzimático, en cada caja Petri, dejando secar la gota por alrededor de 10min, dejando un poco abierta la caja Petri.

Los halos de hidrólisis se revelan agregando 5 mL de solución Lugol de I<sub>2</sub> al 1% y KI al 2% excepto para pectinasas (20%). Se midieron el diámetro de los halos de hidrólisis y se calculó el área de hidrólisis. Con la siguiente fórmula:

$$A = (\pi) * (d/2)^2$$

Donde:

A: Área de hidrólisis (cm<sup>2</sup>).

d: diámetro del halo de hidrólisis (cm)

## 11.2 Análisis Estadístico

**Tabla A** Análisis elemental, por medio de la sonda dispersiva de rayos X acoplada a un microscopio electrónico, de barrido del hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, jardín del hongo y *Lg lab* (aislado)

Elemento	Jardín del hongo	<i>Lg Lab</i> promedio (%)	promedio (%)
C	48.65 ± 0.27		47.92 ± 0.19
N	6.73 ± 0.12		8.99 ± 0.15
O	38.1 ± 0.22		39.93 ± 0.76
Fe	2.76 ± 0.05		2.18 ± 0.14
Mg	0.58 ± 0.01		0.23 ± 0.01
Na	ND		1.37 ± 0.04
Al	0.28 ± 0.01		ND
Si	0.23 ± 0.01		ND
P	0.69 ± 0.01		2.11 ± 0.01

\*ND: No se detectó

En el análisis estadístico se muestran los valores medios, los elementos C, O y Fe cumplieron normalidad con la prueba T de Wilcoxon  $p > 0.05$  y homogeneidad de varianzas, y a través de una comparación de medias, se encuentra que no existe diferencia significativa entre las dos muestras en esos elementos. Por otro lado, la prueba T de Wilcoxon aplicada a los elementos N, Mg, Na, Al, Si, y P, mostró una  $p < 0.05$ , en todos los casos, por lo que se concluye que si hay diferencia significativa entre los elementos del jardín del hongo con respecto a los del hongo aislado.

Se plantearon las siguientes hipótesis, nula y alterna:

$$H_0: \mu_H = \mu_L$$

$$H_a: \mu_H \neq \mu_L$$

Definimos un nivel de significancia del 5%, es decir un alfa de 0.05.

Por medio de la prueba de Shapiro, con el criterio que si  $p > 0.05$ , se refiera a que si cumple con la distribución Normal. Cuando el valor de  $p > 0.05$  indica que las varianzas son iguales y se cumple con los supuestos para que se realice la prueba de t. En cambio, con  $p < 0.05$  en la prueba de Shapiro, no cumple con la normalidad y se realizaría la prueba no paramétrica. Los resultados se encuentran en la Tabla C. Es decir, se eligió la prueba paramétrica t-student y la prueba no paramétrica prueba T de Wilcoxon.

En la cuantificación del análisis elemental los elementos: Carbono, Oxígeno y el Hierro cumplen con la normalidad con  $p > 0.05$  y con la homogeneidad de varianzas por lo que se realizó t-student resultando que la  $H_a$  fue falsa y se acepta  $H_o$ , es decir, las medias son iguales. Por lo tanto, no existe una diferencia estadística significativa entre las dos muestras en esos elementos, Tabla B.

**Tabla B** Resultados del análisis estadístico de los elementos C, O y Fe

Elemento	Valor t	IC al 95% para la diferencia	
		Inferior	Superior
C total	$t_{(4)}=3.1366, P= 0.03496$	Media + 1.37618243	Media + 50.03
O total	$t_{(4)}=-3.2944, P=0.03009$	Media+(-3.3722813)	Media+(-0.2877187)
Fe total	$t_{(4)}=5.5385, P=0.005196$	Media +( 0.2892455)	Media+0.8707545

**Tabla C.** Resultados obtenidos donde se corroboró la normalidad con  $p>0.05$  (sugiero que

quitemos la tabla, solo que te la explico antes)

Elemento	Shapiro	$p > 0.05$ (Si/No)
C_total	0.9826	Si
O_total	0.256	Si
Fe_total	0.2976	Si
N_total	0.03861	No
Mg_total	0.01719	No
Na_total	0.006498	No
Al_total	0.008087	No
Si_total	0.008613	No
P_total	0.005684	No

Por otra parte, con la prueba de T de Wilcoxon con los siguientes elementos: N, Mg, Na, Al, Si, y P, siendo  $p < 0.05$ , en todos los casos, se rechaza la hipótesis nula. Por lo que se concluye que hay diferencias significativas en los elementos después de aislar al hongo. En los elementos Al, Si y Mo no se identificaron en el hongo aislado sólo en el jardín del hongo. Y en el caso del Na sólo se identificó en el hongo aislado. Todas estas variaciones son debidas al aislamiento del hongo y al medio mineral que se le proporcionó al hongo aislado, en el caso del jardín del hongo creció con las hormigas *Atta mexicana* que lo cultivaban con hojas y pétalos de rosas. Cuando se comparó el jardín del hongo con respecto al hongo aislado se presentó en menor proporción N, y P; en cambio, en mayor proporción Mg.

### 11.3 Actividades realizadas durante el Doctorado

#### Artículos indexados

Maya-Yescas M, Revah S, Le Borgne S, Valenzuela J, Palacios-González E, TerrésRojas E, Viguera-Ramírez G. Growth of *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer) and production of key enzymes in submerged and solid-state cultures with lignocellulosic substrates. *Biotechnol Lett* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03057-y>.

#### Participación en congresos:

- Maya-Yescas M, Le Borgne S, Revah S, Favela-Torres E, Palacios-González E, Terrés-Rojas E, Viguera-Ramírez G. Disposición de celulosa, hemicelulosa y lignina durante el ablandamiento del bagazo de caña y agave con el hongo *L. gongylophorus* basado en sustratos modelo. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato, México. 2019 (Cartel).
- Le Borgne S, Sabido A, Lemus P, Maya-Yescas M, Viguera-Ramírez G, PedrazaSegura L. Actividades enzimáticas celulasa y xilanasa y degradación de lignina en levaduras aisladas de desechos de la hormiga forrajera *Atta mexicana*. XVIII.

- Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato, México.  
2019 (Cartel).
- Maya-Yescas M, Revah S, Le Borgne S, Terrés-Rojas E, Viguera-Ramírez G. Crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus* en cultivo sólido sin hormigas y usando pasto *Pennisetum clandestinum* como sustrato. XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ. San José del Cabo, BCS, México 2018 (Cartel) .
- Viguera G, Maya-Yescas M, Revah S, Palacios-González E, Terrés-Rojas E, Le Borgne S. Cultivo sólido de *Leucoagaricus gongylophorus* usando pasto *Pennisetum clandestinum* como sustrato. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 2017 (Cartel).
- Maya-Yescas M, Revah S, Palacios-González E, Terrés-Rojas E, Viguera G. Ablandamiento de residuos lignocelulósicos usando a *Leucoagaricus gongylophorus* el hongo simbionte de la hormiga cortadora de hojas *Atta mexicana*. XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México. 2017 (Presentación oral).
- Maya-Yescas M, Viguera G. Estudio de las capacidades metabólicas de *Leucoagaricus gongylophorus* en cultivo sólido con sustratos lignocelulósicos. III Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. Cuajimalpa, CDMX, México. 2016 (Presentación oral).

### **Conferencias de divulgación**

- Semana de Ciencias en el Colegio Bilbao con la conferencia: “Investigando a hongos y hormigas nacionales, un equipo por el medio ambiente” .
- Ciclo de conferencias para niñas, niños y jóvenes. La ciencia en tu vida. Con la conferencia “Hormigas y hongos en interacción” .

### **Asistencia a cursos**

- Teórico-práctico. Introducción a la Estadística en Química de Productos Naturales.
- Teórico-práctico. “Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF”.