

Bioprospección de hongos edáficos de la Universidad Iberoamericana Puebla

Suárez Carrera, Daniel

2024

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/6012>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Bioprospección de hongos edáficos de la Universidad Iberoamericana Puebla

Martínez Portillo Nancy (quinto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Suárez Carrera Daniel (quinto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Ramírez Rodríguez Rocío (profesora responsable)¹

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

Resumen

La bioprospección de hongos ha demostrado ser una herramienta importante para la exploración, descubrimiento e identificación de compuestos bioactivos a partir de organismos vivos. Estos compuestos, principalmente metabolitos secundarios, tienen aplicaciones en el sector farmacéutico, microbiológico, biotecnológico, de alimentos y de textiles, siendo de suma importancia para el mejoramiento y eficiencia de procesos industriales, así como el desarrollo de nuevos productos funcionales. En este trabajo se realizó la bioprospección de hongos edáficos de la Universidad Iberoamericana Puebla. Se tomaron muestras de tres zonas de la universidad para la obtención de hifas por medio del método de Warcup y del método de tratamiento ácido, las muestras se incubaron a 25°C por un lapso de 5 a 7 días. Para el aislamiento de las hifas se llevaron a cabo tres resiembras en medio PDA. Para comprobar la actividad de enzimas amilasa, catalasa, proteasa, peroxidasa y lacasa se cultivaron las hifas aisladas en medios de cultivo de agar PDA, PCA, leche, lacasa y azo por triplicado. Finalmente la evaluación de la actividad enzimática se hizo cualitativamente, registrando cambios de coloración en el medio de cultivo, formación de halos alrededor de las colonias y cambios físicos en las colonias. Los resultados para la obtención de hongos indicaron que hubo una mayor rapidez de crecimiento y densidad de hifas en Warcup comparando con Tratamiento Ácido y, en las pruebas enzimáticas, los aislados mostraron por lo menos una actividad enzimática de cuatro enzimas a evaluar. Dos hifas mostraron tres actividades enzimáticas, potenciales para exploración e investigación.

Palabras clave: bioprospección de hongos edáficos, metabolitos secundarios, actividad enzimática.

***Autor Corresponsal:** daniel.suarez@iberopuebla.mx

Introducción

La bioprospección está definida como la búsqueda sistemática de componentes naturales y organismos completos de la biodiversidad con el fin de otorgarles un valor para el desarrollo de productos. La bioprospección de metabolitos secundarios ya sea de bacterias, hongos, plantas, etc., otorga una gran riqueza ya que de estos se pueden obtener metabolitos con alto valor agregado. Esta rama genera productos que tienen relación con industrias como la industria farmacéutica, biotecnológica, agroquímica, alimentos, textil, entre muchas otras [1].

Los hongos edáficos, también conocidos como hongos de suelo u hongos microscópicos, tienen un importante valor ecológico ya que contribuyen al ciclo de nutrientes al descomponer materia orgánica, a la regulación y crecimiento de poblaciones de plantas y en la generación de productos (metabolitos secundarios) que pueden ser útiles para investigación y desarrollo de nuevas tecnologías relacionadas al campo de la biotecnología. Son tolerantes a grandes concentraciones de contaminantes y a bajos niveles de pH, lo cual hace que trabajar con hongos edáficos sea relevante para varios sectores de la industria y de la investigación científica [2].

Estos hongos se distribuyen principalmente en el horizonte O y el horizonte A (fig 1) del perfil edáfico, donde se encuentra la mayor parte de materia orgánica en descomposición y una parte importante de humedad en el suelo, favoreciendo la aparición de microorganismos presentes en suelo [3]. Bajo ciertas condiciones ambientales, los hongos edáficos sintetizan diversos metabolitos secundarios como compuestos nitrogenados, esteroides, compuestos fenólicos, terpenoides, quinonas y enzimas de

uso biotecnológico [4]. Existen diversas investigaciones donde se aíslan hongos edáficos y se buscan metabolitos secundarios como es el caso de [4] y [5] donde en muestras de suelo y en cepas previamente aisladas se extraen productos formados de hongos, identificando molecularmente el tipo de metabolito presente en esas cepas, el perfil del metabolito de cepas específicas junto con la caracterización morfológica de los hongos, siendo las enzimas por su potencial industrial el producto más relevante.

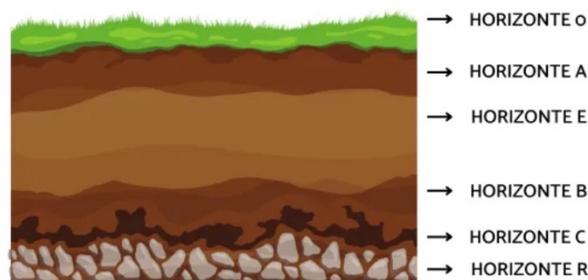


Fig. 1. Representación gráfica de los horizontes del suelo.

Dentro de este panorama, realizar estudios de actividad enzimática de hongos edáficos es de suma importancia ya que ofrece observaciones valiosas sobre la diversidad funcional y las capacidades biotecnológicas de estos organismos. A través de la búsqueda de los componentes que definen a la bioprospección (obtención de cepas, aislamiento de las cepas, evaluación de sus metabolitos secundarios y desarrollo de productos) se pueden implementar nuevas aplicaciones biotecnológicas que contribuyan significativamente al avance del conocimiento científico en el ámbito de la microbiología y la bioquímica. Este

documento realizó un estudio de bioprospección de hongos edáficos realizado en la Universidad Iberoamericana Puebla, con el fin de recabar información valiosa acerca de la diversidad que existe en estos entornos de la universidad, así como el potencial biotecnológico derivado de los productos obtenidos de hongos edáficos.

Metodología

Área de estudio

Se escogieron tres áreas de estudio dentro de la Universidad Iberoamericana Puebla, ubicada en el municipio de San Andrés Cholula del estado de Puebla: 1) Zona A (zA): jardines a un costado de la entrada principal del Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) ($19^{\circ}1'48''N$, $98^{\circ}14'31''O$); 2) zona B (zB): suelo a un costado del lago, enfrente del edificio C ($19^{\circ}1'54''N$, $98^{\circ}14'27''O$); 3) zona C (zC): suelos en las entradas entre el edificio G y el edificio H, a un costado del estacionamiento techado ($19^{\circ}1'53''N$, $98^{\circ}14'30''O$) (Fig. 2). La vegetación en las tres zonas presenta las mismas especies vegetativas. Esta vegetación se caracteriza por la presencia de árboles como *Ficus benjamina*, *Cupressus*, *Pinus tadea*, *Pinus radiata* y *Taxodium mucronatum*.

Estas áreas fueron tomadas en cuenta por contar con diversos factores que pueden determinar la presencia de hongos edáficos, como la irrigación diaria o la vegetación presente en el suelo.

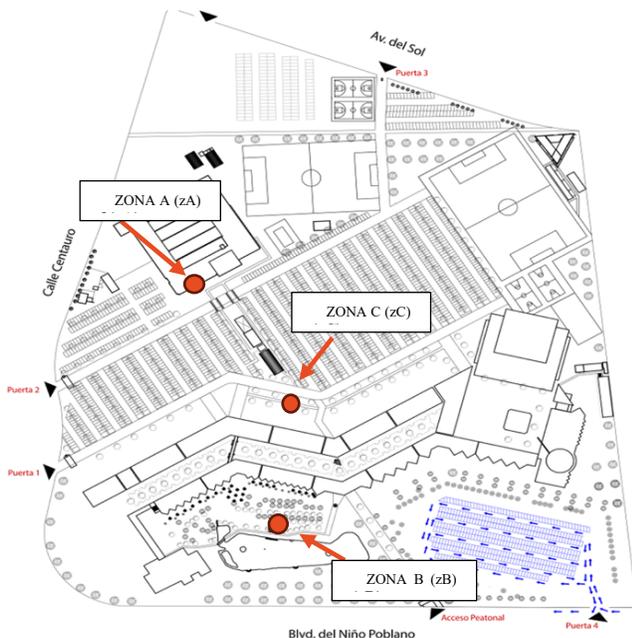


Fig. 2. Mapa de la Universidad Iberoamericana Puebla marcado con zonas para muestreo.

Recolección de muestras biológicas

Se recolectaron un total de tres muestras de suelo durante el mes de marzo de 2024 correspondientes a: una muestra de zA, una de zB y una de zC (Fig 2.), las muestras se tomaron con ayuda de una pala de jardinería tomando 50 g del horizonte del suelo O (tomando el suelo desde la superficie hasta una profundidad de dos centímetros) y 50 g del

horizonte de suelo A (desde una profundidad de dos hasta diez centímetros) (fig.1). Las muestras se colocaron en bolsas estériles marca Whirlpak, anotando en ellas la zona. Posteriormente se cerraron y se mezclaron en un lapso de 5 minutos hasta homogeneizar haciendo movimientos rotarios en la bolsa, una vez mezcladas se almacenaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad Iberoamericana Puebla.

Aislamiento de hongos microscópicos

A partir de las muestras de suelo, se emplearon dos metodologías. La primera se basa en el método de placa de suelo Warcup [11] la cual consistió en agregar 100 mg de suelo en tres caja petri estériles (cada caja para una muestra de suelo) utilizando una espátula. Posteriormente se añadieron entre 10 y 15 mL de medio de Agar Papa Dextrosa (PDA) derretido y enfriado a una temperatura de $40^{\circ}C$ a $45^{\circ}C$ a cada caja petri conteniendo la muestra de suelo. Tras la adición del medio, se dispersaron las partículas de suelo a lo largo de toda la superficie del medio mediante una rotación suave de las cajas de petri. Una vez dispersas, las placas se solidificaron y se incubaron a una temperatura de $25^{\circ}C$ durante un periodo de 5 a 7 días en estufas de cultivo para la formación de hongos en las cajas de petri.

La segunda se denominó Tratamiento Ácido (TA) [12], que consistió en mezclar aproximadamente 3 g de suelo con 15 mL de ácido acético al 5% en un tubo de ensayo, agitando de manera manual con la ayuda de una espátula hasta lograr una buena incorporación de la solución de ácido con la muestra de suelo. Se esperaron 20 minutos para permitir la sedimentación, se eliminó el sobrenadante y se lavó el suelo una vez con 10 mL de agua destilada. Posteriormente se tomó 1 mL de la suspensión de suelo y se añadió al medio de cultivo PDA. Las muestras se incubaron durante 5 a 7 días a $25^{\circ}C$ hasta la formación de las hifas. Este procedimiento se repitió con las otras dos muestras de suelo.

Posterior al tiempo de incubación se observó el crecimiento de las hifas obtenidas por ambos métodos en las placas de petri, después se aisló a cada una de las hifas formadas tomando una pequeña muestra del PDA con un asa bacteriológica e inoculándola en medio de cultivo PDA estéril. Una vez inoculado el medio, estos se incubaron durante una semana a $25^{\circ}C$ hasta observar el crecimiento de hifas. De las hifas formadas se realizó una estimación visual, donde se seleccionaron y descartaron las hifas en cuanto a repetición o rareza de aparición en las cajas de petri. Los aislamientos se realizaron hasta obtener una cepa pura, dependiendo del número de hifas obtenidas y de la frecuencia con que se presentaron. Para determinar las similitudes entre los hongos edáficos aislados se empleó una tinción con azul de metileno y se examinaron los aislamientos bajo el microscopio óptico Zeiss Primo Star utilizando diversos objetivos (10x, 40x y 100x), siendo el último objetivo donde se utilizó aceite de inmersión

Evaluación de enzimas de los hongos microscópicos obtenidos

Las enzimas que se identificaron fueron las siguientes: amilasa, catalasa, proteasa, peroxidasa y lacasa. Para identificar la presencia de amilasa (medio PCA) se

mezclaron 2.5g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona de caseína, 15g/L de agar-agar y 2 g/L de almidón, el reactivo fue Lugol. Para la identificación de catalasa se agregaron 39g/L de medio PDA y el reactivo fue peróxido de hidrógeno. Para la identificación de proteasa (medio agar leche) se mezclaron 2.5g/L de extracto de levadura, 5g/L de peptona, 15g/L de agar-agar, 1g/L de glucosa y 28g/L de leche baja en grasa y alta en proteínas, el reactivo fue ácido acético. Para la peroxidasa (medio azo) se mezclaron 6g/L de peptona, 15g/L de agar-agar, 20g/L de glucosa, 20g/L de extracto de malta y 200mg/L de colorante azoico. Para la identificación de lacasa (medio lacasa-guaiacol) se mezclaron 15g/L de agar extracto de malta, 2g/L de extracto de levadura, 2g/L de peptona de caseína, 0.014g/L de sulfato de cobre y 0.274 μ L de Guaiacol. Todas las evaluaciones se realizaron en placas petri, a una temperatura de 30°C con todos los hongos obtenidos previamente. La formulación de los medios se obtuvo con datos referenciados [14][15][16][17].

Resultados y discusiones

De los métodos probados: Warcup y TA se observó visualmente que el primero tuvo una mayor eficiencia para que se formaran y crecieran los hongos provenientes de zA, zB y zC en un periodo corto de tiempo en comparación con el método TA donde hubo crecimiento de hongos provenientes de zA y zB, mientras que de zC hubo presencia de un solo tipo de hongo después de 6 días de incubación (ver Fig. 3). En la Fig. 4, se presenta la evolución de los métodos empleados en el crecimiento de las hifas obtenidas, mostrando del lado izquierdo el día cero de la siembra y el lado derecho el crecimiento del día 6. La Fig. 4b. muestra el crecimiento de dos especies de hongos, uno de ellos presentó hifas de color negro, textura porosa o grumosa y no creció en toda la superficie del medio de cultivo. El segundo hongo fue el producto de micelio contaminado por esporas de otro hongo, modificando el color del micelio y desarrollándose en la mayoría de la superficie del medio. En la Fig. 4d. la hifa es de color blanco (color general del micelio), su textura es similar a la de algodón por sus filamentos y desde el primer día de incubación hasta el último no hubo cambios en su coloración o en su apariencia física. En la Fig. 4f. la hifa presentó un color amarillo-blanco con textura filamentosa y creció en el centro de la placa de petri, el segundo hongo presente en la placa fue micelio contaminado por esporas verdes rodeando al primer hongo, su textura fue grumosa. En la Fig. 4i. la incubación hasta el sexto día presentó un hongo formado en el centro de la caja de petri, de color verde en su centro y con bordes blancos con gris, no hubo esparcimiento por todo el medio de cultivo. Se hizo omisión de varias muestras por su apariencia repetida, sin embargo se puede consultar el archivo fotográfico del proyecto donde se presenta la totalidad de las muestras (zA1, zA2, zA3, zB1, zB2, zC1, zC2, zTAC1 y zTAC2), junto con su crecimiento

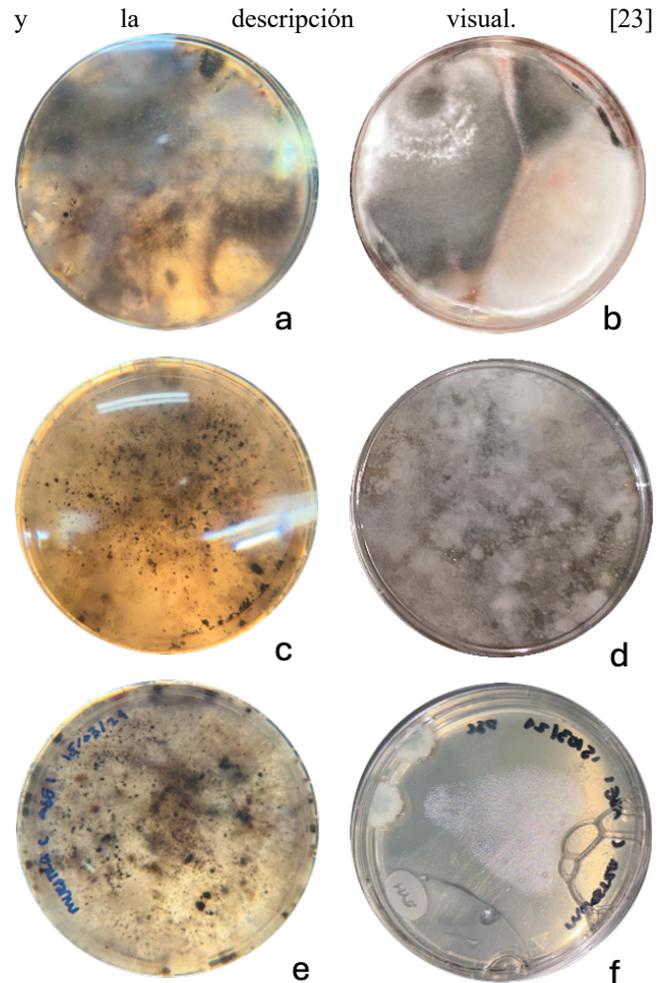


Fig. 3. Placas de petri con hongos obtenidos por métodos de Warcup y TA. De la a), c) y e) se observan muestras de zA, zB y zC por Warcup; de la b), e) y f) se observan muestras de zA, zB y zC por método TA.

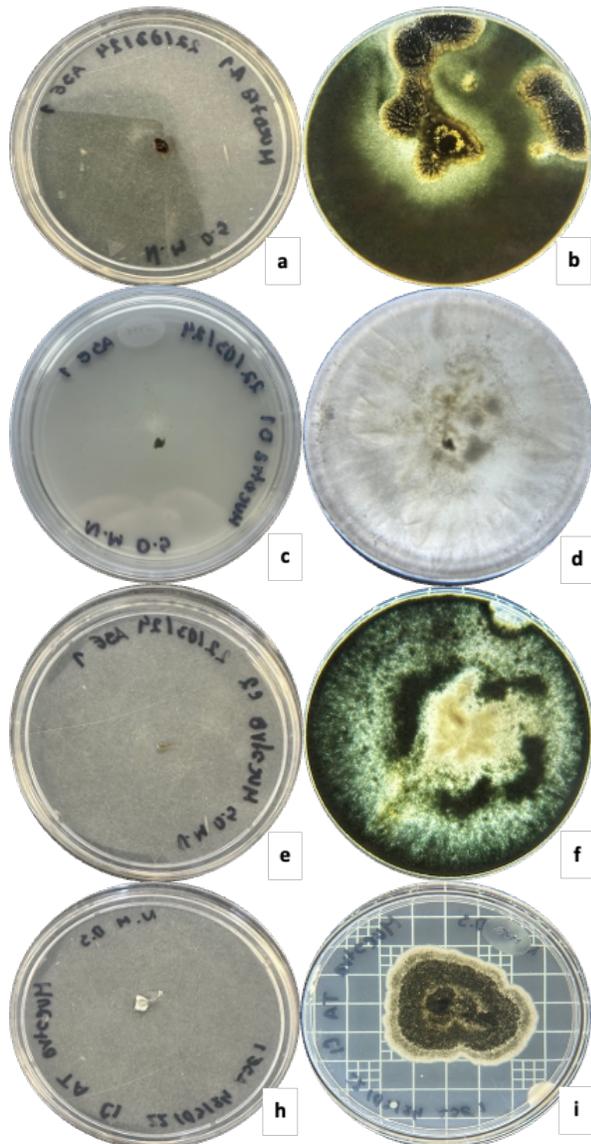


Fig. 4. Aislados de hongos edáficos con los métodos de Warcup y TA. De la a) a la f) se muestran los aislados por el método de Warcup; de la h) a la i) los del método TA. De la izquierda muestran el día 0, mientras que el de la derecha al sexto día de la incubación.

En la Fig. 5, se presentan los hongos obtenidos en su aislamiento final, donde se hizo una visualización de los hongos para descartarlos por repetición de aparición, seleccionando 4 tipos de hongo. De la Fig. 5a se observa el hongo formado de color negro de textura porosa que se extendió por todo el medio de cultivo al cual se le asignó la clave zAA1 para su identificación. En la Fig. 5c se encuentra la hifa con clave zAA3 la cual presentó un color verde olivo en toda su estructura, de textura grumosa extendiéndose por casi toda la superficie de la caja de petri, la colonia en el centro presenta una mayor formación y densidad en sus

estructuras que las que se encuentran en su alrededor. El hongo que se encuentra en la Fig. 5e fue asignado con la clave zBB2, el cual fue de color blanco, de textura algodonosa y que se extendió en todo el medio de cultivo, puede ser considerado como micelio por su parecido con el color y la textura del mismo. Por último está el hongo con clave zTACC1 en la Fig. 5g, el cual presentó un color verde olivo en el centro de la colonia rodeado de filamentos blancos con gris, su textura era arenosa en el área de color verde, desarrollándose en pequeñas colonias individuales en la mayor parte del medio de cultivo.

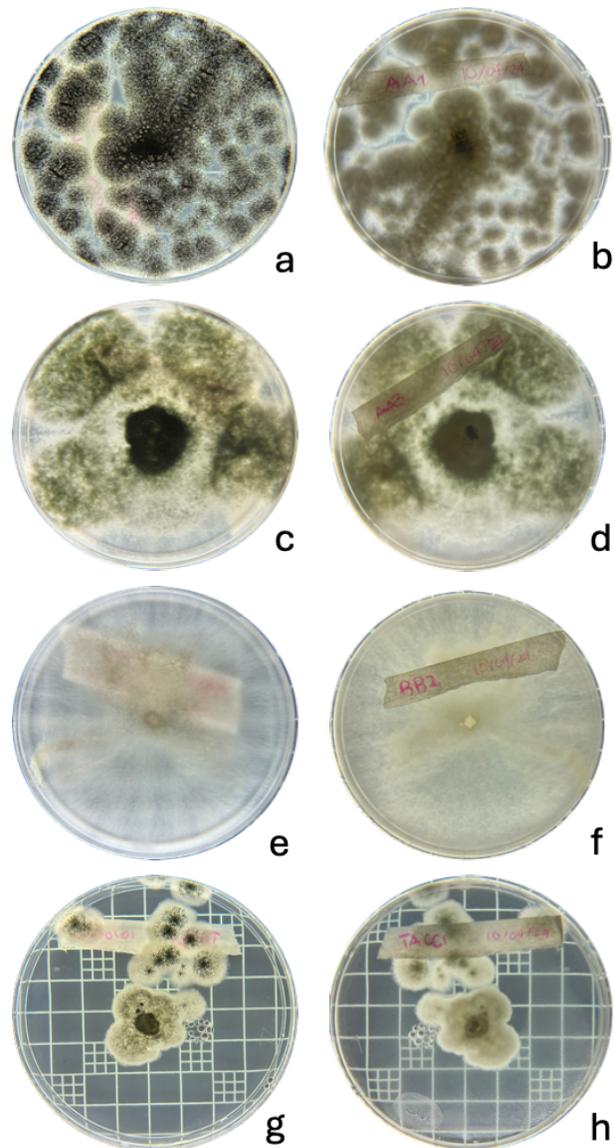


Fig. 5. Hongos aislados. De a) y b) se observa el hongo zAA1; de la c) y d) se observa el hongo zAA3; de la e) y f) se observa el hongo zBB2 y de la g) y h) se observa el hongo zTACC1.

En la Fig. 6 se presentan a los aislados finales junto con la observación a 100x bajo el microscopio óptico con tinción de azul de metileno, las muestras fueron observadas previo a la realización de las pruebas enzimáticas. Las muestras fueron vistas con los objetivos de 10x, 40x y 100x, siendo el

objetivo de 100x el mejor para observar a profundidad las estructuras de las hifas y las esporas de los cuatro hongos obtenidos. El orden de aparición de las muestras fue, del lado izquierdo, zAA1, zAA3, zBB2 y zTACC1 (ver Fig. 6a, 6c, 6e y 6h) mientras que del lado derecho se observan las estructuras microscópicamente (ver Fig. 6b, 6d, 6f y 6i) de hifas y esporas, diferenciándose entre sí ya que las esporas son de forma circular, pequeñas y aglomeradas o separadas, mientras que las hifas son estructuras filamentosas largas que tienen divisiones claras que las separan de otras estructuras.

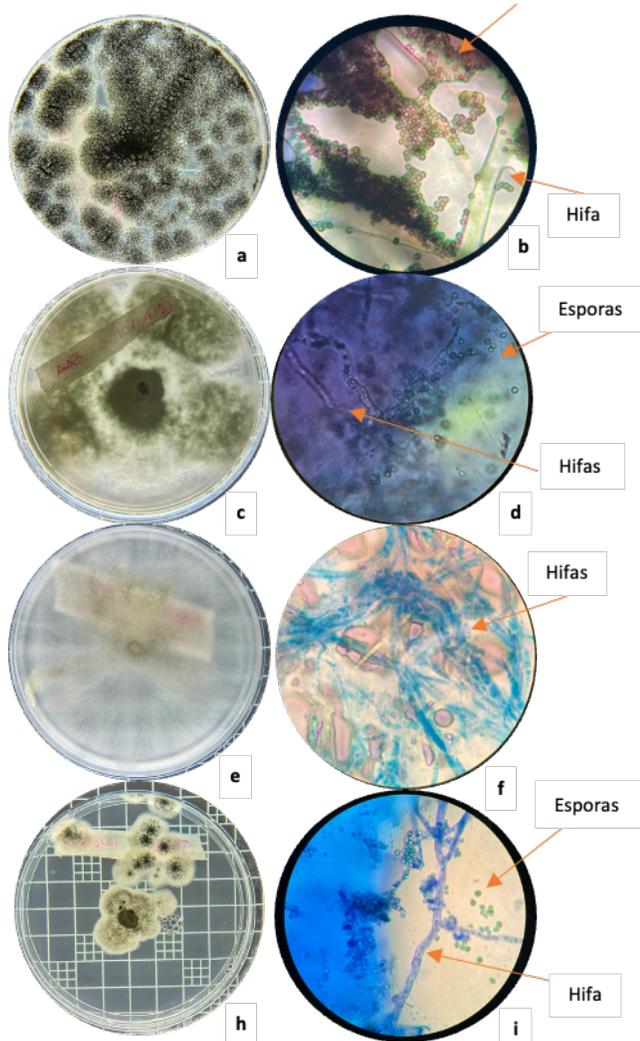


Fig. 6. Observación microscópica de hifas y esporas en objetivo 100x.

En la evaluación visual de las pruebas enzimáticas se ensayaron 5 enzimas comúnmente presentes en hongos edáficos, las cuales fueron amilasa, catalasa, proteasa, peroxidasa y lacasa. En la Fig. 7 se presentan los cinco medios de cultivo formulados que se utilizaron para la siembra de los aislados finales. Para realizar las pruebas enzimáticas primero había que evaluar el crecimiento de los hongos en estos medios, donde se hizo un monitoreo diario hasta 5 días del crecimiento de cada hongo. Todos los hongos se desarrollaron en su totalidad en los cinco medios de cultivo, variando en tamaño de las hifas o la presencia de esporas, como fue el caso de zAA1 donde en medio PCA y

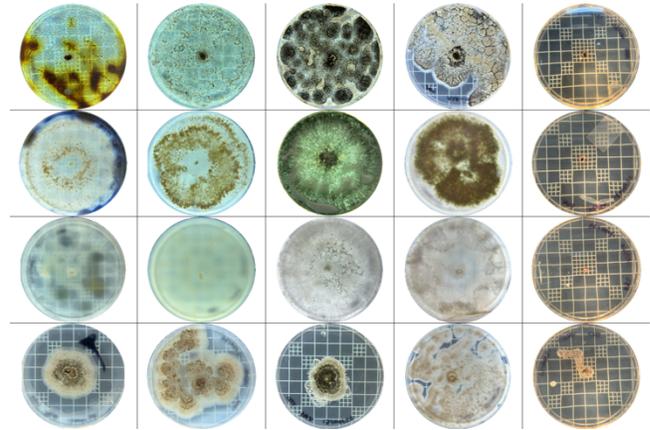


Fig 7. Pruebas enzimáticas con hongos aislados obtenidos. De izquierda a derecha se observan: medio PCA, medio leche, medio PDA, medio azo y medio lacasa; de arriba hacia abajo se observa hongo zAA1, zAA3, zBB2 y zTACC1.

en medio leche no tuvo la misma densidad en relación a las hifas y esporas en comparación con el medio PDA o medio azo. Las muestras zAA3 y zBB2 tuvieron un comportamiento de crecimiento normal en todos los medios de cultivo, para zTACC1 el tamaño del hongo varió en el medio leche y el medio azo, donde se observa que el hongo cubrió casi en su totalidad a las cajas de petri en comparación con el medio PCA y PDA donde solo se formó un hongo en el centro de la caja. Para el medio lacasa-guaiacol hubo nulo crecimiento en cada una de las siembras que se realizaron, esto puede surgir de la formulación y los ingredientes del medio de cultivo como fue el sulfato de cobre y el guaiacol aunque no hay certeza cierta de qué haya provocado que no se generaran ninguno de los hongos aislados. La hifa

zTACC1 que se formó en el medio lacasa-guaiacol no fue tomada en cuenta para la evaluación de su actividad

enzimática ya que no demostraba lo que se quería obtener, siendo la formación total de la hifa en el medio de cultivo.

Tabla 1. Enzimas encontradas al realizar pruebas de actividad enzimática.

Actividad enzimática de los hongos aislados obtenidos						
Muestra	Amilasa	Catalasa	Peroxidasa	Proteasa	Lacasa	Total
zAA1	-	+	+	-	-	2
zAA3	+	+	+	-	-	3
zBB2	-	+	-	-	-	1
zTACC1	+	+	-	+	-	3
Total	2	4	2	1	0	

Para la identificación de amilasa se agregó lugol a cada una de las placas con medio PCA, tiñiendo el hongo, sin teñir a las enzimas haciendo una separación entre la actividad enzimática y el medio de cultivo, el resultado positivo muestra la formación de halos transparentes alrededor de la colonia, donde 2 hongos reportaron actividad amilasa (zAA3 y zTACC1). En la demostración de la actividad catalasa el resultado positivo muestra la formación de burbujas y agua agregando gotas de peróxido de hidrógeno al 30% encima de la colonia, donde todos los hongos presentaron ese tipo de actividad. Para la evaluación de la actividad peroxidasa se observó el cambio de coloración en el hongo formado y descoloración del medio de cultivo, siendo zAA1 y zAA3 las que mostraron descoloración del medio de cultivo y cambio de tonalidad, pasando de un color verde olivo a una combinación de verde y amarillo. En el caso de la actividad proteasa solo hubo presencia de enzimas en zTACC1, donde el ácido acético distingue la formación de halos transparentes alrededor de la colonia. En las pruebas de actividad lacasa no se pudo evaluar la actividad enzimática por el poco o nulo crecimiento de las muestras. Los hongos zAA3 y zTACC1 fueron los que presentaron la mayor cantidad de enzimas ensayadas, con 3 enzimas cada uno, siendo un factor a considerar para que se puedan estudiar a profundidad y eventualmente se haga investigación ligada a esos dos códigos. Todas las actividades enzimáticas se realizaron por triplicado para confirmar los resultados previamente descritos.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Este estudio de bioprospección realizado en la Universidad Iberoamericana Puebla ha aportado evidencias significativas sobre la diversidad y el potencial biotecnológico de hongos edáficos. Comparando los dos métodos utilizados para la obtención de cepas en efectividad y densidad de crecimiento, se puede afirmar que el método Warcup es el método de preferencia para trabajar ya que la obtención de hongos toma menor tiempo que el método TA y a su vez es fácil de replicar. Se logró el aislamiento de hongos, lo cual permitió que posteriormente se realizara la evaluación de actividad enzimática. Los resultados de estas pruebas demostraron que los hongos edáficos tienen diversas capacidades enzimáticas, como son la amilasa, catalasa, proteasa, peroxidasa y lacasa, las cuales son importantes para la investigación científica, el desarrollo de nuevos productos a partir de estos compuestos o el mejoramiento de procesos en la industria farmacéuticas, alimentaria y textil. Este estudio demuestra la importancia que tienen los hongos edáficos como fuente de enzimas y con aplicaciones en la biotecnología. Se buscará que este proyecto pueda complementarse con información más detallada como la caracterización de los hongos, la extracción y purificación de las enzimas y el desarrollo de productos a partir de estas enzimas para así tener un estudio completo, que brinde esta información para otras investigaciones y que se cubra ese hueco en el conocimiento que exista relacionado a investigaciones hechas en la Universidad Iberoamericana Puebla y en otras áreas de estudio.

Referencias

- [1] O. Duarte Torres y L. Velho, “La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia”, *Ciência da Informação*, vol. 38, no. 3, pp. 96-110, diciembre 2009.
- [2] A. P. Romero Calderón, “Análisis de la diversidad y perfil enzimático de los microhongos edáficos asociados a las especies leñosas pertenecientes a los géneros *Pinus* y *Bursera* en un bosque de pino piñonero en Santa Catarina, Guanajuato”, Tesis para obtener el título de Biólogo, Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla de Baz, México, 2022.
- [3] G. Portillo. (2023, junio 16). Horizontes del suelo: estructura y factores. (1ª edición) [En línea]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/horizontes-del-suelo-estructura-y-factores-4453.html>
- [4] S. Franco Romero, “Determinación del perfil de metabolitos secundarios de un hongo endófito septado oscuro”, Trabajo de Fin de Grado de la Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Ciudad de México, México, 17 de Marzo de 2020.
- [5] D. J. Rodrigo Lambán, “Screening de compuestos bioactivos en el reino *Fungi*”, Trabajo de Fin de Grado en Farmacia, Universidad Complutense, Facultad de Farmacia, Madrid, España, Junio de 2020.

- [6]] C. N. García-Espejo, M.M. Mamani Mamani, G. A. Chávez Lizárraga y M. T. Álvarez Aliaga, “Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador”, *Journal of the Selva Andina Research Society*, vol. 7, no. 1, pp. 20-32, febrero 2016.
- [7] D. Sarmiento y G. Mata, “El Cepario de Hongos del Instituto, A. C.”, *Recursos Genéticos Microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México*, vol. 1, pp. 110-127, 2011.
- [8] M.L Izarra, M. L. Santayana, G. K. Villena, y M. Gutiérrez Correa, “Influencia de la concentración de inóculo en la producción de la celulosa y xilanas por *Aspergillus niger*”, *Revista colombiana de biotecnología*, vol. 12, no. 2, pp. 139-150, 2010.
- [9] C.A. López Ríos, A. Zuluaga Meneses, S. N. Herrera Penagosos, A. A. Ruiz Colorado, y V. I. Medina de Pérez, “Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche” en facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 16 de marzo de 2006.
- [10]] J. F. Osmá, J. L. Toca-Herrera y S. Rodríguez-Couto. (2010, September 30). Uses of laccases in the food industry. [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2963825/>
- [11]] M. C. Osorio Díaz, “Enzimas pectinolíticas de cepas de *Aspergillus niger* (P. Micheli, 1729) en la fermentación de residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus*) y maracuyá (*Passiflora edulis*)”, Trabajo de Grado para Optar el Título de Magíster en Biotecnología, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Básicas, maestría en Biotecnología, Montería, 2022.
- [12] J. H. Warcup, “The soil-plate method for isolation of fungi from soil”, *Nature*, vol. 166, no. 4211, pp. 117-118, 1950.
- [13] E. Yasanthika, D. Wanasinghe, P. Mortimer, J. Monkai & A. Farias, “The importance of culture-based techniques in the genomic era for assessing the taxonomy and diversity of soil fungi”, *Mycosphere*, vol. 13, pp. 724-751, 2022.
- [14] R. Chand, R. Salwan and S Kumar-Yadav, “Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement”, *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 37, no. 3, pp. 262-276, 2011.
- [15] T. Iwase, A. Tajima, S. Sugimoto, K. I. Okuda, I. Hironaka, Y. Kamata, K. Takada, and Y. Mizunoe, “A Simple assay for measuring catalase activity: a visual approach”, *Scientific Reports*, vol. 3, no. 1, pp.1-4, 2013.
- [16] J. D. Crowe and S. Olsson, “Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* Strains and a range of chemical treatments”. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no.5, pp. 2088-2094, 2001.
- [17] Y. Albulaihed, M. Adnan, A. Jamal, M. Snoussi, K. Patel and M. Patel, “Optimization of laccase from *Stenotrophomonas maltophilia* E1 by submerge fermentation using coconut husk with its detoxification and biodecolorization ability of synthetic dyes”, *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 10, no. 80, pp. 1-19, 2023.
- [18] “Enzimas de interés biotecnológico”, class notes for Biotecnología, Facultad Regional La Plata, Universidad Tecnológica Nacional, 2019.
- [19] D. F., Chaparro Sosa, D. C., Rosas Wanumen, “Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural La Montaña del Ocaso”, Trabajo de tesis para Optar el título de Microbióloga Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DF, Colombia, septiembre del 2006.
- [20] W. Cha Cupul, G.P Heredia Abarca, y R. Rodríguez Vázquez, “Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México”, *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 32, no 3, pp. 339-351, 15 de noviembre 2015.
- [21] M. K. Bhat, “Cellulases and related enzymes in biotechnology”, *Biotechnology Advances*, vol. 18, no. 15, pp. 355-383, agosto 2000.
- [22] R. Arias y G. Heredia, “Fungal diversity in coffee plantation systems and in a tropical montane cloud forest in Veracruz, Mexico”, *Agroforestry Systems*, vol. 88, pp. 921-933, 2014.
- [23] N. Martínez y D. Suárez. (2024, abril 23). Archivo fotográfico: Bioprospección de hongos edáficos. (1ª. Edición) [En línea] Disponible en: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1kp8C3SP4aWRDx67FQ7eIeotJ39MvzDvEPbeX_TpWEkk/edit#gid=556290177