



Potencialidades del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi* -*Trichoderma pleuroticola* como pretratamiento biológico para la degradación de fuentes fibrosas

Maryen Alberto Vázquez^{1*} ; Elaine Cristina Valiño Cabrera¹ ; Livio Torta² ;
Armando Laudicina² ; María Teresa Sardina² ; Giulia Mirabile² .

¹Instituto de Ciencia Animal (ICA), San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Italy.

*Correspondencia: mvazquez@ica.co.cu

Recibido: Noviembre 2021; Aceptado: Febrero 2022; Publicado: Mayo 2022.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la potencialidad del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi* L7- *Trichoderma pleuroticola* como método biológico de pretratamiento de alimentos altos en fibra destinados a la producción animal. **Materiales y métodos.** Se utilizaron las cepas *Curvularia kusanoi* L7 y *Trichoderma pleuroticola*. Se evaluó el potencial degradativo a través de las cinéticas de producción de las enzimas celulolítica (endo-1,4- β - glucanasa y exo-1,4- β - glucanasa) y ligninolíticas (lacasa y peroxidasa) en fermentación sólido sumergido de salvado de trigo y de bagazo de caña de azúcar. Se analizó el crecimiento del cocultivo en placas. Se determinó el efecto del consorcio sobre la mineralización del carbono de la paja de trigo cruda y se evaluó el grado de degradación de la fibra por espectroscopía infrarroja (IR). **Resultados.** Ambas cepas mostraron alta producción celulolítica. Solo *C. kusanoi* L7 mostró actividad ligninolítica, con actividad lacasa máxima de 1400 U/L. No se encontró antagonismo entre las cepas y los resultados de mineralización del carbono y evaluación de sus productos finales mediante IR, indican la efectividad del consorcio para degradar la pared celular de forma más eficiente que cada una de las cepas de manera individual. **Conclusiones.** Se concluye que el consorcio microbiano *C. kusanoi* L7-*T. pleuroticola* presenta grandes potencialidades para emplearse en la modificación estructural de fuentes fibrosas destinadas a la alimentación animal.

Palabras clave: Degradación; enzimas; fibra; pared celular; hongos (*Fuente: CAB*).

ABSTRACT

Objective. To evaluate the potentiality of the microbial consortium *Curvularia kusanoi* L7- *Trichoderma pleuroticola* as biological pretreatment of high fiber sources destined for animal production. **Materials and methods.** The Strains used where *Curvularia kusanoi* L7 and *Trichoderma pleuroticola*. The

Como citar (Vancouver).

Vázquez MA, Valiño CEC, Torta L, Laudicina A, Sardina MT, Mirabile G. Potencialidades del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi* -*Trichoderma pleuroticola* como pretratamiento biológico para la degradación de fuentes fibrosas. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(2):e2559. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2559>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

degradative potential was evaluated through the production kinetics of cellulolytic (endo-1,4- β -glucanase and exo-1,4- β -glucanase) and ligninolytic enzymes (laccase and peroxidase) in solid submerged fermentation of bran wheat and sugarcane bagasse. The growth of the co culture in plates was analyzed. The effect of the consortium on the carbon mineralization of raw wheat straw was determined and the degree of fiber degradation was evaluated by infrared spectroscopy (IR). **Resulted.** Both strains showed high cellulolytic production. Only *C. kusanoi* L7 showed ligninolytic activity, with a maximum laccase activity of 1400 U/L. No antagonism was found between the strains and the results of carbon mineralization and evaluation of their final products by IR indicate the effectiveness of the consortium to degrade the cell wall more efficiently than each of the strains individually. **Conclusions.** It is concluded that the microbial consortium *C. kusanoi* L7-*T. pleuroticola* has great potential for structural modification of fibrous sources destined for animal feeding.

Keywords: Degradation; enzymes; fiber; cell wall; fungi (*Source: CAB*).

INTRODUCCIÓN

La investigación de fuentes no convencionales de alimento para animales, constituye un tema medular de la actualidad internacional. En ese sentido, se desarrollan diferentes estrategias donde la revalorización de la biomasa lignocelulósica exhibe particular interés (1). Sin embargo, a pesar del gran potencial que representa este recurso para la producción animal, la complejidad estructural de la pared vegetal y la baja digestibilidad de muchas de estas fuentes, disminuye su campo de empleo especialmente en la alimentación de especies monogástricas. En estos casos, los procesos de pretratamiento de la fibra sobresalen como soluciones efectivas que permiten mejorar su calidad nutritiva (2).

La literatura científica describe varios métodos de pretratamiento que logran modificar la estructura macroscópica y microscópica de la fibra vegetal (3). Según su naturaleza, estos métodos pueden clasificarse en pretratamientos físicos, químicos y biológicos, estos últimos con mayor desarrollo a causa de sus numerosas ventajas. Este tipo de pretratamiento, presenta menor consumo de energía, no emplea productos químicos agresivos, opera en condiciones cercanas al ambiente y además permite la reducción de inhibidores y productos químicos tóxicos en el medio de reacción (4).

La degradación de la fibra por tratamiento biológico, ocurre por acción de determinados microorganismos como los hongos y las bacterias. Estos, son capaces de degradar la compleja estructura de la pared vegetal, a través de la expresión de enzimas altamente específicas como las celulasas y las enzimas que modifican la lignina. Para aumentar

la efectividad de los pretratamientos, se pueden emplear microorganismos con alta capacidad lignocelulolítica como los hongos de la podredumbre blanca ó pueden utilizarse diferentes variantes de consorcios microbianos que logran una degradación mucho más exhaustiva de la pared celular vegetal (4). Según Singh et al (5), estos consorcios microbianos o co-cultivos son una solución efectiva en la biotransformación de sustratos complejos.

Los géneros *Curvularia* y *Trichoderma* se describen ampliamente como microorganismos con alta capacidad lignocelulolítica, de ahí que la presente investigación se proponga como objetivo: Evaluar la potencialidad del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi* L7- *Trichoderma pleuroticola* como método biológico de pretratamiento de alimentos fibrosos destinados a la producción animal

MATERIALES Y MÉTODOS

Microrganismos: Los estudios se llevaron a cabo con las cepas no patógenas *Curvularia kusanoi* L7 y *Trichoderma pleuroticola*, con número de secuencias registradas en el GenBank: KY795957.1 y MK992922, respectivamente. Pertenecientes al banco de Microorganismos del Laboratorio de microbiología del Intituto de Ciencia Animal, Cuba. Ambas cepas se aislaron a partir de la superficie del árbol de limón.

Caracterización individual del potencial degradativo de las cepas

Crecimiento sobre ácido tánico. A partir de los cultivos puros de 5 días de crecimiento en agar papa dextrosa (PDA), se tomó 1 cm² de cada cultivo y se sembraron por separado en medio agarizado con ácido tánico como única fuente de carbono según lo describe Nobles (6).

Las placas se incubaron a 30°C en completa oscuridad por 7 días. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se evaluó el índice de potencia (IP) de las cepas según la siguiente fórmula:

$$IP = \frac{(z-C)}{C} * 100$$

Donde:

z-diámetro del halo de degradación del ácido tánico

c-diámetro del crecimiento microbiano

Determinación cuantitativa individual del potencial enzimático en fermentación sólida sumergida del salvado de trigo y fermentación sólido sumergida del Bagazo de caña.

Para evaluar el potencial enzimático de cada una de las cepas, se analizaron las cinéticas de producción de las principales enzimas del complejo celulolítico y de las enzimas que modifican la lignina en fermentación sólida sumergida del salvado de trigo y luego en fermentación sólido sumergido del bagazo de caña de azúcar. En ambos casos se tomó como inóculo, 1 cm² del micelio de 7 días de edad crecido en PDA proveniente de los cultivos puros. A partir de los cultivos puros de 7 días de crecimiento en PDA, los microorganismos se inocularon en matraces que contenían 3 g del cereal a base de salvado de trigo Allbran-Kellogg's (Tabla 1) y 100 mL de amortiguador citrato de sodio (50 mM, pH 6.0) y en matraces que contenían 4 g de bagazo de caña de azúcar y 100 mL de amortiguador de citratos (50 mM, pH 6.0). Todos se incubaron en zaranda orbital (120 rpm durante 7 días a 30°C). Se tomaron muestras de la fermentación cada 24 horas y los análisis se realizaron por triplicado. El contenido de cada matraz se filtró, se centrifugó (4°C, 10 000 rpm) y se almacenó el extracto crudo en tubos Corning a -20°C para su posterior estudio (7).

Tabla 1. Composición nutricional (%) de acuerdo con el producto comercial Cereal Allbran-Kellogg's.

Composición	Contenido (%)
Proteínas	13
Grasas	3
Carbohidratos	40
Azúcares	17
Fibra dietética	26.5
Sodio	0.5

Evaluación de actividad celulolítica. A partir de los extractos enzimáticos provenientes de la fermentación, se evaluó la capacidad celulolítica endo-1,4-β- glucanasa (CMCasa) sobre carboximetilcelulosa 2.2% (p/v) en amortiguador citrato de sodio 50 mM, pH 6 y la actividad exo-1,4-β- glucanasa (PFasa) se cuantificó sobre papel filtro Whatman N.º I (50 mg) en amortiguador acetato sódico 0.6 M, pH 6.0. En ambos casos las reacciones se incubaron a 50°C por 30 min y se cuantificó el contenido de azúcares reductores liberados durante el proceso (8). Las actividades enzimáticas endo y exoglucanasa se expresaron en Unidades internacionales por mililitro (UI /mL) (9).

Actividad lacasa y lignino peroxidasa. Para evaluar la actividad lacasa, se utilizaron 100 µL de siringaldazina (5 mM) y 800 µL de buffer citrato (50 mM, pH 4.5). Esta mezcla se incubó previamente a 30°C y luego se añadieron 100 µL del extracto enzimático hasta alcanzar el volumen final de 1 mL. La oxidación del sustrato se analizó en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 530 nm. Una unidad de actividad lacasa (U) equivale a la cantidad de enzima que convierte 1.0 µmol de siringaldazina/minuto (10).

La actividad lignina-peroxidasa se determinó mediante la dimerización oxidativa dependiente de H₂O₂ del 2.4-diclorofenol (2.4-DCF) a 25°C. Para esto se utilizaron, 200 µL de muestra, 5 mM de 2,4-DCF, 4-aminoantipirina 3.2 mM, H₂O₂ 10 mM en fosfato de potasio 20 mM, pH 7.0. La reacción se monitoreó durante 5 minutos después del cambio de absorbancia a 510 nm (ε=1.85x10⁴ M⁻¹cm⁻¹). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza el aumento de una unidad de absorbancia por minuto (11). Las determinaciones de actividad enzimática utilizaron como control negativo la mezcla de reacción sin el extracto enzimático.

Análisis estadísticos. Los datos de cada cinética se analizaron mediante análisis de varianza simple, para evaluar el efecto del tiempo de fermentación en la producción enzimática. El estudio de los datos se realizó con el paquete estadístico InfoStat (12).

Pruebas de confrontación microbiana. Para determinar la capacidad de la cepa *C. kusanoi* L7 de crecer en co-cultivo con la cepa *T. pleurotica* se empleó PDA. La placa se dividió a la mitad y se sembró a cada lado

un microorganismo para evidenciar signos de solapamiento o antagonismo entre los cultivos. Todas las placas se incubaron a 30°C en completa oscuridad durante 10 días (13).

Mineralización del carbono de la paja de trigo cruda. Para evaluar la capacidad fibrolítica de cada una de las cepas vs su co cultivo, se determinó la mineralización del carbono de la paja de trigo cruda mediante espectroscopía gaseosa. Se dispusieron 3 g del sustrato en botellas de vidrio de 200 mL cerradas con tapones perforables de goma, se adicionaron 3 mL de medio mínimo de sales (modificación del medio mínimo de Lee: KH_2PO_4 (2.0 g/L), MgSO_4 (0.3 g/L) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.4 g/L), CaCl_2 (0.3 g/L), Urea (0.3 g/L), peptona proteosa (0.75 g/L)) y el inóculo correspondiente de cada una de las cepas (1cm² del micelio de 7 días crecido en PDA). Se evaluaron cuatro tratamientos, (control con paja de trigo sin inocular, paja de trigo inculda con *C. kusanoi* L7, paja de trigo inculda con *T. pleurotica* y paja de trigo inculda con el co-cultivo) y seis repeticiones cada uno. La producción de CO₂ se monitoreó durante un mes, tomándose muestras del gas producto de la fermentación cada 72 horas e inyectándose al cromatógrafo gaseoso (Trace GC, Thermo Electron) equipado con detector de conductividad térmica.

Condiciones cromatográficas. Se empleó un tiempo de corrida de 2 min a una velocidad de flujo del Split de 45 mL/min. La curva de calibración de CO₂ se construyó mediante la utilización del gas de calibración estándar de referencia marca STG, UK (99 ppm CO₂, 5 ppm CH₄, y 10 ppm N₂O). Para realizar las diluciones del patrón de CO₂ se utilizó una bolsa de

propileno y aire comprimido como disolvente. Para realizar la inyección de las muestras se utilizó una jeringa de 5 mL para gases. Todas las lecturas se hicieron por duplicado.

Evaluación del nivel de degradación de la fibra de la paja de trigo por Espectroscopía Infrarroja. La degradación de la fibra de la paja de trigo cruda luego del estudio de mineralización del carbono se evaluó mediante espectroscopía infrarroja de Reflexión Total Atenuada con Transformada de Fourier (ATR-FT-IR, por sus siglas en inglés) (15). Los residuos de este ensayo se evaluaron en un equipo Pelkin Elmer con detector MCT/A. Las exploraciones fueron de 4 000 hasta 400 cm⁻¹.

RESULTADOS

Determinación cualitativa y cuantitativa del potencial enzimático de las cepas en estudio. El crecimiento de las cepas *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* en medio Nobles, evidenciaron la capacidad de degradar el ácido tánico. En cuanto a la determinación cuantitativa de su potencial enzimático, los estudios de fermentación sólido sumergida de los sustratos salvado de trigo y bagazo de caña de azúcar, mostraron una alta capacidad fibrolítica, sustentadas por valores similares a cepas ya reportadas con gran capacidad degradativa. Los resultados por estudios se presentan a continuación.

Fermentación sólido sumergida del salvado de trigo. La degradación del salvado de trigo en fermentación sólido sumergida por las cepas *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* se presentan en las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Actividad celulolítica CMCasa (endo-1,4-β- glucanasa) de *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* en medio sólido sumergido de salvado de trigo

Cepas/horas	Actividad enzimática endo-1,4-β- glucanasa (UI/mL)							EE y signif
	24	48	72	96	120	144	168	
<i>C. kusanoi</i> L7	0.535 ^e	0.197 ^c	0.981 ^d	0.185 ^c	0.081 ^b	0.035 ^a	0.029 ^a	±0.022 p=0,0003
<i>T. pleurotica</i>	0.032 ^b	0.061 ^{ab}	0.064 ^{ab}	0.082 ^b	0.126 ^c	0.014 ^a	0.002 ^a	±0.001 p=0.023

^{a,b,c,d,e} Medias con diferentes letras en cada fila difieren a p<0.05 ¹⁴

Tabla 3. Actividad celulolítica PFasa (exo-1,4-β- glucanasa) de *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* en medio sólido sumergido de salvado de trigo.

Cepas/horas	Actividad enzimática endo-1,4-β- glucanasa (UI/mL)							EE y signif
	24	48	72	96	120	144	168	
<i>C. kusanoi</i> L7	0.340 ^c	0.191 ^b	0.151 ^b	0.082 ^a	0.080 ^a	0.084 ^a	0.052 ^a	±0.011 p=0.045
<i>T. pleurotica</i>	0.001 ^a	0.006 ^b	0.036 ^b	0.031 ^b	0.107 ^c	0.043 ^b	0.002 ^{ab}	±0.001 p=0.032

^{a,b,c,d} Medias con diferentes letras en cada fila difieren a p<0.05 ¹⁴

En cuanto a la actividad ligninolítica en este sustrato (salvado de trigo), solo la cepa *C. kusanoi* L7 resultó positiva a la presencia de lacasas y peroxidasas. Su cinética de producción enzimática lacasa y peroxidasa se muestra en la figura 1.

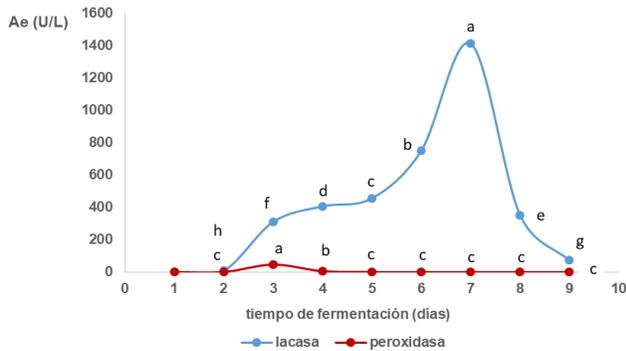


Figura 1. Cinética de producción de lacasas ($EE \pm 3.52$; $p < 0.0001$) y peroxidasas ($EE \pm 1.18$; $p < 0.0001$), de la cepa *C. kusanoi* L7 en medio sólido sumergido de salvado de trigo. Ae: Actividad enzimática. Análisis de varianza simple para cada enzima. Paquete estadístico InfoStat (12).

Fermentación sólida sumergida del bagazo de caña. Al igual que el caso de la fermentación sólido sumergida del salvado de trigo, la actividad celulolítica de las cepas frente al bagazo de caña de azúcar también es considerable. Los resultados se presentan en las tablas 4 y 5.

En cuanto a la producción de enzimas ligninolíticas, se encontró escasa actividad lacasa (Figura 2) y ninguna actividad para las enzimas peroxidasa.

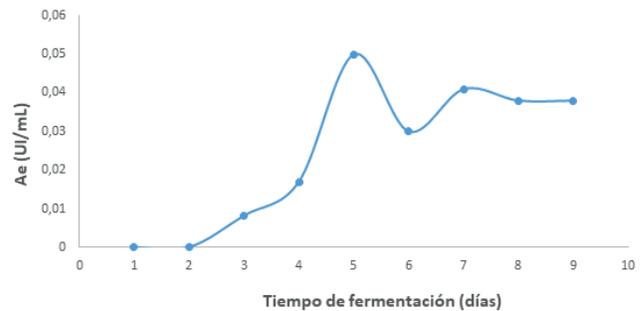


Figura 2. Producción de lacasas de la cepa *C. kusanoi* L7 en fermentación sólida sumergida del bagazo de caña de azúcar. ($EE \pm 0.03$; $p = 0.1861$).

Tabla 4. Actividad celulolítica CMCasa (endo-1,4- β - glucanasa) de *C. kusanoi* L7 y *T. pleuroticola* en fermentación sólido sumergida del bagazo de caña de azúcar

Cepas/hora	Actividad enzimática endo-1,4- β - glucanasa (UI/mL)							EE y signif
	24	48	72	96	120	144	168	
<i>C. kusanoi</i> L7	2.73 ^g	2.06 ^e	2.36 ^f	1.85 ^d	1.14 ^c	1.04 ^b	0.93 ^a	± 0.22 $p = 0.0004$
<i>T. pleuroticola</i>	2.08 ^d	2.96 ^g	2.82 ^f	2.25 ^e	1.73 ^c	1.26 ^b	1.04 ^a	± 0.31 $p = 0.0007$

a,b,c,d,e Medias con diferentes letras en cada fila difieren a $p < 0.05$ (14) *** $p < 0.001$

Tabla 5. Actividad celulolítica PFasa (exo-1,4- β - glucanasa) de *C. kusanoi* L7 y *T. pleuroticola* en fermentación sólido sumergida del bagazo de caña de azúcar.

Cepas/horas	Actividad enzimática exo-1,4- β - glucanasa (UI/mL)							EE y Signf.
	24	48	72	96	120	144	168	
<i>C. kusanoi</i> L7	0.261 ^b	0.802 ^d	0.511 ^c	0.007 ^a	0.007 ^a	0.003 ^a	0.0006 ^a	± 0.36 $p = 0.0021$
<i>T. pleuroticola</i>	0.750 ^d	1.691 ^f	1.180 ^e	0.472 ^c	0.056 ^b	0.006 ^a	0,0008 ^a	± 0.52 $p = 0.0033$

a,b,c,d,e,f Medias con diferentes letras en cada fila difieren a $p < 0.05$ (14)

Evaluación del crecimiento en co cultivo.

Las confrontaciones a los 5 y 10 días muestran el crecimiento de *T. pleuroticola* sobre *C. kusanoi* L7, por lo que se infiere que no existe la producción de metabolitos tóxicos o antagónicos para el crecimiento de estas especies según se observa en la figura 3. Es necesario señalar además, que la cepa *C. kusanoi* L7 es un ascomiceto dermatiáceo

que se caracteriza por un crecimiento rápido con abundante micelio aéreo, en cambio *T. pleuroticola* muestra un crecimiento miceliar mas lento con abundante esporulación. Sin embargo al cabo de los 10 días se observó un crecimiento conjunto de ambas cepas, llegando a ocupar toda la superficie de la placa.



Figura 3. Pruebas de confrontación microbiana *C. kusanoi* L7 (a derecha de la placa)- *T. pleurotica* (a la izquierda) a los 5 días de crecimiento en medio PDA a 30°C.

Mineralización del carbono de la paja de trigo cruda. la figura 4 presenta la mineralización del carbono por acción del hongo lignocelulolítico *C. kusanoi* L7, el hongo celulolítico *T. pleurotica* y su co-cultivo.

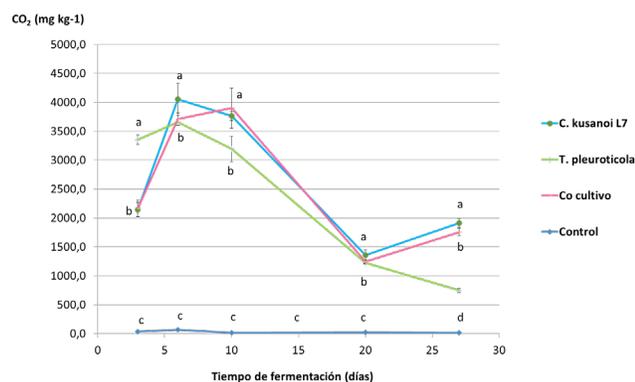


Figura 4. Mineralización del carbono de la paja de trigo cruda por las cepas *C. kusanoi* L7, *T. pleurotica* y su co-cultivo. ^{a,b,c,d}: Letras distintas en el mismo tiempo de fermentación muestran diferencias significativas $p < 0.05$ (14). La significación fue igual en todos los casos ($p < 0.0001$). Día 3: $EE \pm 46.71$, día 6: $EE \pm 73.41$, día 10: $EE \pm 93.49$, día 20: $EE \pm 24.47$, día 27: $EE \pm 23.95$.

La mineralización del carbono presenta un comportamiento particular que depende fundamentalmente del tipo de microorganismo

y las características propias del sustrato. Sin embargo, en el estudio actual ambas cepas presentaron un comportamiento similar durante los primeros 6 días de crecimiento. Este período puede asociarse al proceso de colonización del sustrato. Es necesario señalar que la cepa *T. pleurotica* coloniza de forma más rápida el sustrato, aspecto que se define por las características propias de este género. A partir del décimo día de fermentación se observó una disminución drástica de la producción de CO_2 , lo que puede relacionarse con la disminución de los nutrientes de más fácil acceso y el comienzo de la degradación de estructuras más complejas que forman parte de la pared celular. A partir de los 20 días de fermentación, la mineralización del carbono de *T. pleurotica* fue menor que en los demás tratamientos ($p < 0.0001$). No se encontraron diferencias en los resultados entre las cinéticas de *C. kusanoi* L7 y las de su co-cultivo con *T. pleurotica*.

Al realizar la comparación de los espectros infrarrojos (ATR-FT-IR) obtenidos del estudio de mineralización del carbono de la paja de trigo cruda por los hongos *C. kusanoi* L7, *T. pleurotica* y su co-cultivo al final del estudio (27 días), se observó que los tratamientos con *C. kusanoi* L7 y su co-cultivo con *T. pleurotica* presentaron mayor disminución de las señales asociadas a la lignina (figura 5). A pesar de ser ésta, una determinación semi cuantitativa, se evidencia claramente la disminución en la intensidad de las señales asociadas a la lignina, aspecto que sugiere la modificación estructural de este compuesto por acción enzimática.

Las señales que se numeran en la figura 5 (1. Banda en el intervalo de 3 400 a 3 200 cm^{-1} , asociada a la vibración de grupos O-H fenólicos y alifáticos, 2. Banda a los 1 610 cm^{-1} correspondiente a la presencia de dobles enlaces Carbono-Carbono aromáticos, 3. Banda a los 1 510 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de los enlaces Carbono-Carbono de la lignina (unidades aromáticas y fenólicas), 4. Banda a los 1 420 cm^{-1} correspondiente al esqueleto fenilpropano de la lignina, 5. Banda a los 1 210 cm^{-1} asociada los enlaces C-O del anillo guaiacil y 6. Banda a los 1 035 cm^{-1} correspondiente a los enlaces O-CH₃ de las unidades guaiacilo y siringilo de la lignina), son bandas características de agrupamientos funcionales presentes en la molécula de la lignina. La disminución en la intensidad de estas señales, indica su modificación estructural. Este resultado, corrobora los planteamientos

anteriores, donde en los tratamientos con *C. kusanoi* L7, la expresión de enzimas lacasas modifica la estructura de la lignina y permite una degradación más exhaustiva de la pared vegetal.

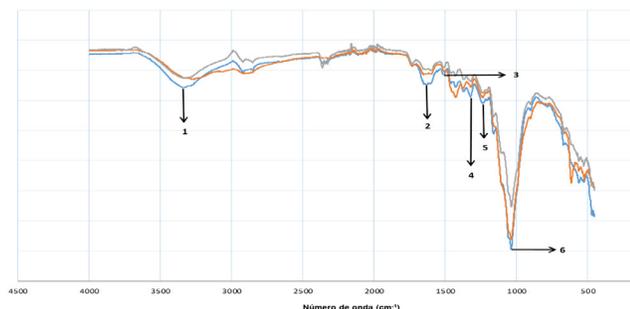


Figura 5. Espectro ATR-FT-IR de las muestras resultantes del estudio de mineralización del carbono de la paja de trigo cruda por las cepas *C. kusanoi* L7, *T. pleurotica* y su co-cultivo en la zona de 4000 a 400 cm^{-1} . Los números del 1-6 corresponden a las señales características de la lignina.

DISCUSIÓN

El estudio cualitativo de ambas cepas mostró capacidad de crecimiento en un medio complejo como es el medio nobles, donde los microorganismos deben crecer a expensas de la degradación de ácido tánico como única fuente de carbono. Según Reid (16), esta prueba indica la posible secreción de enzimas oxidasas que permiten la degradación de estructuras similares a la lignina.

La cinética de producción enzimática de ambas cepas (Tablas 2, 3, 4 y 5) tanto en salvado de trigo como en bagazo de caña de azúcar reflejaron como estos hongos son capaces de producir las principales enzimas del complejo celulolítico. Es importante señalar además, que en ambos casos, la actividad máxima se alcanza durante los primeros días de fermentación. Según Valiño et al (17a) las cepas candidatas para procesos fermentativos de producción enzimática, son aquellas capaces de expresar su capacidad enzimática máxima durante las primeras horas de fermentación, aspectos claves para reducir el tiempo de trabajo y optimizar el proceso de producción de la enzima. Se conoce que dentro de los hongos con mayor capacidad celulolítica se encuentran los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (18). Según los estudios Vázquez et al (18) la producción de celulasas de las cepas en estudio

puede considerarse alta, sin embargo, aunque la producción de celulasas de estas cepas puede considerarse alta, son menores a lo que se reporta para *T. viride* (M5-2) en bagazo de caña, quien presentó alta actividad celulolítica a partir de las 24 h y llegó a su máxima expresión a las 72 h, alcanzándose valores para exoglucanasa de 1.84 UI/g de MS) y de 7.26 UI/g de MS para endoglucanasa según lo publicado por Valiño et al (17).

Respecto a la producción de las enzimas que modifican a la lignina, es necesario señalar como *C. kusanoi* a pesar de ser un hongo ascomiceto, sus producciones de enzimas lacasa se encuentran en el rango de las que se reportan para varias especies de basidiomicetos productores por excelencia de este tipo de enzimas como los hongos de la podredumbre blanca (19). La expresión de enzimas lacasas en el género *Curvularia* no se conoce a profundidad. Son escasos los informes en la literatura, aunque, algunos autores como Bello et al (20), encontraron valores de actividad lacasa en *Curvularia lunata* similares a los obtenidos en el presente estudio. Los hallazgos de la presente investigación son una medida del alto potencial que puede tener este género en la degradación de compuestos recalcitrantes como la lignina. Otro aspecto significativo es el patrón que presenta esta cepa en la cinética de producción de enzimas lacasas. Al igual que la mayoría de las cepas lignolíticas reportadas como productoras de óxido reductasas (21), *C. kusanoi* L7, alcanza también su máximo de actividad lacasa a los 7 días de fermentación.

La cepa *C. kusanoi* L7 no solo mostró altos valores de actividad ligninolítica, sino también alta producción de celulasas, por lo que se puede esperar también resultados prometedores en los procesos de bioconversión de residuos lignocelulósicos.

La posibilidad de *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* de crecer en co cultivo en placas sin presentar rasgos de antagonismo y luego mineralizar en co cultivo eficientemente el carbono de la paja de trigo, muestra un posible consorcio microbiano de grandes potencialidades que debe probarse frente a otros sustratos puesto que la alta capacidad degradativa que presentan estas cepas de forma individual permite predecir que este consorcio sea efectivo en la degradación de la fibra. La combinación entre las enzimas que degradan la celulosa y aquellas que degradan la lignina, es fundamental para lograr

una degradación más completa de sustratos fibrosos (22). Según Singh et al (5), los co-cultivos de hongos lignocelulolíticos son una solución efectiva para lograr una degradación mejor y más completa de la pared celular de la planta. Por estas razones, el presente resultado constituye una variante interesante para estudios de biodegradación de fuentes fibrosas destinadas a la alimentación animal. A pesar de los resultados positivos que se discuten en la literatura sobre el empleo de los co-cultivos para la degradación de diferentes fuentes fibrosas, en el sector ganadero son muy escasos los estudios al respecto. A pesar de esto, Ghorai et al (23) y Medina et al (24) reportaron satisfactoriamente el uso de los co-cultivos de hongos basidiomicetos en la biodegradación de diferentes fuentes fibrosas para alimentación de rumiantes.

El empleo de co-cultivos es una opción atrayente en la mejora de la calidad nutricional de los alimentos fibrosos alternativos. Su uso beneficia sobre todo, la degradación de fuentes con alto contenido de fibra, mejorando la biodisponibilidad de nutrientes y permitiendo revalorizar este tipo de fuentes (25). El uso de los consorcios fúngicos, puede conducir al incremento de la producción enzimática e incluso contribuir a la generación de procesos degradativos de mayor eficiencia (26). Varios microorganismos ante situaciones de estrés o de limitaciones nutricionales son capaces de presentar relaciones benéficas entre sí (27). Se conoce que en co cultivos de hongos donde se presente variación de nutrientes en el medio, puede estimularse el sinergismo de ambos microorganismos (26). Al respecto, son varios los estudios donde se encuentran altas producciones enzimáticas al utilizar los consorcios microbianos (28,29,30). Yang et al (30) manifestaron una producción cinco veces mayor de la manganosa peroxidasa en el co cultivo *Trametes sp.*- *Chaetomium sp.* respecto a la producción enzimática de cada microorganismo de forma particular. Este estudio evidenció además en el co cultivo, un aumento significativo (96%) en el porcentaje de biodegradación de colorantes trifenilmetánicos.

A pesar que el uso de los co cultivos no se ha extendido de forma considerable en el sector agropecuario, su aplicación a nivel industrial si es extensa, destacándose su uso desde la obtención de biocombustibles, hasta el tratamiento de residuales y la biorremediación. Sin duda, las técnicas que emplean acertadamente

los consorcios microbianos, son potenciales herramientas que mejoran los procesos de degradación de la fibra y de compuestos complejos de estructuras similares. Su implementación contribuye significativamente al desarrollo de estos sectores.

El proceso de biodegradación de los sustratos lignocelulósicos puede considerarse como un fenómeno difícil. Su grado de dificultad, tiene estrecha relación con las características propias de la fibra y su contenido de lignina y carbohidratos estructurales. Por estas razones, se puede afirmar que la producción de CO₂ de un microorganismo se afecta por la calidad del material orgánico que se degrade (31).

La paja de trigo cruda, es un sustrato que exhibe como media, 73% de FDN, que se distribuye en 38% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 10% de lignina (31). Estos aspectos traen como consecuencia que el microorganismo necesite la expresión de determinadas enzimas que catalicen la degradación de estos componentes, lo que resulta en una velocidad de degradación más lenta. Las investigaciones sobre el presente tema, confluyen que los valores de mineralización del carbono dependen tanto del tipo de sustrato como de las características de los microorganismos que lo degradan (32).

Al comparar la dinámica de mineralización de las cepas en estudio, las diferencias entre los tratamientos con *C. kusanoi* y su co-cultivo respecto al tratamiento con *T. pleurotica*, ejemplifican como los microorganismos que son capaces de producir una batería más amplia de enzimas lignocelulolíticas, mineralizan en mayor medida los sustratos complejos altos en fibra.

La evaluación por FTIR de los productos finales de la mineralización reafirman los resultados anteriores. En el caso del tratamiento con *T. pleurotica*, los resultados de ambos estudios indican que no hay degradación típica de la lignina. Si se deseara emplear este microorganismo en procesos de modificación de la fibra vegetal, sería más conveniente su combinación con microorganismos ligninolíticos para lograr una degradación más completa como se observó en el caso de su co-cultivo con *C. kusanoi* L7.

La modificación estructural que se observó para el cocultivo, evidencia no solo la degradación de agrupamientos funcionales presentes en la estructura de la celulosa y la hemicelulosa,

sino la disminución en la intensidad de señales que se asocian directamente con la estructura de la lignina. Por estas razones, el consorcio microbiano con fines de pretratamiento biológico de fuentes fibrosas, necesita de la combinación efectiva entre actividad celulolítica y ligninolítica. Estas interacciones enzimáticas entre las cepas, también se refuerzan por con interacciones biológicas que se establecen entre las especies. Resultados similares, se describen para la combinación ascomiceto-basidiomiceto evaluada por Dwivedi et al (33) con las cepas *Penicillium oxalicum* y *Pleurotus ostreatus*.

En conclusión, el consorcio microbiano *C. kusanoi* L7-*T.pleurotica* presenta grandes potencialidades para evaluarse en la modificación estructural de fuentes fibrosas de diferente composición. De ahí que este estudio preliminar, sugiera esta nueva variante de co cultivo como punto de partida de nuevas investigaciones que permitan su utilización eficiente en el aprovechamiento de residuos altos

en fibra destinados a la alimentación animal. Al respecto, se conoce la necesidad de evaluar materias primas alternativas que permitan reemplazar importaciones, proteger el ambiente y garantizar una fuente de alimento animal que no compita con la alimentación del hombre. Por lo que estos resultados permitirán a largo plazo, desarrollar producciones agropecuarias más eficientes, sostenibles y ecológicas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con los resultados de la investigación y la publicación de este manuscrito.

Agradecimientos

Se agradece especialmente a la Universidad de estudios de Palermo, Italia, por la colaboración en la ejecución de los experimentos.

REFERENCIAS

1. Isikgor F, Remzi C. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem.* 2015. 6:4497-4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
2. Aguiar N, Chicaiza E, Santana K, Caicedo WO. Composición química de subproductos agroindustriales destinados para la alimentación de cerdos. *RCCS.* 2019. <https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/04/subproductosalimentacioncerdos.html/>
3. Carlsson M, Lagerkvist A, Morgan F. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *J Waste Manag.* 2012; 32(9):1634-1650. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.04.016>
4. Van Dyk JS, Pletschke BI. A reviews of lignocelluloses bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes factor affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 2012; 30:1458-1480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
5. Singh GD, Singh HO, Kaur S, Bansal SI, Kaur SB. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind Crops Prod.* 2011; 34(1):1160-1167. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>
6. Nobles MK. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the polyporaceae Detection of poliphenoloxidase in fungi. *Can J Bot.* 1958; 36(6):883-926. <https://doi.org/10.1139/b58-071/>
7. Wang LY, Cheng GN, May AS. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulases production. *Biomass Bioenergy.* 2014; 67:319-338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
8. Adney W, Baker J. Measurement of cellulase activities. *Laboratory Analytical Procedures National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co;* 1996. <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf>

9. Mandels M, Andreotti RE, Roche C. Measurement of sacarifying cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp.* 1976; 6:1471-1493. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
10. Perna V, Agger JW, Holck J, Meye AS. Multiple Reaction Monitoring for quantitative laccase kinetics by LC-MS. *Sci Rep.* 2018; 8:8114. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26523-0>
11. Casciello C, Tonin F, Berini F, Fasoli E, Marinelli F, Pollegioni L, Rosini E. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. *Biotechnol. Rep* 2017. 13:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.005>
12. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; 2012. <http://www.infostat.com.ar>
13. He Y, Zhu M, Huang J, Hsiang T, Zheng L. Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain BJ-1 against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Can J Plant Pathol* 2019; 41(1):47-59. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1564792>
14. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 1955; 11(1):1-42. <https://doi.org/10.2307/3001478>
15. Taravilla AO, Moreno AD, Demuez M, Ibarra D, Pejó E, González C, Ballesteros M. Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresour Technol.* 2015; 175:209–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.086>
16. Reid ID. Biodegradation of lignin. *Can J Bot.* 1995; 73(S1):1011-1018. <https://doi.org/10.1139/b95-351>
17. Valiño EC, Savón L, Elías A, Rodríguez M, Albelo N. Nutritive value improvement of seasonal legumes *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium niveum*, *Lablab purpureus*, through processing their grains by *Trichoderma viride* M5-2 cellulases. *Cuba. J Agric Sci.* 2015; 49(1):81. <http://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/552>
18. Valiño EC, Elías A, Torres V, Carrasco T, y Albelo N. Improvement of sugarcane bagasse composition by the strain *Trichoderma viride* M5-2 in a solid-state fermentation bioreactor. *Cuba. J Agric Sci.* 2004; 38:145. <https://eurekamag.com/research/004/196/004196634.php>
19. García N, Bermúdez RC, Téllez I, Chávez M, Perraud I. Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus* spp. *Rev Quím Tecnol.* 2017; 37(1):33-39. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-148-7-2159>
20. Bello A, Machido DA, Mohammed AI, Ado SA. Optimization of laccase production by *Curvularia lunata* using maize cob as substrate. *FUDMA Journal of Sciences.* 2020; 4(4):460-468. <https://doi.org/10.33003/fjs-2020-0404-503>
21. Janusz G, Czuryło FM, Rola B, Sulej J, Pawlik A, Siwulski M, Rogalski J. Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains. *World J Microbiol. Biotechnol.* 2015; 31:121–133. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1769>
22. Lillington P, Leggieri P, Heom K, O'Malley M. Nature's recyclers: anaerobic microbial communities drive crude biomass deconstruction. *Curr Opin.* 2020; 62:38-47. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.015/>
23. Ghorai S, Banik SP, Verma D, Chowdhury S, Khowala S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Int Food Res J.* 2009; 42 (5-6):577-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.019>
24. Medina GE, Barragán H, Hernández CE, Martínez CA, Soto G. Uso de basidiomicetos nativos en la biotransformación del pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) para mejorar la calidad nutricional. *Rev Mex Mic.* 2016; 43:31-35. <http://scientiafungorum.org.mx/index.php/micologia/article/view/1153/1332>

25. Ribeiro L, Pinheiro V, Outor D, Mourão J, Bezzerra RMF, Días AA, Bennett RN, Marqués G, Rodrigues MAM. Effects of the dietary incorporation of untreated and white-rot fungi (*Ganoderma resinaceum*) pre-treated olive leaves on growing rabbits. *Anim Feed Sci Technol*. 2012; 173(3-4):244-251. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.01.014>
26. Saratale RG, Saratale GD, Kalyani DC, Chang JS, Govindwar SP. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium. *Bioresour Technol*. 2009; 100(9):2493-2500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.013>
27. Odelade KA, Babalola OO. Bacteria, Fungi and Archaea Domains in Rhizospheric Soil and Their Effects in Enhancing Agricultural Productivity. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16(20):3873. <https://doi.org/10.3390/ijerph16203873>
28. Carabajal M, Levin L, Albertó E, Lechner B. Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. *Int Biodeterior*. 2012; 66(1):71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.002>
29. Rajendran R, Sundaram SK, Sridevi BV, Prabhavath P, Gopi V. Biodegradation of azo dye containing textile effluent through adapted fungal strains. *J Environ Sci Technol*. 2012; 5(1):29-41. <https://doi.org/10.3923/jest.2012.29.41>
30. Yang X, Wang J, Zhao X, Wang Q, Xue R. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium. *Bioresour Technol*. 2013; 102(22):10535-10541. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.034>
31. FEDNA. Paja de cereales y cebada. Fundación Española para el desarrollo de la nutrición Animal: España; 2019. http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/paja-de-cereales-trigo-y-cebada
32. Castillo DA, Viteri PA, Viteri SE. Desarrollo y evaluación de un inóculo de hongos celulolíticos. *Rev UDCA Actual. Divulg. Cient*. 2015; 18(1):217-226. <https://doi.org/10.31910/rudca.v18.n1.2015.476>
33. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym*. 2011; 68(2):117-128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>