

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR CELULOSA Y ALMIDÓN

Diego Efrén Zambrano Pazmiño¹ Ángel Monserrate Guzmán Cedeño¹ Ana Julia Rondón Castillo²

¹Carrera Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Manabí, Ecuador. Campus Politécnico, El Limón, km 2.7 vía Calceta - Morro - El Limón Sector El Gramal

²Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Apartado Postal 44740, km 3 ½, Matanzas, Varadero

RESUMEN

Con la intención de aislar y seleccionar cepas bacterianas autóctonas con potencial para la degradación de celulosa y almidón se escogieron cinco ambientes (área orgánica, A.O; área convencional, A.Q; Bosque, B.M; área cañera, R.C y Compost, C) donde se ubicaron placas-trampas que contenían agar nutriente modificado, además se tomaron muestras de suelo de esos sitios. Las placas-trampas fueron recogidas a las 24 horas y llevadas a laboratorio para extraer muestras de las colonias visibles. Con las muestras de suelo se realizaron diluciones seriadas. En ambos casos, se sembró en placas y se purificó por agotamiento hasta obtener un cepario de 93 cepas (71 provenientes de muestras de suelo y 22 de trampas). Todas se sembraron en agar Carboximetilcelulosa (CMC) para determinar la actividad celulolítica mediante revelado con rojo congo, del halo de hidrólisis. La actividad amilolítica se evaluó sembrando las cepas en un medio cuya única fuente energética era el almidón y se reveló con solución yodo-lugol. La cepa A.O-19 aislada del área orgánica efectuó el mayor halo de degradación de celulosa con 12.33 UI/mm mientras que la cepa B.M-1, Aislada del bosque obtuvo 9.33 UI/mm de diámetro de halo de hidrólisis del almidón. La cepa A.O-19 tiene potencial para ser considerada en la obtención de biopreparados bacterianos u inoculos en compostaje de material orgánico fibroso.

Palabras clave: bacterias, enzimas celulolíticas, CMC, almidón, degradación

ABSTRACT

The intention of isolating and selecting autochthonous bacterial strains with potential to degradation of cellulose and starch; five different environments were chosen (organic area, AO; conventional area, AQ; Forest, BM; sugarcane area, RC and Compost, C) which were located on plates-traps containing modified nutrient agar, and soil samples taken from those sites. Plates-traps were collected at 24 hours and taken to laboratory for sampling of visible colonies. Soil samples were serially diluted. In both cases, it was plated by exhaustion and purifying to obtain a strain collection of 93 strains (71 from soil samples and 22 traps). All agar seeded in carboxy methyl cellulose (CMC) to determine the cellulolytic activity by revealing them with congo red from the hydrolysis halo. Amylolytic activity was assessed by placing the strains in an environment whose only energy source was starch as revealed with Lugol's iodine solution. AO-19 strain isolated from the organic area made the largest halo cellulose degradation 12.33 IU/mm while BM-1 strain isolated from the forest obtained 9.33 IU/mm diameter of starch hydrolysis halo. AO-19 strain has potential to be considered in obtaining bacterial bio preparations or composting organic fibrous material.

Keywords: Bacteria, cellulolytic enzymes, CMC, starch, degradation.

INTRODUCCIÓN

La disposición final de los residuos orgánicos producidos en el mundo representan un problema que afecta al medio ambiente, en los actuales momentos se busca reducir la masa de estos tipos de residuos mediante la implementación de métodos biotecnológicos que contribuyan a disminuir su volumen y a favorecer su reutilización (Diorio *et al.*, 2003).

Dentro del modelo de agricultura convencional el recurso suelo se considera como un soporte en el cual se incorporan los nutrientes para el desarrollo de las plantas y se aplican agroquímicos sin ninguna consideración medioambiental; no se logra entender que este recurso tiene vida y su dinámica está estrechamente relacionada con los ciclos de la naturaleza y es un recurso no renovable a corto plazo (Linares y Monedero, 2004).

El suelo es el componente básico de los ecosistemas terrestres, algunos edafólogos lo definen como un teatro maravilloso de la vida, no solo por la diversidad que alberga sino porque funciona como reciclador de la materia orgánica y controlador, tanto de la dinámica de la circulación de nutrientes como de los flujos de energía (Chamorro, 2001).

Según Chávez *et al.* (2004) la celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza, es sintetizada por una variedad de organismos. Los microorganismos capaces de degradar la celulosa en los hábitats del suelo juegan un papel fundamental, sin embargo no todas las especies pueden producir elevados niveles de enzimas extracelulares que a su vez no sean afectados por factores físicos y químicos durante el proceso de hidrólisis (Munero *et al.*, 2005).

Los microorganismos en el suelo, constituyen la parte vital y son responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. La diversa cantidad de microorganismos que se encuentran en una fracción del suelo cumple funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos. Los microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) del suelo permiten la descomposición de la materia orgánica hasta los compuestos más simples para ser absorbidos por las plantas (Borrero y Silva 2005). El objetivo de este estudio fue aislar y seleccionar cepas bacterianas autóctonas con actividad enzimática celulolítica y amilolítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La investigación se realizó en áreas de producción de la ESPAM-MFL (orgánica, convencional, bosque), en una área de producción de caña de azúcar ubicada en el cantón Chone y en una unidad de producción de compost perteneciente a una bananera orgánica del cantón Tosagua. En todos los ambientes se colocaron trampas a una profundidad de 10 cm (Benavides y Hermida, 2008), también se tomaron muestras de suelo en los mismos puntos de localización de las trampas.

Medios de cultivo

Para la captura y el aislamiento de las cepas bacterianas, desde los diferentes ambientes, se empleó el medio agar nutritivo modificado por Milian *et al.* (2008) el mismo que contenía peptona al 0.6%, extracto de levadura al 0.2%, cloruro de sodio al 0.5%, celulosa al 1.5% y agar al 1.5%, además, el pH fue ajustado a 7.3 ± 0.2 .

En la selección de los cultivos bacterianos considerados mayores productores de enzimas celulolíticas se utilizó agar CMC informado (Teather y Wood, 1982 citado por Gaitán y Pérez, 2007). Dicho medio estaba formado por Carboximetilcelulosa al 1%, extracto de levadura al 0.25%, peptona al 0.25%, sulfato de amonio al 0.05%, cloruro de calcio al 0.05%, fosfato monobásico de potasio al 0.01%, fosfato dibásico de potasio al 0.01% y agar al 1.5% con un pH de 7.3 ± 0.2 .

Se empleó el medio agar nutritivo almidón para la selección de bacterias con actividad amilolítica (Pascon *et al.*, 2011) con una composición a base de almidón soluble al 1%, extracto de levadura al 0.25%, peptona al 0.25%, sulfato de amonio al 0.05%, cloruro de calcio al 0.05%, fosfato monobásico de potasio al 0.01%, fosfato dibásico de potasio al 0.01% y agar al 1.5% con un pH de 7.0 ± 0.2 .

Aislamiento de microorganismos

Muestras de suelo.- Las bacterias celulolíticas y amilolíticas fueron aisladas por diluciones seriadas. Se preparó una suspensión al 10% p/v con un gramo de suelo, la siembra se realizó en placas petri en un medio cuya única fuente energética fue la celulosa. Se

efectuaron diluciones hasta 10⁻⁶ y se sembraron por triplicado a concentraciones entre 10⁻⁴ - 10⁻⁶. Posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C, la resiembra y purificación se considerando fundamentalmente la formación de endosporas, con lo cual se obtuvo el cepario.

Capturadores (trampas).- Se prepararon placas con medios de cultivo enriquecido con celulosa, que se ubicaron a una profundidad de 10 cm en los mismos puntos de localización de donde se extrajo la muestra de suelo: transcurridas 24 horas las placas se retiraron y se llevaron al laboratorio. Las cepas de bacterias que crecieron en las placas petri se aislaron según su forma y color de la colonia y se sembraron en tubos con agar nutritivo.

Prueba de degradación de celulosa y almidón

Consistió en la siembra en punción en agar CMC; las cajas petri fueron incubadas a 37°C, por 72 horas. Después se realizó una tinción, con el reactivo Rojo Congo (1%) como revelador, el colorante se dejó actuar por 15 min, se retiró el exceso y se adicionó una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2 Molar, dejando reposar durante quince minutos. Transcurrido este tiempo se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros (Teather y Wood, 1982 citado por Gaitán y Pérez 2007). Para el caso de almidón se empleó una modificación del método en placas para la degradación de la celulosa, remplazando CMC

por almidón el resto de componente conservo la concentración indicada.

Dinámica de la capacidad de crecimiento

Cultivos de 24 horas en caldo nutriente, se inocularon (1:10) en Erlenmeyers de 100 mL de capacidad, que contenían 50 mL del mismo medio de cultivo, los que se ubicaron en zaranda termostata a 37 °C a 130 rpm (Milian, 2009). Se retiraron los Erlenmeyers para la toma de muestras a las 24 horas. La medición se efectuó mediante absorbancia a 660 nm.

Análisis estadístico

Inicialmente los datos se agruparon mediante conglomerado y los grupos se analizaron por análisis de varianza, además, se utilizó la prueba de comparación de medias Tukey (5%). Procesamientos de los mismo se lo realizó por el paquete estadístico INFOSTAT Versión 1 (Belzarini *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento

Los resultados del aislamiento de las cepas se presentan en el Cuadro 1 donde se aprecia que el 44% de cepas aisladas proviene del área cañera, probablemente el depósito de residuos fibrosos favorece la mayor presencia de microorganismos celulolíticos. Lo que coincide con Vilches (2002), quien mayor número de aislados.

Cuadro 1. Número de cepas bacterianas aisladas según la forma de captura en cada ambiente

Ambientes	Forma de captura		Total	%
	Trampa	Muestra		
Área orgánica		26	26	28.0
Área convencional		7	7	7.5
Bosque		12	12	13.0
Área cañera	22	19	41	44.0
Compost		7	7	7.5
Total	22	71	93	100.0

Lo que coincide con Vilches (2002), quien menciona que es indispensable considerar el tipo de muestra y zona de muestreo como una

condición importante para lograr aislar cepas con altas posibilidades degradativas de residuos celulósicos.

Sin embargo, fue en el área orgánica donde se obtuvieron el mayor número de cepas aisladas con el 28% del total de cepas. En el resto de ambientes el número de cepas aisladas está en concordancia con los estudios realizados por Gutiérrez *et al.*, (2008) donde obtuvieron 16 cepas de bacterias celulolíticas a partir de muestras de sedimentos provenientes de cultivos de *Stevia rebaudiana*. Por su parte Gaitan y Pérez (2007) evaluaron la actividad celulolítica a partir de residuos vegetales de crisantemo en compostaje, empleando agar CMC logrando aislar 8 cepas bacterianas celulolíticas. En cuanto a la forma de

captura, se tiene que a partir de muestras de suelo se asegura un mayor número de aislados.

Selección primaria de bacterias degradadoras de celulosa

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de la actividad enzimática de las cepas para degradar la celulosa, también se aprecia la capacidad de crecimiento, evaluado a las 24 horas haciendo uso del espectrofotómetro. De las 93 cepas aisladas 30 mostraron la mayor capacidad hidrolíticas, las que pertenecen 25 a muestras de suelo y 5 a trampas.

Cuadro 2. Valores de la degradación de CMC y de crecimiento por densidad óptica (D.O) a las 24 horas

Ambiente	Cepas bacterianas	Halo UI/mm	D.O
Área orgánica	A.O-19	12.33	1.927
	A.O-28	3.42	1.885
	A.O-29	3.42	1.847
	A.O-30	2.83	1.826
Área convencional	A.Q-2	3.23	1.943
	A.Q-3	1.33	1.980
	A.Q-4	1.67	1.833
	A.Q-8	2.37	1.917
Bosque	B.M-1	1.17	1.983
	B.M-5	2.5	1.995
	B.M-7	3.5	1.758
	B.M-10	2.33	1.904
	B.M-11	1.5	1.885
Área cañera	R.C- 1	2.33	1.795
	R.C- 2	4.73	1.981
	R.C- 3	2.33	1.914
	R.C- 4	1.83	1.988
	R.C- 5	1.33	1.737
	R.C- 6	7.50	1.997
	R.C- 7	2.83	1.831
	R.C- 8	2.17	1.630
	R.C- 9	2.33	1.635
	R.C- 10	2.17	1.683
	R.C- 11	2.0	1.962
	R.C- 12	2.17	1.649
	R.C- 13	2.33	1.980
	R.C- 15	2.33	1.670
	R.C- 16	2.67	1.696
R.C- 18	3.5	1.921	
R.C- 23	1.17	1.923	

Selección de cepas por degradación de la celulosa y capacidad de crecimiento

Los datos de estos dos criterios de selección al ser sometidos al análisis de

conglomerados, con la intención de agrupar las cepas de mayor similitud (Figura 1) se definen cuatro grupos en función de la degradación de la celulosa y el crecimiento.

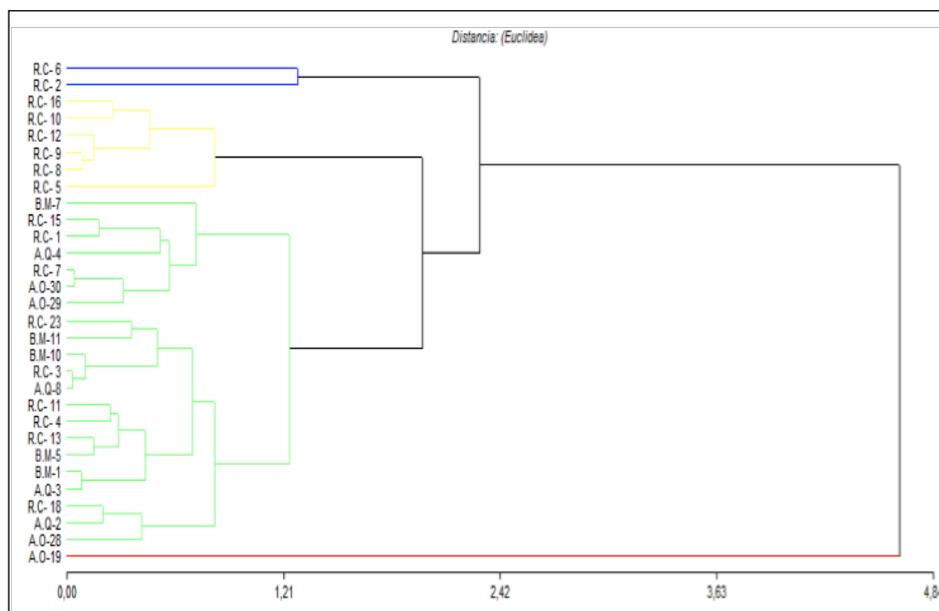


Figura 1. Dendrograma en función del halo de degradación de la celulosa y el crecimiento

Degradación de la celulosa

En el Cuadro 3 aparecen las cepas que integran cada grupo y su respectivo promedio del halo de hidrólisis, que al ser categorizados las diferencias resultaron tres rangos estadística ubicándose en la primera categoría la única cepa del grupo 1 (A.O-19) con un promedio de halo de hidrólisis de la celulosa de 12.33 UI/mm. El segundo rango estadístico le correspondió al grupo 2 conformado por las cepas R.C-2 y R.C-6, que alcanzaron un promedio de halo

de hidrólisis de 6.12 UI/mm. Finalmente, las restantes 27 cepas repartidos en los grupos 3 y 4 con 5 y 22 cepas respectivamente, comparten la tercera categoría con promedios de halo de hidrólisis de 2.38 y 2.14 UI/mm, en su orden, los valores de esta tercer categoría coinciden con los de Gaitán y Pérez (2007) y Mykan y Castellanos (2004) quienes obtuvieron resultados de degradación de la celulosa por bacterias que no superaron los 3 y 4 UI/mm de diámetro en cada caso.

Cuadro 3. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis de la celulosa

Grupo	Cepas	Halo (UI/mm)	E.E
1	A.O-19	12.33 a	0.79
2	R.C-2; R.C-6	6.12 b	0.56
4	R.C-8; R.C-9; R.C-10; R.C-12 y R.C-16	2.38 c	0.17
3	A.O-28; A.O-29; A.O-30; A.Q-2; A.Q-3; A.Q-4; A.Q-8; B.M-1; B.M-5; B.M-7; B.M-10; B.M-11; R.C-1; R.C-3; R.C-4; R.C-5; R.C-7; R.C-11; R.C-13; R.C-15; R.C-18 y R.C-23	2.14 c	0.32

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Capacidad de crecimiento

Los promedios de crecimiento de los cuatro grupos de cepas resultantes del análisis de conglomerados (Cuadro 4) se distribuyen en tres categorías estadísticas diferentes. Las cepas del grupo dos (R.C-2 y R.C-6) alcanzaron el mayor promedio de crecimiento 1.99 D.O y por tanto lidera la primera categoría que la

comparten, con la cepa A.O-19 del grupo 1, con una densidad óptica de 1.93. Sin embargo estas cepas también tiene la probabilidad estadística de capacidad de crecimiento de las cepas del grupo 4 que se ubicaron con la segunda categoría con un promedio de 1.90 D.O por último las 22 cepas del grupo 3 les corresponden la tercera categoría con un promedio de 1.67 D.O de crecimiento.

Cuadro 4. Agrupamiento de cepas por la capacidad de crecimiento

Grupo	Cepas	Crecimiento D.O	E.E
2	A.O-19	1.93 ab	0.04
1	R.C-2; R.C-6	1.99 a	0.03
4	R.C-8; R.C-9; R.C-10; R.C-12 y R.C-16	1.90 b	0.01
3	A.O-28; A.O-29; A.O-30; A.Q-2; A.Q-3; A.Q-4; A.Q-8; B.M-1; B.M-5; B.M-7; B.M-10; B.M-11; R.C-1; R.C-3; R.C-4; R.C-5; R.C-7; R.C-11; R.C-13; R.C-15; R.C-18 y R.C-23	1.67 c	0.02

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Actividad amilolítica

El resultado del análisis de estos dos criterios de selección permite inferir estadísticamente que la cepa A.O-19 cumple con los objetivos primarios de la investigación. Sin embargo, hay cepas con promedios de halo de hidrólisis de celulosa por encima de valores referenciados o con mayor amplitud, en la manifestación de las variables respuestas (hidrólisis celulosa y/o capacidad de crecimiento) que merecen un seguimiento para encontrar otras cualidades. En tal sentido se escogieron 10 cepas (Cuadro 5) a quienes se evaluó la actividad amilolítica, midiendo el

halo de hidrólisis de degradación de almidón empleando el lugol como revelador dada su incapacidad de pigmentar las zonas en las que el almidón ha sido hidrolizado por su actividad enzimática de microorganismos (Sánchez *et al.*, 2005). De las cepas seleccionadas solo tres produjeron el halo de hidrólisis B.M-1; A.O-19 y B.M-7 con promedios 9.33; 8.08 y 3.78 UI/mm, respectivamente. Estudios realizados por Rodríguez *et al.* (2006), demostraron la variabilidad en la producción del halo de hidrólisis en diferentes cepas de bacterias entre las cuales unas superaron los 15 UI/mm y otras están por debajo de los resultados obtenidos en esta investigación.

Cuadro 5. Cepas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento

Cepa	Halo de hidrólisis Celulosa UI/mm	Densidad óptica (nm) Hora 24	Halo de hidrólisis Almidón UI/mm
A.O-19	12.3	1.927	8.08
A.Q-3	1.33	1.980	0.00
B.M-1	1.2	1.983	9.33
B.M-5	2.5	1.995	0.00
B.M-7	3.5	1.758	3.78
R.C-2	4.73	1.981	0.00
R.C-4	1.83	1.988	0.00
R.C-6	7.5	1.997	0.00
R.C-13	2.33	1.980	0.00
R.C-18	3.5	1.925	0.00

CONCLUSIONES

Se aislaron 93 cepas de bacterias, siendo más eficiente la forma de dilución seriada de las muestras de los diferentes ambientes, sobre todo del área cañera que aportó con el 44% de las cepas.

La cepa A.O-19 proveniente del área orgánica del campus politécnico de la ESPAM-MFL produjo el mayor de hidrólisis de la celulosa (12.33 mm) y comparte el mejor rango estadístico con las cepas R.C-2 y R.C-6 en cuanto a su capacidad de crecimiento.

La cepa B.M-7, aislada del bosque perteneciente al campus politécnico, es la más eficiente en actividad amilolítica con un promedio de halo de hidrólisis de almidón de 9.33 mm, seguida de la A.O-19 que alcanzo 8.08 mm.

La cepa de bacteria A.O-19 tiene un gran potencial para ser empleada en la elaboración de biopreparados a inocular en el compostaje de residuos orgánicos fibrosos.

LITERATURA CITADA

- Arroyo, J. 2010. Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de agave (*Agave tequilana*). Tesis. Biólogo. Universidad Michoacana san Nicolás Hidalgo. Morelia, Michoacán México. P.
- Belzarini, M, G., Casanoves, F., ADi Rienzo, J., Laura A González. & Robledo, C. W. 2001. Infostat Software estadístico Versión 1. Córdoba Argentina.
- Benavides, G. Hermida, A. 2008. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca (Cundinamarca). Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. P.
- Borrero, C. Silva, M. 2005. Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del Piedemonte Llanero. Villavicencio. Colomb. Orinoquia. 9 (002): 6-14.
- Chávez, J. Martínez, S. Contreras, M. Escamilla, E. 2004. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. México. Revista especializada de ciencias químico-biológicas. 7 (001): 18-25.
- Chamorro, C. 2001. El suelo maravilloso teatro de la vida. Acad. Colomb. Cienc. 25 (97): 484-486.
- Diorio, L., Forchiassin, F., Papinutti, V. Sueldo, D. 2003. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Rev Iberoam Micol. 20: 11-15.
- Gaitán, D. y Pérez, L. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P 64.
- Gutiérrez, V. Pinzón, A. Casas, J. Martínez, M. 2008. Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Colomb. Agronomía Colombiana. 26 (3): 497-504.
- Linares, C. Monedero, M. 2004. Uso, manejo y conservación de los suelos. 1ed. La Habana. Cuba. P 6.
- Mykán, J. Castellano, D. 2004. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. Bogotá. Colomb. Revista Colombiana de Biotecnología. 6 (1): 58-71.
- Milian, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Tesis Dr. Ciencias Veterinarias. Matanzas.
- Milian, G. Pérez, M. Bocourt, R. Probiotic from *Bacillus* spp and their spores in the poultry production. Cuban Journal of Agricultural Science. 42 (02): 117-122.

- Munero, P. Gonzales, J. Pérez, C. Manso, M. Díaz, F. 2005. Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de *Hyphomycetes* nativos de la provincia de villa clara. 32 (3): 21-24.
- Pascon, R. Faria, R. Spinelli, R. Dutra, E. Assis, D. Juliano, L. Vallim, A. 2011. Amylolytic Microorganism from Sao Paulo Zoo composting: Isolation, Identification, and amylase production. *Enzyme Research*, 1: 4-8.
- Rodríguez, Z. Boucourt, R. Rodriguez, J. Albelo, N. Nuñez, O. Herrera, F. 2006. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 40 (3): 349-354.
- Sánchez, C. Mejía, C. Figueroa, C. Esquivia, M. Agudelo, L. Zapata, N. Gómez, M. 2005. Estudio de cepas nativas amilolíticas. Medellín Colomb. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 12 (2): 21-28.
- Vilches, L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis Biólogo. Lima-Perú.