

Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá

Isolation of amylolytic, cellulolytic and ligninolytic microorganisms from Bogotá's wetland soils

Sonia Marcela Buitrago Morales, instructora del SENA en el Centro de Gestión Industrial en las especialidades de Química Aplicada a la Industria y Control Ambiental
soniabuitrago@misena.edu.co

Etna Milena Sánchez Castelblanco, instructora del SENA en el Centro de Gestión Industrial en las especialidades de Química Aplicada a la Industria y Gestión Integrada de la Calidad
etnamilena@misena.edu.co

Henry Johan Guerrero Suárez, aprendiz de la especialidad de Química Aplicada a la Industria. Centro de Gestión Industrial SENA
guerrerojh@misena.edu.co

Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA
Centro de Gestión Industrial
Regional Distrito Capital

FECHA DE RECEPCIÓN: 28 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN: 23 DE MAYO DE 2014

RESUMEN

Se aislaron microorganismos con actividad enzimática utilizando muestras de suelo provenientes de los humedales Torca, Guaymaral, Córdoba y La Conejera, ubicados en el norte de Bogotá. Usando la técnica de producción de halos de hidrólisis en agar almidón, carboximetilcelulosa y crecimiento en agar extracto aserrín, se seleccionaron 51 cepas: 18 microorganismos amilolíticos, 11 celulolíticos y 22 lignolíticos.

La microscopia microbiana mostró que el 50,98% de las cepas seleccionadas son bacilos Gram positivos, el 33,33% bacilos Gram negativos y el 15,69% hongos.

Los medios de cultivo y las técnicas de evaluación de actividad enzimática permitieron el aislamiento de microorganismos en cada uno de los humedales, siendo las cepas obtenidas de La Conejera las de mayor potencial enzimático.

Con los microorganismos aislados productores de celulasas, lignocelulasas y amilasas se realizará la producción de enzimas que serán utilizadas en la degradación de materiales vegetales para la obtención de etanol, extractos vegetales y otros productos de interés dentro de los proyectos de formación del Centro de Gestión Industrial.

Palabras clave: microorganismos amilolíticos, microorganismos celulolíticos, microorganismos lignolíticos, actividad enzimática, humedal.

ABSTRACT

Using samples from the Torca, Guaymaral, Córdoba and Conejera marshlands located in the north of Bogota city, microorganisms with enzymatic activity were isolated. Using the halo hydrolysis in starch agar production, carboxymethylcellulose and sawdust extract agar growth, 51 strains were selected, 18 of which are amylolytic, 11 cellulolytic and 22 lignolytic.

The microbial microscopy showed that 50.98% of the selected strains are Gram positive bacilli, 33.33% Gram negative and 15.69% fungi.

The culture medium and the enzymatic activity evaluation technique allowed the microorganism isolation in every marshland, in which the strains collected from La Conejera marshland being the ones with higher enzymatic value.

The culture medium and the enzymatic activity evaluation technique allowed for the isolation of the microorganisms in each of the marshlands, with the strains obtained from La Conejera being the ones with the most enzymatic potential. With the cellulase, lignocellulose and amylases producing microorganisms isolated, the production of enzymes that are going to be used in the degradation of vegetable materials in order to obtain methanol, vegetables extracts and other products will begin. These products are of major interest for the educational projects in the Industrial Management Center.

Keywords: Amylolytic Microorganisms, Cellulolytic Microorganisms Ligninolytic Microorganisms, Enzyme Activity, Marshlands.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos con características enzimáticas brindan una opción en la obtención de metabolitos que puedan ser usados a nivel industrial, aprovechando procesos de biodegradación de los polisacáridos como el almidón, celulosa y lignina, que se encuentran de manera abundante en la naturaleza, específicamente en el material vegetal (Dávila & Vázquez-Duhalt, Enzimas lignocelulolíticas fúngicas para fines ambientales, 2006).

El programa de formación de Química Aplicada a la Industria en el CGI desarrolla proyectos que usan solventes y ácidos para la extracción e hidrólisis de material vegetal. Este trabajo presenta metodologías y resultados del aislamiento y selección de microorganismos productores de enzimas lignolíticas, amilasas y celulasas que permitirán la sustitución de reactivos químicos por compuestos de origen microbiano, generando alternativas de tecnologías limpias.

1. Marco conceptual

El almidón se encuentra en casi todas las plantas, está compuesto por amilosa, constituida por 1.000 a 5.000 moléculas de glucosa y amilopectina, formada por 6.000 a 20.000 unidades de glucosa (Allinge, Cava & De Jongh, 1976). Los microorganismos amilolíticos utilizan enzimas

reductoras para producir azúcares simples. Dentro de estos se identifican bacterias como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Streptomyces* sp. (Sánchez y otros, 2005).

La celulosa es un polímero de origen vegetal constituido por 15.000 moléculas de D-glucosa. Forma una estructura rígida de cadenas paralelas unidas por puentes de hidrógeno (Cuamatzi, 2004). Los microorganismos celulolíticos son mesofílicos, termofílicos, aerobios y anaerobios de los géneros *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Streptomyces* y hongos como *Sclerotium* sp., *Aspergillus* sp., *Achlya* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. (Gaitán & Pérez, 2007).

La lignina conforma la pared celular de las plantas, es un polímero constituido por celulosa y hemicelulosa (Ortiz, 2009). Los microorganismos lignolíticos catabolizan la celulosa y la hemicelulosa. La mayoría de estos son hongos de la pudrición blanca y algunas bacterias (Dávila & Vázquez-Duhalt, Enzimas lignocelulolíticas fúngicas para fines ambientales, 2006).

2. Materiales y métodos

Se seleccionaron cuatro humedales de la zona norte de Bogotá: Torca, Guaymaral, Córdoba y La Conejera. Se tomaron muestras compuestas de suelo de 100 g y se sembraron en superficie de agar almidón 1% (p/v), carboximetilcelulosa 1%

(p/v) y agar extracto de aserrín. Se incubaron a 30 °C durante 5 días.

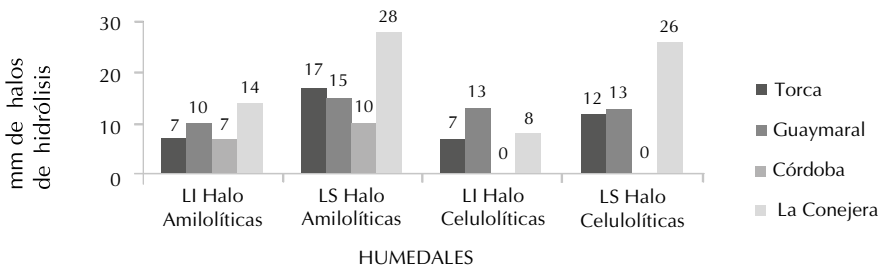
Para revelar halos de hidrólisis de los microorganismos celulolíticos, se usó la técnica de rojo congo al 1% (p/v) según Teather & Wood (1983) y los amilolíticos por adición de lugol (Pedroza, Matiz, Quevedo & Aguirre, 2007). Se realizó la medición del halo seleccionando las cepas (>5 mm); para los lignolíticos se contaron todas las colonias crecidas en el agar extracto de aserrín.

Finalmente, se caracterizaron macroscópica y microscópicamente las colonias y se criopreservaron a -86 °C.

3. Resultados

Los resultados de la medición de la actividad enzimática se presentan en la Figura 1, donde se indican los límites inferiores (LI) y límites superiores (LS) del tamaño de los halos de hidrólisis.

Figura 1. Límites superiores e inferiores de los diámetros de los halos de las cepas seleccionadas



Fuente: autores.

En la Tabla 1 se indica el número de muestras tomadas y cepas seleccionadas por cada uno de los microorganismos evaluados.

Tabla 1. Número de cepas amilolíticas, celulolíticas y lignocelulolíticas seleccionadas

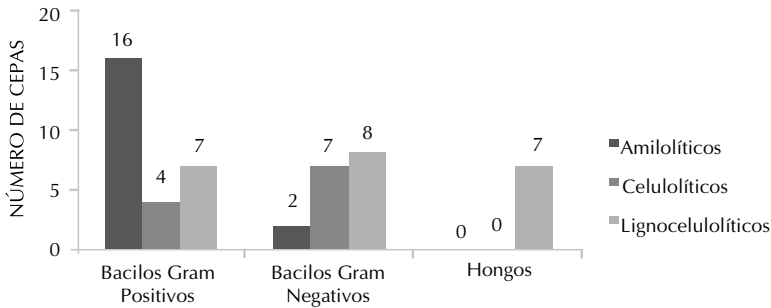
Humedales	Nº de muestras	Cepas amilolíticas	Cepas celulolíticas	Cepas lignocelulolíticas	Total
Torca	4	8	4	6	18
Guaymaral	3	3	1	1	5
Córdoba	5	4	0	7	11
La Conejera	5	4	6	8	18
Total	17	19	11	22	52

Fuente: autores.

De la identificación microscópica de las cepas seleccionadas se ob-

tuvieron los resultados presentados en la Figura 2.

Figura 2. Identificación microscópica de las cepas seleccionadas de acuerdo con su actividad enzimática



Fuente: autores.

4. Análisis de resultados

En los cuatro humedales se logró el aislamiento de microorganismos con actividad enzimática. Se seleccionaron 51 cepas, 18 se aislaron de las muestras provenientes del humedal de Torca y 18 de La Conejera. Estos dos humedales aportaron la mayor cantidad de cepas de interés (ver Tabla 1).

Las cepas obtenidas del humedal de La Conejera presentaron halos de hidrólisis de almidón y celulosa más grandes que las encontradas en los otros humedales. Los microorganismos seleccionados fueron bacilos Gram positivos (27 cepas), seguidos de los bacilos Gram negativos (17) y de hongos (7). Asimismo, 16 de las 18 cepas amilolíticas son bacilos Gram positivos que pueden perte-

necer a *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* (Vihinen & P., 1989).

Aislamientos previos realizados por Suescún *et al.* (s. f.) muestran que en el humedal La Conejera se han encontrado cepas del género *Bacillus* sp., dentro del cual se reportaron varias especies, como *Bacillus polymyxa*, *B. mycoides*, *B. circulans*, indicando que los microorganismos aislados en el presente estudio podrían pertenecer a estos microorganismos.

Las dos cepas amilolíticas Gram negativas seleccionadas pueden corresponder a *Acinetobacter* sp. y a *Aeromonas hydrophila* (Montor, 2013). Mora y Valencia en el 2009 lograron aislar *Aeromonas* sp. con potencial enzimático a partir de muestras de sedimentos

del humedal Jaboque, ubicado en la localidad de Engativá, lo que permite evidenciar la presencia de este microorganismo en los humedales de la ciudad de Bogotá.

Dentro de los celulolíticos seleccionados se encuentran bacilos Gram negativos y Gram positivos que podrían pertenecer a *Cytophaga* sp., *Corynebacterium* sp., *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., Actinomycetes, *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Microbispora* sp., *Thermomonospora* sp., los cuales han sido reportados con actividad celulolítica (Lynd, Weimer, Zyl & Preterius, 2002). Rueda y colaboradores (2009) aislaron diez cepas de actinomicetos en dos zonas del humedal La Conejera. Asimismo, se han logrado aislamientos de cepas de *Pseudomonas* sp. en este humedal por Suescún *et al.* (s. f.); Mora y Valencia (2009) recuperaron esta especie microbiana del humedal Jaboque, demostrando que este grupo bacteriano celulolítico está presente como parte de la carga microbiana nativa del suelo de los humedales.

Las cepas lignolíticas elegidas muestran la presencia de ocho hongos miceliales que pueden clasificarse como *Phanaerochaete chrysosporium*, *Poliporus* sp., *Poria* sp., *Fomes* sp., *Agaricus* sp., *Pleurotus* sp., *Collybia* sp., *Schizophyllum* sp. y *Fusarium* sp. (Atlas & Barton, 2005). Las bacterias lignolíticas pueden ser identificadas como *Arthrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp.

y *Pseudomonas* sp. (Atlas & Barton, 2005). Suescún *et al.* (s. f.) reportaron la presencia de *Flavobacterium* sp. en suelos provenientes del humedal La Conejera, indicando la posibilidad de que alguna de las cepas bacterianas lignolíticas aisladas pertenece a este género.

Es necesario realizar una nueva selección de cepas a partir de las 51 obtenidas; se recomienda hacer siembra por punción asegurando datos más significativos referentes a la elección de microorganismos. Paralelamente, se deben utilizar pruebas cuantitativas para determinar la actividad enzimática, como la técnica de Somogyi Nelson (Rodríguez, 2000), el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959), y ensayos de termorresistencia, antagonismo e identificación microbiana.

Este estudio preliminar permite la obtención y selección de microorganismos a partir de los cuales se puedan producir enzimas para la degradación de residuos que contengan lignina, celulosa o almidón. Esto con el fin de permitir el uso de residuos orgánicos y biomasa vegetal como materia prima para la obtención biotecnológica de productos como etanol y extractos vegetales de interés farmacéutico y cosmético, remplazos de los reactivos químicos utilizados en procesos de extracción e hidrólisis por una tecnología más amigable con el medio ambiente.

REFERENCIAS

- Allinge, N., Cava, M., & De Jongh, D. (1976). *Química orgánica*. España: Editorial Barcelona Reverté.
- Atlas, R., & Barton, R. (2005). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. España: Pearson Educación S. A.
- Cuamatzi, O. (2004). *Bioquímica de procesos metabólicos*. España: Editorial Barcelona Reverte.
- Dávila, G., & Vázquez-Duhalt, R. (2006). *Enzimas lignocelulolíticas fúngicas para fines ambientales*. Mensaje Bioquímico, pp. 29-55.
- Gaitán, D., & Pérez, L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en cultivo de crisantemo*. Tesis pregrado. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Lynd, L., Weimer, P., Zyl, H., & Preterius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 577-583.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Montor, J. (2013). *Caracterización de amilasas producidas por bacterias de suelo cultivadas con caña de azúcar*. San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Mora, L. C., & Zapata, H. V. (2006). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad lipolítica provenientes de sedimentos del humedal El Jaboque. Bogotá, Colombia: *Acta Biológica Colombiana*, 11 (2), 109.
- Ortiz, M. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Redalyc*, 3 (2), 137-144.
- Pedroza, A., Matiz, A., Quevedo, B., & Aguirre, A. (2007). *Manual de introducción a la biotecnología*. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Rodríguez, M. (2000). *Towards identifying biochemical markers for post harvest physiological deterioration in Cassava*. Ph.D. thesis. United Kingdom: University of Bath.
- Sánchez, C., Mejía, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., M, Z., y otros. (2005). Estudio de cepas nativas amilolíticas. *VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 12 (2), 21-28.
- Suescún, G., Bernal, J., & Martínez, P. (s. f.). *Degradación de benceno por microorganismos rizosféricos aislados de Limnobium laevigatum en el humedal La Conejera*. Bogotá-Colombia: Cuarto Simposio Internacional de Desarrollo Sustentable.
- Teather, R., & P, W. (1982). Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 777-780.
- Vihinen, M., & P, M. (1989). Microbial amilolytic enzymes. *Biotech. Lab*, 329-418.