

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS EN LA ANTARTIDA, PRODUCTORAS DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Bello, E.¹, Zambrano, D.², Guzmán, A.¹⁻²

1. Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí. Ciudadela Universitaria Vía San Mateo. Manta. Manabí, Ecuador.
2. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” 10 de Agosto N°.82 y Granda Centeno. Calceta. Manabí, Ecuador.

Contacto: enrikitsbello@hotmail.com

1. RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar y seleccionar bacterias de la Antártida productoras de enzimas degradadoras de residuos orgánicos fibrosos. Se consideraron cuatro islas para realizar el muestreo: Greenwich (IGA) (IGB) (IGC); Dee (I.D) y Torres (I.T) y Barrientos (B). Para el aislamiento se usó agar nutriente. Se obtuvieron 190 aislamientos bacterianos a los cuales se les realizó la tinción de Gram, prueba de catalasa, y se observó la presencia de endosporas; quedando 158 bacterias con características similares a *Bacillus spp.* El criterio principal de selección fue la determinación de la actividad celulolítica sobre agar Carboximetilcelulosa y su reacción positiva frente a la prueba de rojo congo, observándose zonas claras alrededor de las colonias, encontrándose que 28 bacterias produjeron halo de hidrólisis. La bacteria IGB-3 proveniente de la zona B de la isla Greenwich mostró mayor halo de hidrólisis con 6,52 mm de diámetro, obteniendo también el mayor halo de hidrólisis del almidón con 6,40 mm de diámetro.

Palabras Clave: Ambientes extremos, bacilos, celulosa, celulasa.

2. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en bacterias que provienen de ambientes extremos han aumentado debido a las propiedades de sus enzimas que tienen un gran potencial como biorrecursos para aplicaciones biotecnológicas, se le puede dar aplicación en diferentes áreas como la producción de alimentos, minería, procesamiento de basura, biorremediación ambiental, productos de interés

para la agricultura, la medicina y el diagnóstico molecular (Gonzales, *et al.*, 2010).

El último continente posee una variedad ambiental que ha permitido la adquisición de "valiosos" datos sobre más de 200 microorganismos "únicos", "que nunca han sido estudiados" (Blamey 2008).

La vida de los microorganismos capaces de vivir en condiciones extremas, está influenciada por la disponibilidad de nutrientes y de la necesidad de protegerse contra el congelamiento (Castro, 2010). Los organismos que habitan en estos lugares se conocen en términos genéricos como extremófilos y su denominación específica está en directa relación con la condición extrema más relevante que existe en el lugar donde se desarrollan: acidófilos (ambientes ácidos), alcalófilos (ambientes básicos), halófilos (requieren una alta cantidad de sales), termófilos (temperatura entre 65°C y 85°C), hipertermófilos (sobre 85°C) (Baeza, *et al.*, 2010).

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos puros. Para obtener cultivos axénicos o puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX (Wistreich, 1983).

Para efectuar el estudio de los microorganismos, se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones artificiales, en los que es posible cultivarlos bajo condiciones experimentales y manejar un solo tipo de microorganismo (Madigan, *et al.*, 2004).

El objetivo de este estudio fue aislar, seleccionar y caracterizar bacterias de la Antártida con actividad celulolítica que tengan potencial para ser empleados en la degradación de residuos orgánicos.

3. DESARROLLO

3.1. METODOLOGÍA

3.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO

Esta actividad se desarrolló en cuatro islas en la Antártida: en las tres zonas de la isla Greenwich (IGA) (IGB) (IGC); isla Dee (I.D) y Torre (I.T) y la isla Barrientos. EL muestreo se realizó en zig-zag, se tomaron 25 submuestras en cada isla, luego de esto se homogenizaron cada 5 submuestras para obtener una muestra compuesta, en total se obtuvieron 5 muestras compuestas de las islas Dee y Torres; en el caso de Greenwich que posee tres zonas por lo cual se tomaron 3 muestras compuestas de cada una de ellas.

3.1.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRELIMINAR DE LAS BACTERIAS DE LOS DIFERENTES AMBIENTES

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM "MFL". Para el aislamiento se tomaron 10 g de sustrato de las muestras colectadas en cada una de las islas y se siguió la metodología de las diluciones seriadas (Stanier y Ingraham 1996). Se utilizó el medio agar nutritivo (Baeza, 2010). Se hicieron diluciones (1:10) hasta 10^{-6} y se sembraron por triplicado las diluciones, desde 10^{-4} hasta 10^{-6} . Posteriormente, se incubaron por 24 horas a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$. Se seleccionaron todas las colonias con características morfológicas diferentes y se sembraron en tubos con agar nutriente inclinado para su conservación. A todas las bacterias aisladas se les realizó tinción de Gram, prueba de la catalasa, (Harrigan y McCance) y tinción de endosporas (Le *et al.*, 2004). Se seleccionaron aquellas que resultaron bacilos Gram positivos, con presencia de endosporas, catalasa positiva.

3.1.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA

Los aislamientos bacterianos seleccionados se sembraron en agar CMC en punción. Dicho medio estaba compuesto por CMC 1 %, extracto de levadura 0.25 %, peptona 0.25 %, sulfato de amonio 0.05 %, cloruro de calcio 0.05 %, fosfato monobásico de potasio 0.01 %, fosfato dibásico de potasio 0.01 % y

agar 1.5 %; el pH del medio fue ajustado a 7.0 e incubó a 37°C por 72 horas. Culminado el tiempo de incubación se reveló la degradación de CMC cubriendo el medio con solución de rojo congo 1 % (p/v) (Teather y Wood 1982). El colorante se dejó actuar por 15 min, se retiró el exceso y se lavó dos veces con solución de cloruro de sodio 2 mol/L, dejando en reposo durante quince minutos. Transcurrido este tiempo se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros (Gaitán y Pérez 2007).

3.1.4. ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

Las bacterias seleccionadas se inocularon en placas con agar almidón al 1% (p/v). El medio se modificó con una composición a base de almidón soluble 1%, extracto de levadura 0,25%, peptona 0,25%, sulfato de amonio 0,05%, cloruro de calcio 0,05%, fosfato monobásico de potasio 0,01%, fosfato dibásico de potasio 0,01% y agar 1,5%. El pH se ajustó a 5,6. Se incubó a 30°C por 72 horas. La degradación se reveló utilizando una solución de lugol al 0,5% (p/v) (Wen-Jing *et al.*, 2012; Sun y Zhao 2010).

3.2. RESULTADOS

3.2.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRELIMINAR DE LAS BACTERIAS DE LOS DIFERENTES AMBIENTES

Se obtuvieron un total de 190 aislados bacterianos; en cuanto al sitio de muestreo la isla Greenwich y torres obtuvieron el mejor porcentaje de aislamientos mientras que en la isla Dee se obtuvo el tercer mejor porcentaje de aislamientos bacterianos. De las 190 bacterias aisladas 158 resultaron bacilos Gram-positivas, catalasa positiva, formadoras de endosporas (Tabla I). Estas características se relacionan con bacterias pertenecientes al género *Bacillus*; según el método clásico de identificación de microorganismos que utiliza como criterio de diferenciación los caracteres fenotípicos, morfológicos y fisiológicos (Harrigan y McCance; Mayea, *et al.*, 1997). La observación de la morfología y esporulación, la respuesta a la tinción de Gram y algunas pruebas bioquímicas permiten, en el caso de *Bacillus* spp., ubicarlos dentro de su género (Sosa, *et al.*, 2011).

Tabla I. Aislamiento y selección preliminar de bacterias

Islas	Bacterias aisladas	%
Greenwich	94	59,49
Dee	20	12,66
Torre	23	14,56
Barrientos	21	13,29
Total	158	100

3.2.2. PRESELECCIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORES DE CELULOSA

En la tabla II se muestran los 28 aislamientos bacterianos que tuvieron respuesta positiva en cuanto a la capacidad celulolítica; se muestra que el aislado IGB-3 alcanzo el mayor promedio de halo de hidrólisis de la celulosa con 6,52 mm. Se seleccionaron aquellos aislados bacterianos que en la evaluación de la degradación de la celulosa superaron los 6 mm de diámetro del halo de hidrolisis.

Tabla II. Actividad celulolítica

Islas	Aislamiento	Halo de Hidrolisis
Greenwich zona A	IGA-1	5,46
	IGA-2	5,10
Greenwich zona B	IGB-2	4,08
	IGB-3	6,52
	IGB-4	2,27
	IGB-5	4,10
	IGB-6	6,50
	IGB-7	2,30
	Greenwich zona C	IGC-1
	IGC-2	5,70
Dee	ID-1	4,25
	ID-2	5,95
	ID-3	5,75
	ID-4	5,33
	ID-5	3,83
	ID-6	4,30
	ID-7	6,00
	ID-8	5,80
	ID-9	5,30
	ID-10	3,80

Torres	IT-1	5,33
	IT-2	4,50
	IT-3	5,27
	IT-4	4,60
	IT-5	5,30
	IT-6	4,50
	IT-7	5,30
	IT-8	3,30

3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS BACTERIAS CELULOLÍTICOS SELECCIONADOS

En la Tabla III se presentan los valores del halo de hidrólisis en almidón que indican la capacidad amilolítica de las bacterias seleccionadas.

Tabla III. Actividad amilolítica

Islas	Aislamiento	Halo de Hidrolisis
Greenwich zona B	IGB-3	6,4
	IGB-6	6,0
Dee	ID-7	6,2

3.3. CONCLUSIONES

Se aislaron un total de 190 cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron 158 mediante la tinción de Gram (Gram positivas), prueba de catalasa, y por la presencia de endosporas.

Por la capacidad de degradación de la celulosa se seleccionaron 28 bacterias mediante la observación zonas claras alrededor de las colonias.

La cepa bacteriana I.GB-3 proveniente de la Isla Greenwich produjo el mayor halo de hidrólisis de la celulosa con 6,52 mm diámetro y también presento el mayor halo de hidrolisis de almidón con 6,40.

4. BIBLIOGRAFÍA

Baeza, M. Veliz, D. Barahona, S. Cifuentes, V. 2010. Levaduras antárticas: potencial como herramienta ecológica y fuente de enzimas y metabolitos de interés biotecnológico. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29(1).

Blamey, J. 2008, Antártica, fuente de recursos biológicos para la biotecnología nacional, volumen 27 # 1, Boletín antártico chileno 6.

Castro, M. 2010. Microorganismos termófilos provenientes de la isla Decepción. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29(1).

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. Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P 64.

González, G. Sánchez, R. Alegría, K. 2010. Bacterias antárticas: un potencial para la producción de compuestos con actividad antibacteriana. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29(1).

Harrigan, W. y McCance, M. Métodos de laboratorio de Microbiología. 1968. España.

Le H. Duc. H., Hong. T. Barbosa. A. Henriques. S. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. s.l. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 70. 2161-2171.

Madigan, Michael L; Martinko, John M; Parker, Jack. 2004. "Brock Biología de los microorganismos"; 10ª edición; Pearson Educación; Madrid.

Mayea, S. Novo, R. Boado, I. Silveira, E. Soria, M. Morales, Y. Valiño, A. 1997. Microbiología Agropecuaria. Tomo 1. p 15-52.

Sosa, A. Álvarez, V. Torres, D. Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. 1, s.l. : Fitosanidad, Vol. 15. p 39-44.

Stanier, R. y Ingraham, J. Microbiología. . s.l. : Ed. Reverté S.A. , 1996. 195.

Sun, P. y Zhao, X. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, vol. 160, pp. 988-1003. ISSN 1559-0291.

Teather, R; Wood, P. 1982. Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ. Microbiol. Vol. 43. p 777-780.

Wistreich, G. 1983. Prácticas de laboratorio en Microbiología. Primera edición. Editorial Limusa, México. 54-55p

Wen-Jing, L.; Hong-Tao, Wang; Yong-feng, Nie; Zhi-Chao, Wang; De-Yang, Huang; Xiang-yang, Quiu. y Jin-Chun, Chen. Effect of Inoculating Flower Stalks and Vegetable Waste with Ligno-cellulolytic Microorganisms on the Composting Process. *Journal of Environmental Science and Health*, 2012, vol. 39, pp. 871-887. ISSN 1532-4117.