



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE
MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

II EVENTO INTERNACIONAL

PONENCIA: SIMPOSIO 1

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS
PRODUCTORAS DE ENZIMAS POTENCIALMENTE ÚTILES EN LA
DEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA**

AUTORES:

**Ing. Diego Efrén Zambrano Pazmiño
Ing. Ángel Monserrate Guzmán Cedeño
Dra. C. Ana Julia Rondón Profesora
Ing. Marta Laurencio Silva
Dr. C. Manuel Pérez Quintana**

FECHA:

AGOSTO DE 2013

INTRODUCCIÓN

La disposición final de la gran cantidad de residuos orgánicos producidos en el mundo representa 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 es considerado simplemente 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).

La celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza, es sintetizada por una variedad de organismos. (Contreras *et al.*, 2004). Los organismos capaces de degradarla son principalmente hongos y bacterias, ellos son reconocidos por la habilidad de producir enzimas no sólo celulasas sino también amilasas, proteasas y peptidasas entre otras; que les permite el reciclado de material orgánico de nuevo al suelo.

Los microorganismos capaces de degradar la celulosa en los hábitas 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 (Díaz *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 que se encuentran en una fracción del suelo cumplen funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos; son trabajadores anónimos que hacen que este sea fértil descomponiendo la materia orgánica hasta la más mínima expresión haciendo posible la absorción de muchos compuestos y elementos por las plantas (Del rosario y Borrero, 2005).

DESARROLLO

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN. La investigación se realizó en áreas de agricultura orgánica, convencional y de bosque de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” (ESPAM-MFL), en un campo 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, Manabí, Ecuador. En todos los ambientes se colocaron placas-trampas a una profundidad de 10 cm (Martínez *et al.* 2008), también se tomaron muestras directas de suelo, en los mismos puntos de localización de las trampas (Sánchez *et al.*, 2012).

SELECCIÓN INICIAL DE CEPAS FÚNGICAS

CAPTURADORES (TRAMPAS). Las placas-trampas se prepararon con celulosa y se ubicaron a una profundidad de 10 cm en los mismos puntos de localización donde se extrajeron las muestras de suelo. Transcurridas 72 horas, las placas se retiraron y se llevaron al laboratorio, así como las muestras tomadas directamente de suelo. Las cepas de hongos filamentosos, que crecieron en las placas Petri, se

aislaron según la forma y el color de la colonia y se sembraron en tubos con Agar Sabouraud.

MUESTRAS DE SUELO. Los hongos celulolíticos fueron aislados por diluciones seriadas. Se preparó una suspensión al 10% (p/v) en solución salina estéril con un gramo de suelo. La siembra se realizó en placas petri en un medio cuya única fuente energética era la celulosa. Se efectuaron diluciones hasta 10^{-3} y se sembraron por triplicado las diluciones entre 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Posteriormente, se incubaron por 72 horas a 30°C . Seguidamente, se hizo la resiembra y purificación.

SELECCIÓN DE ACUERDO A CARACTERÍSTICAS DESEABLES

Para la selección se emplearon los ensayos de degradación cuantitativa de la celulosa, crecimiento radial y la degradación del almidón.

SEGUNDA SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

PRUEBA DE DEGRADACIÓN CUALITATIVA DE CELULOSA. Consistió en la siembra en punción en Carboximetilcelulosa; 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 minutos, se retiró el exceso y se adicionó una solución de cloruro de sodio a 2 mol.L^{-1} , con reposo durante quince minutos. Transcurrido este tiempo, se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros (Gaitán y Pérez, 2007).

TERCERA SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

CRECIMIENTO RADIAL

Para la medición del crecimiento radial se partió de un cultivo puro que se sembró en punción en el centro de la superficie (colonia gigante) en Agar Sabouraud. Las cajas se incubaron a 30°C por 72 horas, transcurrido este tiempo se midió el crecimiento radial con una regla milimetrada.

CUARTA SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

Se empleó una modificación del método en placas mencionado para la degradación de la celulosa, reemplazando la CMC por almidón a 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del aislamiento de las cepas fúngicas se presentan en el cuadro 1, donde se aprecia que el 38,16% de las cepas aisladas proviene del área convencional; que a pesar que es un área donde se aplican grandes cantidades de agroquímicos, los hongos probablemente se han adaptado a estas condiciones. En orden de importancia por el número de cepas aisladas le corresponde a las muestras tomadas en el compost donde se obtuvieron el 19,08% del total de cepas.

Cuadro 1. Número de cepas de hongos aisladas según la forma de muestreo en cada ambiente

Ambientes	Forma de captura		Total	%
	Trampa	Muestra de suelo		
Área orgánica	12	9	21	16,03053
Área convencional	34	16	50	38,16794
Bosque	2	14	16	12,21374
Área cañera	0	19	19	14,50382
Compost	0	25	25	19,08397
Total	48	83	131	100

SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS DEGRADADORES DE CELULOSA. En el cuadro 2 se muestran los resultados de la degradación de la CMC y de crecimiento radial de las 48 cepas aisladas desde los diferentes ambientes. En relación con la degradación de CMC, la cepa A.O-8 aislada de agricultura orgánica mostró el mejor resultado con 10,67 UI/mm ($P \leq 0,05$). El crecimiento radial fue superior, en esa misma cepa, con 42,25 UI/mm ($P \leq 0,05$).

SELECCIÓN POR SU CAPACIDAD BIODEGRADATIVA Y POR SU CRECIMIENTO

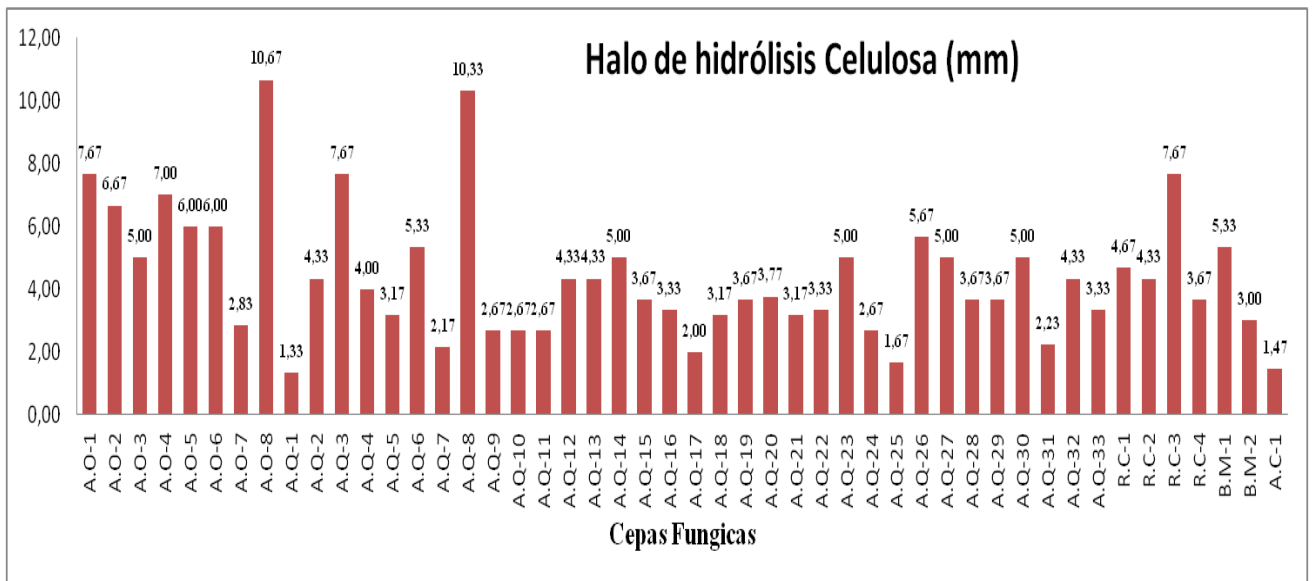
Cuadro 2. Degradación de cepas fúngicas en CMC y por su crecimiento radial a las 72 horas

Ambiente	Cepas fúngicas	Halo	Crecimiento mm
Área orgánica	A.O-1	7.67	20.75
	A.O-2	6.67	9.333
	A.O-3	5.00	21.17
	A.O-4	7.00	19.77
	A.O-5	6.00	19.17
	A.O-6	6.00	15.29
	A.O-7	2.83	16.50
	A.O-8	10,67	42,25
Área compost	A.C-1	1.47	15.67
Área convencional	A.Q-1	1.33	14.20
	A.Q-2	4.33	16.00
	A.Q-3	7.67	6.250
	A.Q-4	4.00	14.63
	A.Q-5	3.17	5.417
	A.Q-6	5.33	15.67
	A.Q-7	2.17	29.75
	A.Q-8	10.33	29.88
	A.Q-9	2.67	15.46
	A.Q-10	2.67	16.50
	A.Q-11	2.67	23.21
	A.Q-12	4.33	14.75
	A.Q-13	4.33	14.75
	A.Q-14	5.00	15.75
	A.Q-15	3.67	18.33
	A.Q-16	3.33	12.93
	A.Q-17	2.00	11.29
	A.Q-18	3.17	14.88
	A.Q-19	3.67	20.54
	A.Q-20	3.77	13.42

	A.Q-21	3.17	16.00
	A.Q-22	3.33	16.09
	A.Q-23	5.00	17.58
	A.Q-24	2.67	15.58
	A.Q-25	1.67	14.21
	A.Q-26	5.67	20.04
	A.Q-27	5.00	22.25
	A.Q-28	3.67	18.21
	A.Q-29	3.67	19.08
	A.Q-30	5.00	21.08
	A.Q-31	2.23	19.42
	A.Q-32	4.33	18.88
	A.Q-33	3.33	18.58
Bosque	B.M-1	5.33	20.58
	B.M-2	3.00	21.42
Área Cañera	R.C- 1	4.67	18.57
	R.C- 2	4.33	11.38
	R.C- 3	7.67	26.96
	R.C- 4	3.67	12.58

En el gráfico 1 se muestran las cepas que fueron evaluadas en cuanto al halo de degradación de la celulosa, donde se aprecia que la cepa A.O-8 obtuvo el mayor halo de degradación de la celulosa seguida de la cepa A.Q-8 que alcanzó un promedio de 10.3 mm de diámetro. Los valores mencionados anteriormente superan los encontrados por Villalba, *et al.* (2004), quienes obtuvieron resultados de degradación de la celulosa por hongos del género *Penicillium, sp*; que no superaron los 0.7 y 0.9 cm de diámetro en cada caso.

Grafico 1. Resultados del halo de degradación de la celulosa en CMC

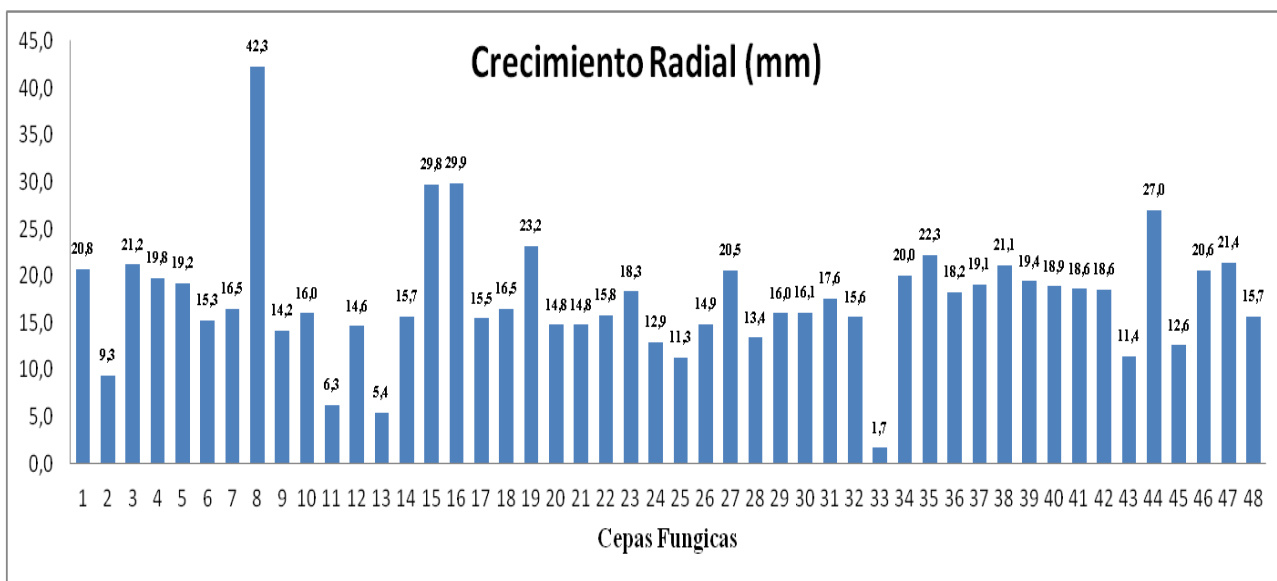


Mediante la prueba cualitativa de la actividad celulolítica según lo expuesto por Gaitán y Pérez (2007) se obtuvieron resultados positivos manifestándose por la presencia de halos de aclareamiento de la hidrólisis de la celulosa. Theather y Wood (1982). Citado por Arroyo, (2010). Manifiesta que la ventaja de este sistema deriva del intenso color del complejo colorante glucano el cual permite la diferenciación visual entre organismos que emplean la celulosa y los que no.

Capacidad de crecimiento

Los promedios de crecimiento, de las cepas, se presentan en la figura 2. La cepa (A.O-8) alcanzó el mayor promedio de crecimiento con 42.3 UI/mm. Por su parte la cepa A.Q-8 alcanzo un promedio de crecimiento radial de 29.9 UI/mm.

GRAFICO 2. RESULTADOS DEL CRECIMIENTO RADIAL A LAS 72 HORAS



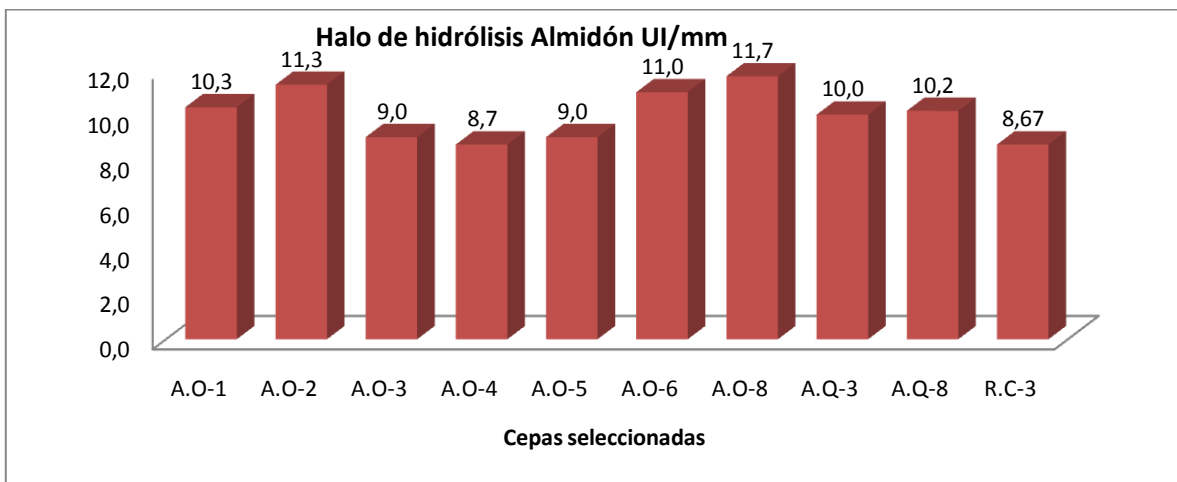
Cuadro 2. Cepas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento

Cepas	Halo de hidrólisis CMC UI/mm	Crecimiento radial (mm)	Halo de hidrólisis Almidón UI/mm
A.O-1	7,67	20,75	10,33
A.O-2	6,67	9,33	11,33
A.O-3	5,00	21,17	9,00
A.O-4	7,00	19,77	8,67
A.O-5	6,00	19,17	9,00
A.O-6	6,00	15,29	11,00
A.O-8	10,67	42,25	11,71
A.Q-3	7,67	6,25	10,00
A.Q-8	10,33	29,88	10,17
R.C-3	7,67	26,96	8,67

DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

En el gráfico 3 se muestran las cepas que fueron evaluadas en cuanto al halo de degradación del almidón, donde se aprecia que la cepa A.O-8 obtuvo el mayor halo de degradación del almidón con 11,7 mm, seguida de la cepa A.Q-8 que alcanzó un promedio de 11,3 mm de diámetro.

GRAFICO 3. CEPAS SELECCIONADAS POR LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN



Sánchez *et al.* (2005) manifiesta que el principio de esta prueba se basa en la incapacidad que presenta el lugol para pigmentar las zonas en las que el almidón ha sido hidrolizado por acción enzimática. Por esta razón se utilizó la prueba de lugol para la determinación de microorganismos que producen enzimas amilolíticas exocelulares, ya que este test permite el reconocimiento de las mismas por la formación de un halo no pigmentado y de diámetro variable este fenómeno se observa cuando se expone el cultivo a la acción del lugol durante un periodo aproximado de 1 a 3 min.

CONCLUSIONES

Se aislaron un total de 131 cepas de cepas fúngicas de diferentes hábitats, siendo el método de diluciones seriadas el más eficiente.

Por la capacidad de degradación de la celulosa se seleccionaron 48 hongos.

La cepa fúngica A.O-8 proveniente del área orgánica del campus politécnico de la ESPAM-MFL produjo el mayor halo de hidrólisis de la celulosa con 10,7 mm, obtuvo además el mayor crecimiento radial con 42,25 mm y fue la más eficiente en su capacidad de degradar el almidón con un promedio de 11,7 mm de diámetro.

BIBLIOGRAFÍAS

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.

Chamorro, C. 2001. El suelo maravilloso teatro de la vida. Rev.Acad. Colombia ciencia. Vol. 25. P 484-486.

Del rosario, S. Borrero, C. 2005. Efectos de Trichoderma (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del Piedemonte Llanero. Revista Orinoquia. Universidad de los Llanos.

Díaz, F. Gonzales, J. Manso, M. Munero, P. Pérez, C. 2005. Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de *Hyphomycetes* nativos de la provincia de villa clara. P 21.

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.* P. 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*)". Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P 64.

Linares, C. Monedero, M. 2004. Uso, manejo y conservación de los suelos. 1 ed. La Habana. Cuba. P 6.

Villalba, L. Mikán, J. Sánchez, J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. Vol.2. # 2. P 50-58.

Sánchez, C. Mejía, C. Figueroa, C. Esquivia, M. Agudelo, L. Zapata, N. Gómez, M. 2005. Estudio de cepas nativas amilolíticas. *Vitae*, Revista de la facultad de química farmacéutica. V 12. P. 21-28. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia.