

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE BACTERIAS AISLADAS DE LA ANTÁRTIDA MEDIANTE EL HALO DE HIDRÓLISIS.

Autores: Ing. Diego Zambrano Pazmiño; Ing. Ángel Guzmán Cedeño; Ing. Enrique Bello Pinargote Ing. Tito Erazo Cedeño.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar y seleccionar bacterias de la Antártida con capacidad celulolítica. Se consideraron tres islas para realizar el muestreo: Greenwich (IGA) (IGB) (IGC); Dee (I.D) y Torres (I.T). Para el aislamiento se usó agar nutriente. Se obtuvieron 20 aislamientos bacterianos a los cuales se les realizó la tinción de Gram, prueba de catalasa, y se observó la presencia de endosporas; quedando 18 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 14 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.

Palabras Clave. Bacterias, ambientes extremos, bacilos, celulosa, celulasa.

1. 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 ¹.

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 ². 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) ³.

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.

2. DESARROLLO

2.1. Recolección de muestras de suelo.

Esta actividad se desarrolló en tres islas en la Antártida: en las tres zonas de la isla Greenwich (IGA) (IGB) (IGC); isla Dee (I.D) y Torre (I.T). 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.

2.2. 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 ⁴. Se utilizó el medio agar nutritivo ³. 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, ⁵ y tinción de endosporas ⁶. Se seleccionaron aquellas que resultaron bacilos Gram positivos, con presencia de endosporas, catalasa positiva.

2.3. 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)⁷. 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 ⁸.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento y selección preliminar de las bacterias de los diferentes ambientes

Se obtuvieron un total de 20 aislados bacterianos (Tabla I); en cuanto al sitio de muestreo la isla Greenwich y Dee obtuvieron el mejor porcentaje de aislamientos mientras que en la isla Torres se obtuvo el segundo mejor porcentaje de aislamientos bacterianos. De las 20 bacterias aisladas 18 resultaron bacilos Gram-positivos, catalasa positiva, formadoras de endosporas. 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 fisiológicos⁵⁻⁹. 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 género¹⁰.

“Tabla I”. Bacterias aisladas en la Antártida.

Islas	Número de bacterias aisladas	%
Greenwich	7	35
Dee	7	35
Torre	6	30
Total	20	100

3.2. Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica y crecimiento microbiano

En la tabla II se muestran los 14 aislamientos bacterianos que tuvieron respuesta positiva en cuanto a la capacidad celulolítica. Al categorizarlo se muestra que el aislado IGB-3 alcanzó 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 5 mm de diámetro del halo de hidrólisis.

Tabla II. Actividad celulolítica por halo de hidrólisis en carboximetilcelulosa.

Islas	Aislamiento	Halo de Hidrólisis
Greenwich zona A	IGA-1	5,46ab DS ±0,36
Greenwich zona B	IGB-2	4,08bc DS ±0,12
	IGB-3	6,52a DS ±0,75
	IGB-4	2,27c DS ±0,52
Greenwich zona C	IGC-1	5,71ab DS ±0,83
Dee	ID-1	4,25abc DS ±0,20
	ID-2	5,95ab DS ±0,27
	ID-3	5,75ab DS ±1,62

	ID-4	5,33ab DS \pm 0,34
	ID-5	3,83bc DS \pm 0,85
Torres	IT-1	5,33ab DS \pm 0,85
	IT-2	4,50abc DS \pm 0,41
	IT-3	5,27ab DS \pm 0,52
	IT-4	4,60ab DS \pm 0,43

4. CONCLUSIONES

Se aislaron un total de 20 cepas de bacterias, de las cuales se seleccionaron 18 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 14 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.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 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).
- [2] Castro, M. 2010. Microorganismos termófilos provenientes de la isla Decepción. Boletín Antártico Chileno. Vol. 29(1).
- [3] 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).
- [4] Stanier, R. y Ingraham, J. Microbiología. . s.l. : Ed. Reverté S.A. , 1996. 195.
- [5] Harrigan, W. y McCance, M. Métodos de laboratorio de Microbiología. . España : Editorial Academia. León, , 1968.
- [6] Le H. Duc. H., Hong. T. Barbosa. A. Henriques. S. Cutting1. Characterization of Bacillus probiotics available for human use. . s.l. : Appl. Environ. Microbiol., 2004. Vol. 70. 2161-2171.
- [7] 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.
- [8] 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.

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

[10] Sosa, A. Álvarez, V. Torres, D. Casadesús, L /. 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, 2011. , Vol. 15. 39-44.