

Caracterización de microorganismos lignocelulolíticos aislados de Cuatro Ciénegas, Coah.

Ethel Paola Que-Baños¹, Édgar Alvaro-Arcos¹, Janneth Escudero-Agudelo², Hamlet Avilés-Arnaut², Susana De la Torre-Zavala², Montserrat Orenco-Trejo³, Argel Gastelum-Arellanez^{4,*}

¹ Ingeniería en Procesos Biotecnológicos, Universidad Tecnológica del Usumacinta, Tabasco, México.

² Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

³ Catedrática de la carrera Ingeniería en Bionanotecnología, Universidad Iberoamericana León, León, Guanajuato, México.

⁴ Cátedra CONACYT - Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas AC., León, Guanajuato, México.

*Autor de correspondencia: argel.gastelum@gmail.com

Energías Renovables (Biocombustibles).

Palabras clave: celulosas; xilanasas; cepas lignocelulolíticas, Cuatro Ciénegas.

Introducción. En el aprovechamiento de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles, la hidrólisis enzimática es una etapa crucial para liberar azúcares bioconvertibles por fermentación en productos de interés. Esta fase del proceso es un reto económico y técnico para el uso de los residuos agroindustriales mediante procesos biotecnológicos. Por esto, resulta necesaria la búsqueda de nuevos microorganismos, que produzcan enzimas con las características necesarias para estos bioprocesos (Orenco-Trejo, 2016). En este trabajo se presenta la evaluación de una colección de aislados bacterianos mesófilos aerobios, productores de celulosas y hemicelulasas, obtenidos de las pozas y suelos del Valle de Cuatro Ciénegas, Coah. Este ecosistema se caracteriza por sus condiciones oligotróficas extremas, que ha generado a través de millones de años especies microbianas únicas en el planeta. Se detectaron aislados prometedores para estudios posteriores, que presentaron grandes halos de hidrólisis, incluso del tamaño de la placa Petri utilizada.

Materiales y Métodos. Los microorganismos fueron aislados de las Pozas Churince, Mojarral y Pozas Rojas, de Cuatro Ciénegas, Coah. Se cultivaron en medio mineral salino sólido, con carboximetilcelulosa (CMC) o xilano (XIL) como única fuente de carbono, hasta obtener cultivos axénicos. El escrutinio se realizó mediante siembra de biomasa fresca en el medio antes mencionado, con incubación a 30 °C durante 8 días. Con esto se favoreció la secreción y difusión de las enzimas de interés en el agar y su actividad hidrolítica sobre el sustrato. Los halos de hidrólisis se visualizaron mediante tinción con rojo Congo, que se asocia a los enlaces β -1,4 del sustrato, por lo que las zonas de hidrólisis del mismo por la actividad enzimática se revelaron en el agar como halos de color claro sobre un fondo rojo (Teather y Wood, 1982). El diámetro de los halos se determinó mediante el programa para análisis de imágenes Fiji 1.45j (Schindelin et al., 2012). Todos los cultivos se realizaron por triplicado. El análisis de los datos se realizó en el entorno R 4.1.1 para análisis estadístico (R Core Team, 2021), aplicando análisis de varianza y comparación de medias mediante prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados. Los microorganismos celulolíticos 14CMC, 10CMC, 5CMC y 3ACMC presentaron halos de hidrólisis en medio sólido con sustrato CMC como única fuente de carbono, significativamente mayores que el resto de los microorganismos evaluados (Figura 1, Tabla 1). Aunque los tamaños de colonia fueron muy similares (aprox. 1.3 cm en promedio), las relaciones halo/colonia sí mostraron diferencias significativas, indicando distintos rendimientos de celulosas por unidad de biomasa. Por otra parte, entre las cepas hemicelulolíticas aisladas se detectaron diferencias significativas entre los tamaños de las colonias generadas, sin embargo, todas las cepas evaluadas presentaron grandes halos de hidrólisis (Figura 2, Tabla 2). Tanto en las cepas celulolíticas como en las hemicelulolíticas, estos grandes halos de hidrólisis indicaron una gran capacidad de producción volumétrica de enzimas, o bien, de enzimas con alta actividad específica, que es necesario explorar en estudios posteriores.

Tabla 1. Diámetro (D) de los halos de hidrólisis observados en medio sólido con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono.

Aislado	D Halo (cm)	D Colonia (cm)	Halo/Colonia
14CMC	6.00 ± 0.00 ^C	1.28 ± 0.02 ^{AC}	4.70 ± 0.09 ^B
10CMC	6.00 ± 0.00 ^C	0.98 ± 0.02 ^C	6.15 ± 0.15 ^A
5CMC	6.00 ± 0.00 ^C	1.06 ± 0.10 ^{BC}	5.78 ± 0.53 ^{BC}
3ACMC	5.13 ± 0.29 ^{ABC}	1.17 ± 0.03 ^{BC}	4.42 ± 0.37 ^{BC}
3CMC	5.10 ± 0.15 ^A	1.56 ± 0.12 ^A	3.29 ± 0.15 ^{CD}
11CMC	3.77 ± 0.74 ^{ABCE}	1.54 ± 0.08 ^A	2.44 ± 0.46 ^{CDE}
12CMC	4.02 ± 0.11 ^{BD}	1.34 ± 0.06 ^{AB}	3.02 ± 0.09 ^{CD}
4CMC	3.46 ± 0.17 ^{DE}	1.28 ± 0.07 ^{AC}	2.70 ± 0.02 ^D
13CMC	3.01 ± 0.11 ^E	1.31 ± 0.02 ^{AC}	2.30 ± 0.06 ^E

En la misma columna, las medias marcadas con la misma letra no fueron significativamente diferentes en la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se muestran la media ± error estándar de tres experimentos independientes.

Tabla 2. Diámetros (D) de los halos de hidrólisis observados en medio sólido con xilano (XIL) como única fuente de carbono.

Aislado	D Halo (cm)	D Colonia (cm)	Halo/Colonia
5XIL	6.00 ± 0.00 ^A	1.10 ± 0.09 ^{CD}	5.54 ± 0.50 ^{AB}
3XIL	6.00 ± 0.00 ^A	0.99 ± 0.05 ^{CD}	6.07 ± 0.30 ^{AB}
4XIL	6.00 ± 0.00 ^A	1.16 ± 0.05 ^{CD}	5.19 ± 0.22 ^{AB}
7XIL	6.00 ± 0.00 ^A	3.44 ± 0.38 ^A	1.79 ± 0.22 ^C
15XIL	6.00 ± 0.00 ^A	1.21 ± 0.03 ^C	4.98 ± 0.11 ^B
17XIL	6.00 ± 0.00 ^A	1.23 ± 0.10 ^{BCD}	4.94 ± 0.42 ^B
10XIL	6.00 ± 0.00 ^A	0.91 ± 0.06 ^D	6.65 ± 0.44 ^A
14XIL	5.27 ± 0.10 ^B	1.68 ± 0.08 ^B	3.14 ± 0.09 ^C

En la misma columna, las medias marcadas con la misma letra no fueron significativamente diferentes en la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se muestran la media ± error estándar de tres experimentos independientes.

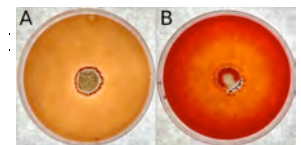


Figura 1. Halos de hidrólisis en medio salino con CMC como única fuente de carbono. (A) aislado 14CMC, (B) aislado 4CMC.

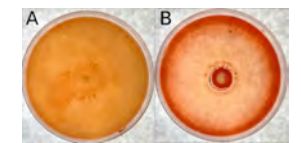


Figura 2. Halos de hidrólisis en xilano, (A) aislado 5XIL, (B) aislado 14XIL.

Conclusiones. Todas las cepas microbianas evaluadas fueron capaces de crecer en medio salino sólido con CMC o XIL como única fuente de carbono, revelando su capacidad de producir celulosas y hemicelulasas. Los microorganismos 14CMC, 10CMC, 5CMC y 3ACMC presentaron halos de hidrólisis significativamente mayores al resto de los aislados celulolíticos. Por otra parte, aunque entre las cepas hemicelulolíticas se detectaron diferencias significativas entre los tamaños de las colonias generadas, todas presentaron grandes halos de hidrólisis. La alta secreción de xilanasas se evidenció por el hecho de que para 7 de los 8 microorganismos, el diámetro del halo fue esencialmente el mismo que el de la caja Petri, provocando la necesidad de comparar las cepas entre sí utilizando placas de cultivo de mayor tamaño en pruebas posteriores. Se sugiere continuar estudiando estos microorganismos con fines tanto de investigación básica como para desarrollo de bioprocesos.

Bibliografía.

- Orenco-Trejo, M., De la Torre-Zavala, S., Rodríguez-García, A., Avilés-Arnaut, H., & Gastelum-Arellanez, A. (2016). Assessing the Performance of Bacterial Cellulases: the Use of Bacillus and Paenibacillus Strains as Enzyme Sources for Lignocellulose Saccharification. *BioEnergy Research*, 9(4), 1023–1033.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M. & Pietzsch T. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-681.
- 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*, 43, 777-780.