

PROYECTO EN CURSO O TERMINADO.

| | |
|---|---|
| Universidad | Universidad Tecnológica de Pereira |
| Programa Académico | Química Industrial |
| Nombre del Semillero | Semillero de Suelos |
| Nombre del Grupo de Investigación (si aplica) | |
| Línea de Investigación (si aplica) | |
| Nombre del Tutor del Semillero | Liliana Bueno López |
| Email Tutor | lilibu@utp.edu.co |
| Título del Proyecto | Actividad Celulolítica de Actinomicetos aislados del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. |
| Autores del Proyecto | |
| Ponente (1) | Luisa Fernanda Manrique Gutiérrez |
| Documento de Identidad | 1088317694 |
| Email | luimanriqueg@utp.edu.co |
| Ponente (2) | Alejandra Ortiz Jaramillo |
| Documento de Identidad | 1088323482 |
| Email | alejaortj@utp.edu.co |
| Teléfonos de Contacto | 3162568165-3177080212 |
| Nivel de formación de los estudiantes ponentes (Semestre) | Noveno |
| MODALIDAD (seleccionar una- Marque con una x) | PONENCIA <ul style="list-style-type: none"> • Investigación en Curso • Investigación Terminada (x) |
| Área de la investigación (seleccionar una- Marque con una x) | • Ciencias Naturales (x) |
| | • Ingenierías y Tecnologías |
| | • Ciencias Médicas y de la Salud. |
| | • Ciencias Agrícolas (x) |
| | • Ciencias Sociales |
| | • Humanidades |
| | • Artes, arquitectura y diseño |

Actividad Celulolítica de actinomicetos aislados del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira

Alejandra Ortiz Jaramillo, Luisa Fernanda Manrique Gutiérrez

Resumen

Debido a la disponibilidad y la capacidad que tienen los actinomicetos de generar enzimas capaces de hidrolizar enlaces glucósidos. Se aislaron actinomicetos del Bosque de guadua suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP) para cuantificar por medio de técnica DNS la capacidad que tienen estos microorganismos de degradar celulosa presente en la materia orgánica; estos no han sido muy estudiados en cuanto a su actividad celulolítica en tesis anteriores. Este proyecto puede servir como base para que en estudios posteriores los actinomicetos puedan ser presentados como un recurso clave a nivel de la biotecnología agroindustrial. Además se identificaron taxonómicamente hasta un posible género por medio de análisis microscópico y macroscópico en un microcultivo, pruebas bioquímicas, aunque las pruebas realizadas no son parámetro suficiente para confirmar un posible género, también se utilizó un método instrumental como lo es espectroscopia Infrarroja (IR), para esto se utilizó un análisis estadístico multivariado utilizando el software *Infostat*.

Palabras clave— Actinomicetos, actividad celulítica, técnica DNS

Introducción

Los Actinomicetos son microorganismos pertenecientes al suelo que tienen la capacidad de degradar materia orgánica vegetal lo que conlleva a un rango de actividades. Estas acciones mejoran la salud de la planta y la calidad estructural del suelo, factores claves de la fertilidad del mismo. Es por esto que se pretende estudiar el uso de microorganismos como los actinomicetos, los cuales han sido estudiados a lo largo del tiempo por el papel importante que desempeñan en diferentes disciplinas del saber y su gran disponibilidad, ya que se encuentran distribuidos en ecosistemas naturales especialmente en suelos, dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo debido a la capacidad que tienen estos para producir un metabolito llamado geosmina, estos microorganismos carecen de núcleo como las bacterias pero poseen filamentos multicelulares como los hongos, lo que los hace muy similares, sin embargo hoy en día y dado a su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias [1].

Estos microorganismos son importantes por su participación en la degradación de materia orgánica, promoción de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno en plantas, control biológico de fitopatógenos y procesos de biorremediación natural del suelo [2]. Los actinomicetos cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para degradar celulosa generando enzimas como $\text{exo-}\beta\text{-1,4-Glucanasa}$, $\text{endo-}\beta\text{-1,4-Glucanasa}$ y $\beta\text{-1,4-Glucosidasa}$, que permiten romper químicamente residuos ricos en celulosa, lignina, quitina y proteínas [3]. Es por esto que es importante su participación en la degradación de materia orgánica de origen animal y vegetal. La celulosa es uno de los muchos polímeros encontrados en la naturaleza el cual puede convertirse en una de las reservas de energía renovable más abundantes, además es útil para los microorganismos por dos razones: como suministro de energía para el crecimiento de los mismos y como fuente de carbono para la

formación del nuevo material celular. Los microorganismos encargados de la degradación de la celulosa como los actinomicetos cuentan con las enzimas necesarias para dicho propósito, por tal razón, su aislamiento e identificación representa un importante recurso para lograr la disminución del impacto ambiental [4].

Actualmente los suelos agrícolas están empobrecidos por el uso excesivo de maquinaria, aplicación de fertilizantes de síntesis química y plaguicidas esto con el fin de mantener e incrementar los rendimientos de los cultivos pero a su vez esta aplicación genera un impacto ambiental negativo, ya que ocasiona la disminución de la biodiversidad y contenido de materia orgánica, además daño de la estructura y aumento de la compactación del suelo, debido a esto las plantas son más vulnerables al ataque de plagas y enfermedades [5].

Es por esto que se ha querido estudiar nuevas técnicas que no sean nocivas para el medio ambiente, por consiguiente una vez estudiada la capacidad que tienen los actinomicetos para degradar celulosa se podría estudiar sus subproductos y poder estudiar estos microorganismos para implementar una estrategia de bioaumentación en estudios posteriores y poderlo presentar como recurso clave a nivel de biotecnología agrícola, la cual implica la incorporación al suelo de microorganismos benéficos estimula la actividad biológica edáfica y manteniendo el reciclaje de nutrientes en el suelo. Además, permite la formación de agregados e indirectamente reduce los requerimientos de fertilización química de los cultivos [6].

Planteamiento del problema

La celulosa es un importante constituyente carbonado de las plantas superiores, algas y diversos tipos de hongos y probablemente el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, debido a que la mayoría de la vegetación que pasa a formar parte del suelo es celulósica, sin embargo en la actualidad se genera una gran cantidad de residuos agroindustriales con altos contenidos de celulosa, los cuales son difíciles de degradar y a su vez alteran el equilibrio del suelo lo que conlleva a la utilización de productos químicos. Debido a la disponibilidad y la capacidad que tienen los actinomicetos de generar enzimas capaces de hidrolizar enlaces glucósidos, se busca aislar actinomicetos del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (JBUTP) y estudiar cuantitativamente la capacidad que tienen estos microorganismos de degradar celulosa presente en la materia orgánica, los cuales no han sido muy estudiados en cuanto a su actividad celulolítica en tesis anteriores. Este proyecto puede servir como base para que en estudios posteriores los actinomicetos puedan ser presentados como un recurso clave a nivel de biotecnología agroindustrial.

Objetivos

General.

Determinar la actividad celulítica de algunos Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Específicos.

- Aislar y caracterizar actinomicetos del bosque de guadua del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Realizar la identificación taxonómica hasta género de las colonias de actinomicetos a utilizar, por medio de la técnica de espectroscopia infrarroja.
- Cuantificar por medio de la técnica DNS, la actividad celulolítica de los actinomicetos aislados.

Justificación

El mal uso agrícola de los suelos, que desafortunadamente ocurre en diferentes zonas cultivables, ha ido intensificando los problemas de fertilidad en los mismos. Lo cual conlleva a la utilización de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos. Los manejos agrícolas más sostenibles preconizan la disminución de agroquímicos, como alternativa al uso de estos compuestos, estrategias que cada día cobran más interés. En relación con los manejos sostenibles en agricultura, la posibilidad de usar técnicas basadas en el manejo de microorganismos que usualmente viven asociados a los vegetales, ocurre en virtud de las acciones positivas que se sabe realizan [1]. Con base en lo anterior, se pretende estudiar el uso de microorganismos como los actinomicetos, los cuales han sido estudiados a lo largo del tiempo por el papel importante que desempeñan en diferentes disciplinas del saber y su fácil disponibilidad, ya que se encuentran distribuidos en ecosistemas naturales especialmente en suelos. Estos microorganismos son importantes por su participación en la degradación de materia orgánica, promoción de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno en plantas, control biológico de fitopatógenos y procesos de biorremediación natural del suelo. Como se mencionó anteriormente, se busca una alternativa que disminuya el impacto ambiental y que a su vez proporcione beneficios agrotecnológicos a los cultivos; por esta razón, este proyecto busca estudiar actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira como una alternativa biotecnológica por su capacidad de degradar y convertir biopolímeros de origen vegetal como la celulosa y transformarlos en una fuente de energía para las plantas, pudiendo así mejorar algunas características como el incremento al desarrollo radicular de la planta, ya que mejora la asimilación de nutrientes, además aumenta la calidad del suelo aportándole nutrientes. Esto debido a la producción de azúcares fermentables que a su vez pueden ser usados como sustrato glucosídico natural. Sin embargo es importante resaltar que la generación de este sustrato puede tener otras utilidades como en la producción de etanol, combustibles, obtención de ácidos orgánicos, edulcorantes, productos farmacéuticos, alimentos, entre otros [4].

Referente Teórico

Los actinomicetos son bacterias aeróbicas, Gram positivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simple, complejo y compuestos moleculares orgánicos como: ácidos, azúcares, polisacáridos,

lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuente de nitrógeno: amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la mayoría de suelos secos y cálidos donde alcanzan grandes cantidades poblacionales, Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Adicionalmente, presentan una actividad metabólica alta, produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo producen compuestos bioactivos, con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo los principales productores de antibióticos, Particularmente, se han descrito actividades que pueden catalogar a los Actinomicetos como Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Entre estas actividades cabe destacar la solubilización de fósforo, fijación de Nitrógeno Atmosférico, producción de sideróforos e interacción con otros microorganismos. En los últimos años se ha incrementado el interés por las aplicaciones de los Actinomicetos a nivel biorremediación en Colombia, pudiéndose observar diferentes trabajos al respecto, como el que presenta en el 2009, Franco-Correa, et al, del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Universidad Javeriana, en el cual, se aislaron 10 cepas de Actinomicetos de 60 muestras de suelo rizosférico proveniente de diferentes zonas de la región de Boyacá, con el fin de obtener polihidroxialcanoatos (PHA). Los PHA son biopolímeros de ácidos grasos que son biosintetizados por las enzimas de estos microorganismos, siendo estudiados para su empleo como poliésteres biodegradables, Por su parte, Vargas, et al, 2009, ha hecho énfasis en el importante rol que 34 desempeñan los actinomicetos en la biodiversidad de los ecosistemas sostenibles y cómo indican el nivel de salud del suelo. También, Cruz, et al, 2009, destaca que en Colombia se conoce poco acerca de la biodiversidad microbiana y su función en la naturaleza. Por ello, se enfocaron especialmente en el papel de los actinomicetos sobre la degradación de celulosa y xilano en procesos de compost con residuos orgánicos agrícolas [7].

Metodología

Aislamiento de los Actinomicetos del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Pruebas bioquímicas

Prueba Oxidasa, Prueba catalasa, Hidrolisis de la gelatina, Prueba urea, Prueba citrato.

Fermentación de carbohidratos, Prueba de motilidad.

Conservación en discos de papel filtro Semistock.

Identificación de actinomicetos en Infrarrojo (IR).

Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática celulítica y azúcares reductores.

Resultados Esperados

Se esperará aislar los microorganismos del suelo, conservarlos, realizarles pruebas bioquímicas para acercarse al tipo de actinomiceto aislado, identificarlo en IR con fines taxonómicos para realizar su identificación hasta género y cuantificar su actividad celulítica por medio de la técnica DNS.

Resultados Obtenidos

Pruebas Bioquímicas

Tabla 1. Resultados pruebas bioquímicas

| Colonia \ Prueba | D | F | G | L | M | Q | T | U |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Citrato | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Motilidad | - | + | - | + | + | - | - | - |
| Oxidasa | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Urea | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Gelatina | + | + | + | - | - | - | + | - |
| F.C Glucosa | - | - | - | + | + | + | + | + |
| F.C Lactosa | - | + | - | + | + | + | + | + |
| F.C Sacarosa | - | - | - | - | - | - | - | - |

Espectroscopia Infrarroja

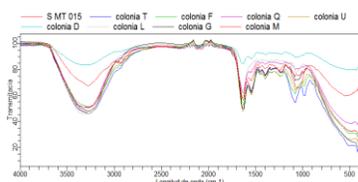


Figura 1. Espectros de las colonias de actinomicetos y de la cepa de referencia SMT-015.

Resultados del análisis multivariado (Dendograma)

Codificación:

CD: Colonia D
 CF: Colonia F
 CG: Colonia G
 CL: Colonia L
 CM: Colonia M
 CQ: Colonia Q
 CT: Colonia T
 CU: Colonia U
 HAN: Hongo *Aspergillus Nigger*
 S.T: *S. Thermophilus*
 SMT: *Sreptomycetes sp.* Cepa Cenicafé

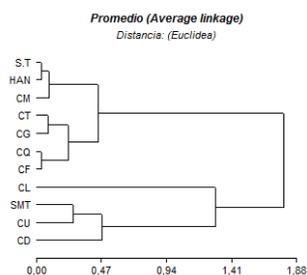


Figura 2. Dendograma de conglomerados de las bandas espectrales entre 3700-2800 cm^{-1} por medio del Software Estadístico Infostat

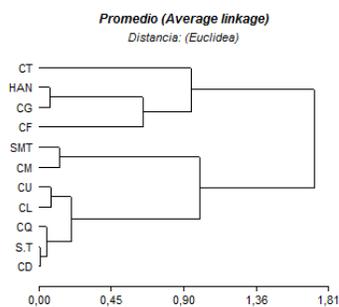


Figura 3. Dendrograma de conglomerados de las bandas espectrales entre 2350-1800 cm^{-1} por medio del Software Estadístico Infostat

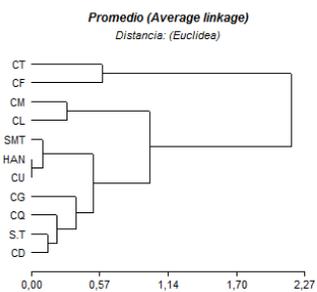


Figura 4. Dendrograma de conglomerados de las bandas espectrales entre 1789-950 cm^{-1} por medio del Software Estadístico Infostat

Cuantificación de la actividad Celulítica

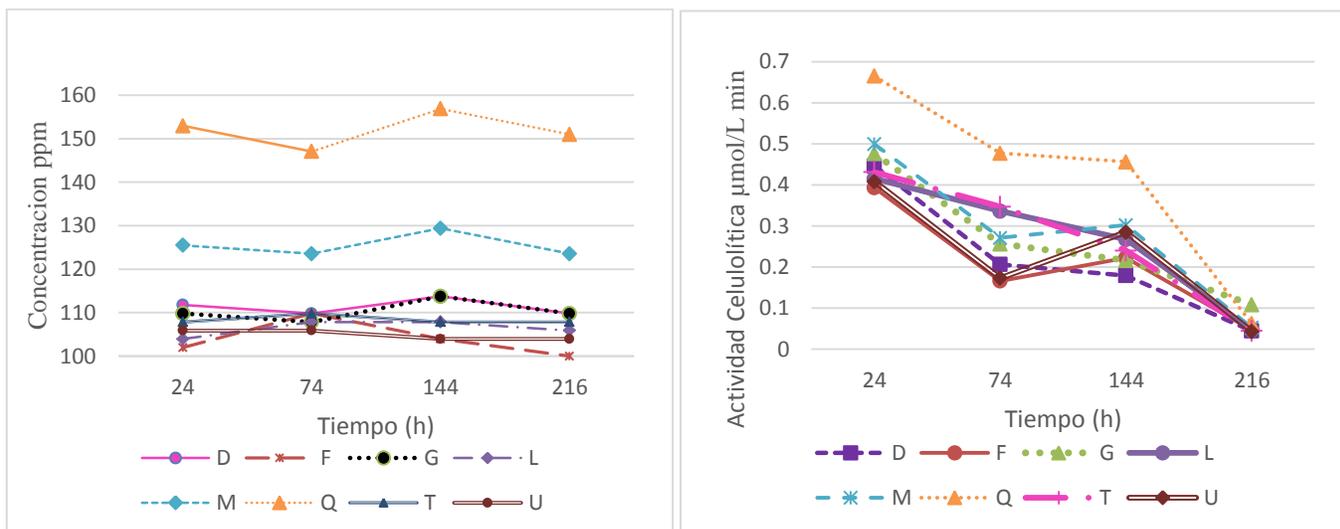


Figura 5. Concentración ppm de Azúcares Reductores y actividad celulítica

Discusión

Pruebas Bioquímicas

Para realizar la confirmación del género reportado en el punto anterior, se debía llevar a cabo una serie de pruebas bioquímicas de las cepas de actinomicetos ya que cuando se tiene indicios de la posible identidad de una determinada bacteria, realizar una caracterización bioquímica que ponga en manifiesto vías metabólicas o actividades enzimáticas propias de ella es de gran ayuda,[8]. La comparación de similitudes con características bioquímicas de microorganismos conocidos y referenciados logra establecer una identidad más confiable.

Las características bioquímicas determinantes para realizar la identificación en género de los Actinomicetos según Aura y Corina [7], se evaluaron con la aplicación de pruebas como la Catalasa y la Oxidasa, Hidrólisis de la Urea y Gelatina, motilidad, Prueba de Citratos y fermentación de carbohidratos, sin embargo para la confirmación de posible género estas pruebas no son suficientes para esta determinación. En la tabla 4.se describe la forma en que se evidencia un resultado positivo y negativo en cada prueba bioquímica aplicada.

Análisis Espectros Infrarrojo

Se analizan las bandas representativas de grupos funcionales como CH-OH, C=O y una banda característica de polisacáridos ya que en el espectro Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de una célula es el resultado de la absorción de todos los modos vibracionales de los enlaces químicos de las moléculas que la constituyen, principalmente macromoléculas como nucleótidos, DNA, RNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (metabolitos primarios) [9].

>1500 cm^{-1} en esta región de encuentran las bandas de absorción asignables a grupos funcionales aislados como -OH, C=O, etc.

Entre 3700-3000 cm^{-1} se encuentra una banda de intensidad alta con una vibración de tensión -OH que es una de las más dominantes y características entre las absorciones de los grupos funcionales.

Entre 2000-2100 cm^{-1} se encuentra una banda que es característica de equipo Agilent Resolution Pro.

En 1000 cm^{-1} banda de intensidad media. Vibración de tensión CH-OH.

Entre 1700-1600 cm^{-1} se encuentra una banda de intensidad media la cual es una vibración de tensión C=O.

Entre 1200-1000 cm^{-1} hay una banda con intensidad medio característica de la presencia de polisacáridos.

Dendogramas

Los dendogramas recolectados de las colonias de actinomicetos muestran la división de familia, género y su similitud. Para este análisis y debido a que el rango espectral fue demasiado amplio este se dividió en base a la intensidad de las bandas y grupos funcionales principales, donde se obtuvieron 3 dendogramas con el fin de poder ser comparados con lo obtenido a través de los análisis morfológicos.

Como se observa en las figuras 2,3 y 4 no fue posible clasificar los actinomicetos ya que para cada rango se presentan diferencias en cuanto la similitud, familia y género, entre los actinomicetos y las cepas de referencia, fenómeno que no debería presentarse, si se compara con estudios donde hacen uso de este método, esto posiblemente se debe a que teóricamente se sabe que los actinomicetos son microorganismos del suelo caracterizados por ser organismos intermedios entre los hongos y las bacterias, es posible que evaluado los metabolitos secundarios se logre obtener un mejor acercamiento de los actinomicetos aislados aunque bibliográficamente no se tienen resultados que permitan comparar lo que se llegara a obtener para este tipo de microorganismo.

Actividad Enzimática

En la figura 5 se observa el comportamiento de los aislamientos bacterianos, estos presentan una tendencia similar, en donde la mayor actividad enzimática fue generada por las colonias Q y M siendo estas de 0,665 y 0,499 UC (unidades Celulolíticas) respectivamente. Como se observa en la figura 5 se puede concluir que en el momento en el que se agotan los azúcares reductores en el medio, 24 horas, se evidencia mayor actividad enzimática.

Los resultados de la actividad enzimática fueron óptimos aunque se puede llegar a obtener un sustrato de acuerdo al hábitat de crecimiento de los actinos que permita generar mejores resultados respecto a el caldo de celulosa además puede ser incubado a una temperatura más alta ya que esta cataliza la actividad enzimática.

Conclusiones

Los posibles géneros encontrados en el suelo del JBUTP bosque de guadua fueron: *Streptomyces sp* y *Actinopolyspora*; estos géneros son importantes para la medicina y la agricultura, permitiendo así seguir con trabajos de investigaciones que busquen mejorar procesos agrícolas en la región.

Por otra parte el género *Streptomyces sp* ha sido reportado como microorganismo con alto potencial para degradar la celulosa en monómeros de glucosa y según los resultados obtenidos es precisamente este género correspondientes a las colonias M y Q quienes obtuvieron un mayor pico de actividad enzimática (0,499 y 0,665 UC respectivamente) es decir quienes degradaron más celulosa respecto a las demás.

La técnica de espectroscopia infrarroja es una técnica sencilla, rápida y sensible la cual permite caracterizar por familia y especie microorganismos en cuestión, de acuerdo a los resultados no fue posible lograr caracterizar los actinomicetos aislados, esto es posible debido a que estos microorganismos son complejos respecto a su composición por tanto no se asegura el posible género.

Impacto (Social, Económico y Ambiental)

El uso de los Actinomicetos puede ser implementado en la agricultura como biofertilizantes los cuales en los sistemas productivos son una alternativa viable y sumamente importante

para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo y a su vez reduce el impacto ambiental.

Bibliografía

- [1].Correa, F. (2010). *Utilización de los Actinomicetos en Procesos de Biofertilización*. (P. U. Javeriana, Ed.) *Rev. peru.biol*, 239-242.
- [2].Peña, P. K., & Pulgarín, C. L. (2013). Evaluación “in - vitro” del potencial biológico de los actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de pereira frente al control del fitopatógeno en banano *Ralstonia solanacearum*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira .
- [3].López, M. A. (2015, Abril 2). *Organismos que intervienen en el compostaje*. Retrieved from Compostadores : http://www.compostadores.com/repositorio/Organismos_intervienen_compostajenl.pdf
- [4].Gaitan, B. D., & Perez, P. L. (2007). *Aislamiento y Evaluación de Microorganismos Celulíticos a Partir de Residuos Vegetales Frescos y en Compost Generados en un Cultivo de Crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 2 de Abril de 2015, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf>
- [5].Portela, g. g. (s.f.). *Efecto de la fertilizacion química y la aplicación de humus sólido de lombriz roja californiana sobre el desarrollo y produccion de arroz en el suelo de ambalema- tolima*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia zona sur.<http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2560/1/1106482881.pdf>
- [6].Ortiz, M. M., & Uribe, V. D. (2010). *Determinación de la actividad lignocelulolítica*. 12.
- [7].Salazar, L. A., & Ordoñez Guerrero, C. A. (2013). *Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- [8].McFaddin. (2000). *Biochemical Test dor Identification of Medical Bacteria*. Estado Unidos: 3th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Inc.

[9]. Kikot, Gisele. (2012). Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana