



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS CELULOLITICAS DE MUESTRAS
AMBIENTALES PARA SU POSIBLE APLICACIÓN
BIOTECNOLOGICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

KARLA IBETH OROZCO CHÁVEZ



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MARIA GUADALUPE TSUZUKI REYES

VOCAL: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

SECRETARIO: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

1^{ER} SUPLENTE: AGUSTIN REYO HERRERA

2^{DO} SUPLENTE: RUTH EDITH MARTIN FUENTES

Sitio donde se desarrollo el tema:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Asesor:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz

Supervisor Técnico:

Dr. Fernando Montiel Aguirre

Sustentante:

Karla Ibeth Orozco Chávez

DEDICATORIA

A Dios por todas las oportunidades y enseñanzas que me dio a lo largo de este camino y por permitirme lograr uno de mis más grandes sueños.

A mi mamá por compartir momentos difíciles en mi vida y seguirme apoyando, espero que hoy y siempre estés orgullosa de mí.

A mis hermanos que son los tres pilares de mi vida y por que muy a su manera me enseñaron lo importante y satisfactorio que es obtener tus propios logros, gracias por su apoyo y su cariño.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, principalmente a mi madre por todo el esfuerzo que hizo y el apoyo que me dio para lograr que yo fuera una persona de bien.

A cada uno de mis amigos quienes fueron parte de este sueño, principalmente a Sandra quien estuvo hasta el final de este camino, apoyándome en cada momento, sobre todo en los malos, arrancarme una sonrisa en los momentos mas difíciles y por compartir una amistad.

A todas las personas que me ayudaron en la elaboración de esta tesis, en especial a M. en C. Raquel, Dr. Fernando, Dr. Guillermo, Sandra Ch. y Javier R.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación, cada una de sus enseñanzas demostraron el amor que le tienen a su profesión y a la Universidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado como persona y profesionista.

Este proyecto, fue el comienzo de una nueva investigación y me siento orgullosa de haber participado en él. En esta tesis esta plasmada la pasión por la investigación y hay toda una historia detrás de ella, y esperó que sea de ayuda para toda gente que como yo, luchamos siempre por hacer las cosas lo mejor posible.

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. GENERALIDADES	
2.1 Importancia de la biotecnología en el medio ambiente	5
2.1.1 Importancia de los microorganismos en la degradación de la materia orgánica	7
2.1.2 Importancia ecológica de los microorganismo del suelo	7
2.2 Microorganismos celulolíticos	10
2.2.1 Bacterias deslizantes	12
2.3 Polisacáridos de la pared celular de las plantas	21
2.3.1 Celulosa	22
2.3.2 Hemicelulosa	24
2.3.3 Pectina	24
2.4 Bio-degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas	26
2.4.1 Enzimas que degradan los polisacáridos	26
2.5 Importancia de la producción de enzimas	30
3 OBJETIVOS	36
4 MATERIAL Y METODOLOGÍA	
4.1 Obtención de muestras ambientales	40
4.2 Aislamiento de Mixobacterias y Citofagas	40
4.3 Identificación de los microorganismos	
a) Morfología colonial	41
b) Características microscópicas	42
c) Pruebas bioquímicas	42

4.4	Determinación de las condiciones de crecimiento y cultivo <i>in vitro</i>	42
4.5	Determinación cualitativa de la actividad celulolítica	
a)	Método de Imshenetski	43
b)	Determinación de azúcares reductores con ácido dinitrosalísico (DNS)	44
c)	Método en placa con el colorante rojo congo	44
4.6	Determinación de las condiciones de crecimiento para la producción de enzimas	45
4.7	Evaluación de la actividad celulolítica	
a)	Viscosimetría	46
b)	Colorimetría	47
4.8	Cuantificación de proteína	47
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1	Muestras ambientales	50
5.2	Aislamiento de Mixobacterias y Citofagas	52
5.3	Porcentaje de cepas aisladas y purificadas por tipo de suelo	55
5.4	Características microscópicas y macroscópicas	57
5.5	Identificación de las cepas aisladas	60
5.6	Determinación de las condiciones de crecimiento y cultivo <i>in Vitro</i>	63
5.7	Determinación cualitativa de la actividad celulolítica	72
5.8	Determinación de las condiciones de crecimiento para la producción de enzimas	75
5.9	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática	82
5.10	Relación de la actividad enzimática y la cantidad de proteína	86
5.11	Discusión genera	89

CONTENIDO

6	CONCLUSIONES	93
7	SUGERENCIAS	96
8	REFERENCIAS	97
9	ANEXO	102

1. R E S U M E N

El interés por el uso de microorganismos o por sus enzimas para la degradación de celulosa en carbohidratos ha ido en aumento debido al incremento en la cantidad de desechos agrícolas e industriales ricos en celulosa. Por esta razón, se ha desarrollado un gran interés en utilizar estos desechos como materia prima para procesos biotecnológicos. Desgraciadamente, la asociación de la celulosa con moléculas como la lignina, ocasiona que aún no existan procesos industriales eficientes.

Se han reportado más de tres mil enzimas aisladas de microorganismos; sin embargo menos del 1% son utilizadas industrialmente, cinco compañías controlan el 80% del mercado de catalizadores biológicos, obtenidos principalmente por hongos, sin embargo, se han encontrado diferentes especies bacterianas cuyas enzimas poseen características similares a la de éstos.

El presente trabajo tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias (Mixobacterias y Citofagas) con actividad celulolítica a partir de muestras ambientales y su eventual aplicación biotecnológica. Se ha reportado en la literatura que poseen actividad celulolítica pero de las que no se han realizado estudios más profundos. Las bacterias aisladas provienen de muestras ambientales, principalmente de diferentes suelos ricos en desechos orgánicos, de la Ciudad de México. Se aislaron 15 cepas las cuales fueron clasificados por criterios morfológicos: forma, tamaño, color y la formación de cuerpos fructíferos. De los cuerpos fructíferos se tomó una muestra para obtener colonias puras. De ellas fueron seleccionadas 5 cepas considerando como prueba presuntiva de la actividad enzimática las que presentaron una

mayor degradación del papel filtro, durante su incubación en la cámara de humedad. Se evaluó el crecimiento de las cepas a diferentes pH's (6,6.5, 7 y 7.5) y temperaturas (22, 27 y 32°C) en medio CY, con el fin de determinar las mejores condiciones de crecimiento *in vitro*. Para evaluar de manera cualitativa la actividad enzimática las cepas seleccionadas se sembraron en cajas con carboximetil celulosa (CMC), bajo las condiciones determinadas previamente en las curvas de crecimiento (32°C y pH 7), durante 48 horas y donde presentaron halos de degradación. Posteriormente se incubaron en condiciones óptimas de crecimiento antes definidas en matraces con papel filtro y carboximetil celulosa (CMC) como única fuente de carbono con medio mineral durante 7 días y se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes por la degradación de la celulosa (papel filtro y CMC). Se observó un mayor crecimiento en la presencia de carboximetil celulosa que en papel filtro, encontrando azúcares reductores únicamente en el medio con CMC. Esta parte del experimento se repitió utilizando extracto de levadura con la finalidad de incrementar el crecimiento y con ello la producción de enzima. También se evaluó los cambios de viscosidad en carboximetil celulosa, en donde se observó una disminución del más del 50% en menos de 72 horas de incubación. Se realizaron pruebas cuantitativas en donde se observó que las cepas aisladas presentaron su mayor actividad celulolítica a las 72 horas de incubación a una temperatura de 37°C. De las cepas seleccionadas, 3 corresponden al orden I *Myxobacterales*, de las cuales 2 corresponden al género *Sorangium* y una el género *Polyangium*, las otras dos corresponden al orden II *Cytophagales* de las bacterias deslizantes pertenecientes al género *Cytophaga*.

2. G E N E R A L I D A D E S

2. 1 Importancia de la biotecnología en el medio ambiente.

El crecimiento de la población y el avance de las actividades industriales a partir del siglo XIX originaron serios problemas de contaminación ambiental. Desde entonces, los países generan más desperdicios, muchos de ellos no biodegradables o que se degradan muy lentamente en la naturaleza, lo que ocasiona su acumulación en el ambiente sin tener un destino seguro o un tratamiento adecuado. De este modo, en lugares donde no existe control sobre la emisión y el tratamiento de los desechos, es factible encontrar una amplia gama de contaminantes (Mejía, C. 2000).

Habitualmente, los casos de contaminación que reciben mayor atención en la prensa son los derrames de petróleo. Pero, en el mundo, constantemente están sucediendo acontecimientos de impacto negativo sobre el medio ambiente, generados por una gran diversidad de agentes contaminantes que son liberados al ambiente. Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben de ser tratados. En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos para luego terminar de degradarlos con el uso de microorganismos (Ovando, SL. 2005).

La pared celular de las plantas sirve de sustrato para las enzimas de bacterias y hongos. Estas enzimas (pectinasas, xilanasas y celulasas) juegan un papel importante en la naturaleza manteniendo el ciclo del carbono, y tienen aplicaciones a nivel industrial (clarificación de jugos, panificación, blanqueo de pulpas para papel, etc.) (Álvarez, A. 2005).

Desde que se logró la fabricación de preparados a base de enzimas libres de células, hace aproximadamente cien años, numerosos centros de investigación e industrias se han interesado en estudiar diferentes microorganismos capaces de excretar enzimas, ya que el uso de éstas ofrece ventajas no sólo económico sino también de simplificación de procesos (Ovando, SL. 2005).

En la industria biotecnológica es importante obtener microorganismos que tengan la capacidad de sintetizar enzimas y secretarlas al medio de cultivo, para poder reutilizar desechos agro-industriales (remolacha, extracto de frutas, etc). Todo esto forma parte de lo que se conoce ahora como biorremediación, la cual surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas).

Hasta ahora, los microorganismos más utilizados en la industria biotecnológica son los hongos, debido a su capacidad de sintetizar y secretar enzimas. Sin embargo, el proceso para obtener las es muy largo.

En el medio ambiente también existe un gran número de microorganismos que producen enzimas y que ayudan a la degradación de desechos orgánicos presentes en el medio ambiente y de los cuales aun no se ha estudiado su posible aplicación en la industria biotecnológica.

2.1.1 Importancia de los microorganismos en la degradación de la materia orgánica.

Contribuyen a la fertilidad del suelo, degradando la materia orgánica de restos de animales y plantas muertos, así como con la participación de algunas bacterias en la fijación del nitrógeno atmosférico (Mejía, C. 2000).

Los diferentes grupos de microorganismos participan en gran medida en el tratamiento biológico de residuos líquidos y sólidos. Estos tratamientos pueden ser de tipo aerobio, anaerobio ó mixto.

La celulosa nativa es hidrolizada por un grupo de enzimas (endo-glucosidasa, exo-glucanasa y β -glucosidasa) que son producidas por muchas especies de microorganismos (bacterias, mohos, levaduras y algas), y son utilizadas en biotecnología para la obtención de productos de interés para el humano (Crosgrave, J. 1999).

2. 1. 2 Importancia ecológica de los microorganismos del suelo

El suelo es uno de los ambientes en donde un enorme conjunto de microorganismos compiten entre sí para obtener lo que todos ellos necesitan: nutrimentos y energía. Los microorganismos del suelo juegan un papel muy importante manteniendo la fertilidad de los suelos, en donde reciclan elementos esenciales para el crecimiento, de los seres vivos tales como oxígeno, nitrógeno, carbón, azufre y fósforo (Carrillo, L. 2003).

En un suelo agrícola están presentes aproximadamente 10^{10} organismos por gramo de suelo y constituyen una biomasa de aproximadamente 1500 kg por Ha. Un gramo de suelo fértil puede contener 10^8 células bacterianas, 10^6 esporas de actinomicetos, etc. (Carrillo, L. 2003 y Mejía, C. 2000).

Los hongos del suelo son extremadamente importantes en la descomposición del material de plantas, degradando y utilizando macromoléculas complejas tales como celulosa y lignina.

Los géneros de hongos varían con el tipo de suelo. Algunos son de vida libre y otros como las micorrizas, viven en forma simbiótica con las raíces de plantas. Son comunes las especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor* y algunos de ellos producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar a la celulosa (Vladimir. P. 1999).

A partir de varios hongos aeróbicos, especialmente de la especie *Aspergillus*, se han obtenido los complejos celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios, debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente a la celulosa en celobiosa o en glucosa (De Vries, 1999).

Las algas son una fuente de nutrimentos para un número considerable de habitantes del suelo, incluyendo protozoarios, hongos, lombrices de tierra y nemátodos.

Debido a que las algas dependen de la luz solar y de la fotosíntesis para obtener sus necesidades energéticas, viven cerca de la superficie del suelo y su población disminuye en períodos de oscuridad o de baja temperatura. En suelos áridos, son comunes los líquenes (una simbiosis de alga-hongo) (Carrillo, L. 2003).

Los líquenes son encontrados en la mayoría de los suelos en una densidad de 10^4 a 10^5 organismos por gramo de suelo. Generalmente se encuentran cerca de la superficie debido a que requieren oxígeno. Los protozoarios son predadores de algas y bacterias del suelo (Carrillo, L. 2003).

En general, el grupo más numeroso de bacterias en el suelo son los actinomicetos que resisten condiciones de baja humedad y pueden sobrevivir en suelos desérticos (Olvera T., 1989). Los géneros más comunes son: *Nocardia*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*. Las especies del género *Streptomyces*, además de antibióticos, producen metabolitos llamados geosminas las cuales dan al suelo su olor característico (Hart, T. 2002).

Otro grupo común de bacterias heterotróficas del suelo son las bacterias deslizantes como mixobacterias y citofagas; las primeras son pigmentadas y forman masas brillantemente coloreadas. Bajo condiciones de inanición se acumulan para formar complejos cuerpos fructificantes macroscópicos, los cuales contienen esporas que pueden sobrevivir en condiciones pobres de nutrientes (Reichenbach, H. 2001).

2. 2 Microorganismos Celulolíticos

Las bacterias y los hongos son los dos principales grupos microbianos que degradan a la celulosa, aún cuando existen algunas especies de algas como *Tolypothrix byssoidea*, que también pueden hacerlo (Zhang P. 2006).

De las bacterias que se consideran como celulolíticas se pueden mencionar: *Cellulomonas sp*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyvirio fibrisolvens*, algunas especies de los géneros *Clostridium* (tal es el caso de *C. thermocellum* y *C. thermohydrosulfuricum*), y *Pseudomonas* (como *P. fluorescens var cellulosa*), que también se han reportado como bacterias celulolíticas (Hart T. D., 2002).

Con frecuencia el sistema celulolítico es diferente en cada microorganismo; por ejemplo, algunos no crecen en celulosa nativa, pero producen enzimas celulolíticas. Esto se debe a que en ellos están ausentes algunas enzimas esenciales para la hidrólisis de la celulosa nativa, pero pueden utilizar celulosa parcialmente degradada. Esta característica es importante para la producción de enzimas celulolíticas específicas (Fuller W. H., 1943).

Existen otros microorganismos que crecen en celulosa pero que sólo ocasionalmente producen pequeñas cantidades de enzimas celulolíticas, debido a que en el medio se encuentra presente alguna otra fuente de carbono (Ghose T. K., 1987).

Esta última condición ha dado lugar a la clasificación de los microorganismos celulolíticos en tres grupos principales (Reese, 1969).

- 1.- Productores de celulasas en ausencia de celulosa
- 2.- Productores de celulasas en presencia de sustratos celulósicos.
- 3.- Productores de pequeña o ninguna cantidad de celulasas en presencia de algún sustrato celulósico.

Se ha observado actividad celulósica en filtrados de cultivos de microorganismos, pero también en células libres; estos resultados han motivado la clasificación del sistema enzimático, de acuerdo con su localización, en dos grupos.

- 1.- Enzimas unidas a las células; las que, a su vez se dividen en dos grupos más: uno se refiere a aquellas enzimas unidas a la superficie de la célula y el segundo dentro de la célula.
- 2.- Enzimas extracelulares: Estas enzimas son secretadas por el microorganismo al medio de cultivo.

Es claro que las enzimas que actúan sobre macromoléculas insolubles como la celulosa, deben estar localizadas fuera de la célula. En cambio, aquellas enzimas que degradan moléculas solubles de bajo peso molecular como la celobiosa, probablemente estén localizadas dentro de la célula (Olvera, 1990).

2. 2. 1 Bacterias deslizantes

Existen dos grupos de bacterias deslizantes. El primero de ellos corresponde al orden de los *Mixobacterales* que se han vuelto uno de los objetos más fascinantes de investigación en la Microbiología, debido a su capacidad de formar cuerpos fructíferos y excretar enzimas capaces de degradar diferentes macromoléculas orgánicas (Bangl A., 2004). El segundo grupo corresponde al orden de las *Cytophagales* que se diferencian de las primeras por no formar cuerpos fructíferos y por su composición de bases en el DNA; sin embargo, presentan las mismas condiciones de desarrollo que las mixobacterias (Pray, L. 2003; Schurmann, C. 1967).

a) Orden I *Mixobacterales*

Las mixobacterias son organismos del suelo y usualmente se les detecta en la naturaleza al observar los cuerpos fructíferos sobre corteza de árboles, material vegetal en descomposición y en particular, estiércol de animales y superficies de hojas, los cuales son generados por la escasez de nutrimentos y pueden ser detectados a menudo con ayuda de un microscopio simple (Prat L. 2003 y Reichenbach, H. 2001).

Las mixobacterias son microorganismos sociales cuyas células son flexibles y no tienen una pared rígida, generalmente están embebidas en un limo espeso. Al desplazarse segregan un material mucoso extracelular que se convierte en grandes huellas de deslizamiento por donde avanzan miles de células (F. Gaspari, 2005). El movimiento es muy coordinado, cuando la población emigra sobre el agar, se desplaza como una unidad indivisa. Incluso las especies que

entran en letargo como esporas unicelulares, exhiben hábitos sociales durante buena parte de su ciclo vital (Carrillo L. 2003 y Wolfgang D. 2000).

Las mixobacterias son microorganismos quimiorganótrofos, estrictamente aerobios; la producción de energía es un proceso respiratorio, nunca fermentativo. Típicamente producen enzimas extracelulares que hidrolizan macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos y varios polisacáridos, incluyendo celulosa (Bull, C. 2002). Carecen de pigmentos fotosintéticos, pero han sido detectados algunos pigmentos carotenoides. En consecuencia, las colonias de mixobacterias son generalmente de colores brillantes (Lawrence J. 1990).

Las mixobacterias se desarrollan principalmente en suelos, donde el pH es ligeramente ácido o/y alcalino, es decir entre 5 a 8; son consideradas generalmente como bacterias mesófilas, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C (Bangi A., 2004). Sin embargo, pueden desarrollarse a temperaturas entre 9°C y 38°C, su tiempo de generación es de 4 a 12 h. Toda mixobacteria es caracterizada por su capacidad de degradar macromoléculas biológicas (Bull C. 2002 y Schurmann C. 1967).

El conjunto de la población de mixobacterias produce ondas pulsátiles rítmicas.

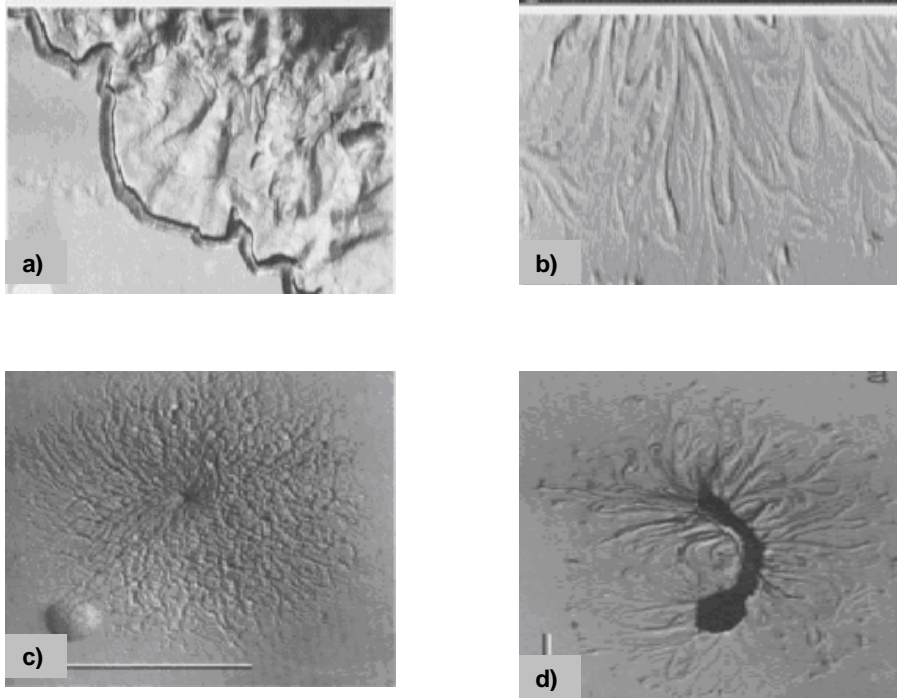


Figura 1. Enjambre o deslizamiento típico en colonias de mixobacterias sobre agar VY/2. a) y d) *Polyangium* sp. b) *S. cellulosum* c) *N. exedens* (Reichenbach and Dworkin).

En la figura 1 se observan los enjambres (swarm) de mixobacterias que se acercan al centro o se alejan hacia el borde de la colonia en crecimiento, formando agregados en puntos específicos para construir los cistos o, en algunos géneros como *Chondromyces*, complejos cuerpos fructíferos pluricelulares y la conversión de las células alargadas en mixosporos redondos, resistentes y metabólicamente en reposo (Bull, C. 2002 y Wolfgang D. 2000).

La fructificación de estas bacterias está generalmente favorecida en medios que son pobres en nutrientes, conocen los factores específicos que controlen el proceso. La clasificación de estas bacterias está en gran parte basada en la estructura de sus cuerpos fructíferos, la dificultad para obtener una

fructificación reproducible puede ser un serio obstáculo para sus identificación (Reichenbach H. 2001 y Wolfgang D. 2000).

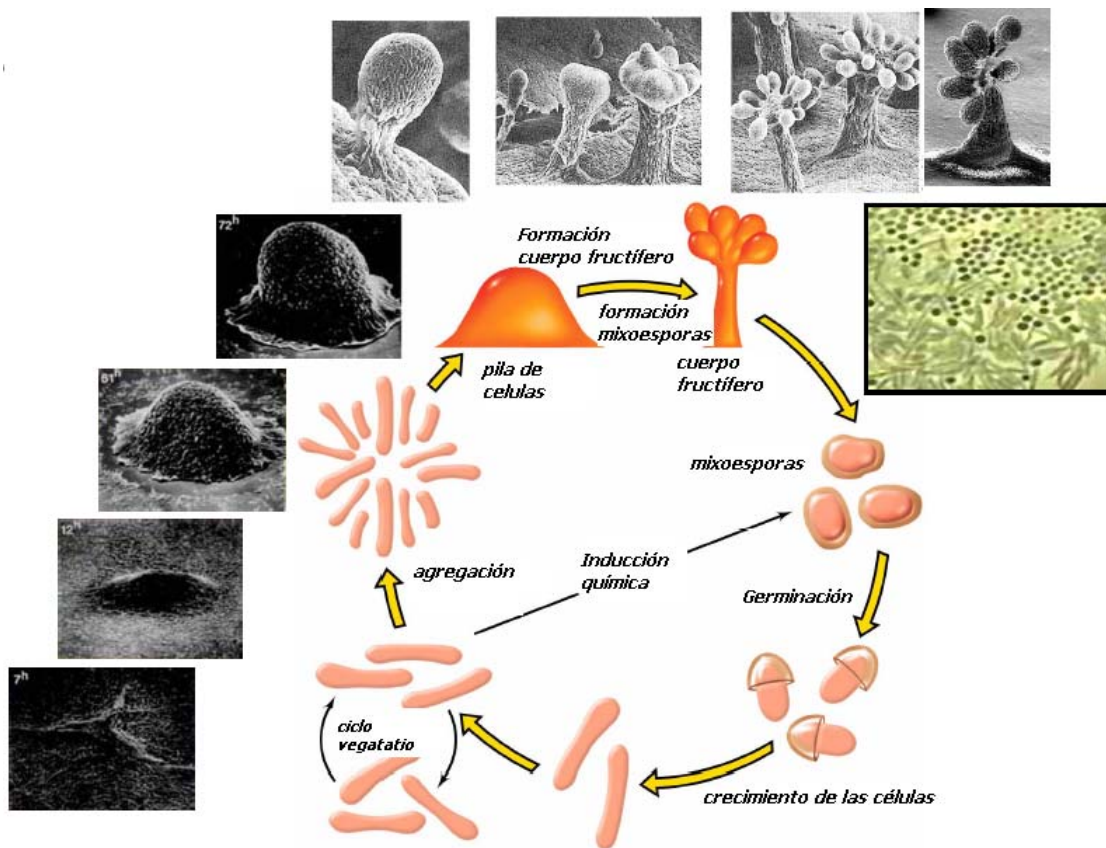


Figura 2. Morfogénesis celular de la mixobacteria *Stigmatella aurantiaca* (Wolfgang, D. 2000)

En la figura 2 se ilustra la formación del cuerpo fructífero inducida por la deficiencia de nutrientes y controlada por la concentración de los mismos en el medio, el pH, los cationes y la temperatura. Es una morfogénesis cooperativa de las células vegetativas (Reichenbach H., 1990). El proceso es una secuencia: (1) un número grande (10^5 - 10^7) de las células pierden su individualidad durante la morfogénesis. (2) el crecimiento vegetativo de los bacilos cesa. (3y4) las células comienzan a formar agregados. (5) la consecuencia es una aglutinación no estructurada de masas de las células que se autolisan en cerca de 65-90%. (6) la formación de los elementos

estructurales especiales (vástago, base, pared del esporangio) comienza. (7) la forma característica (específica) del cuerpo fructífero se hace evidente. (8) durante la fase de la maduración, las células vegetativas (bacilos) son transformadas en mixosporas, las cuales dan origen a células bacilares vegetativas (Lawrence J. 1990).

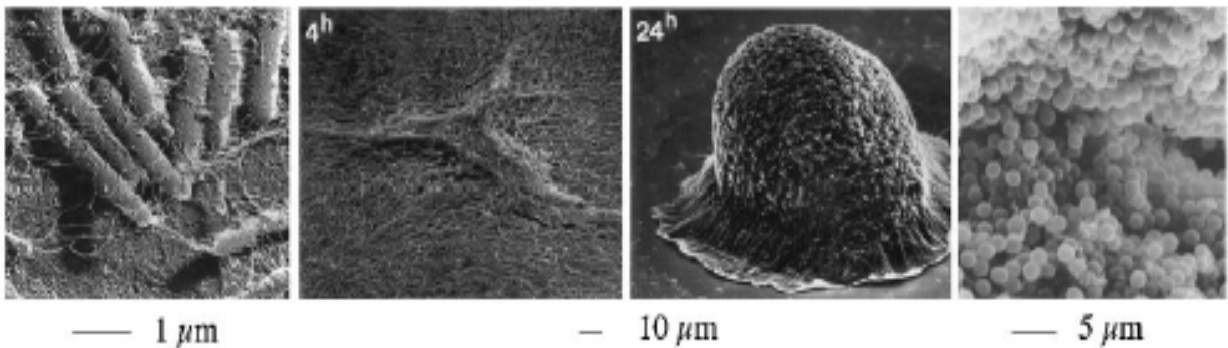


Figura 3. Microscopía electrónica del *Myxococcus xanthus* (Lawrence, 1999)

Las imágenes de microscopía electrónica en la figura 3 muestran el proceso en la formación del cuerpo fructífero por una cepa pura de *Stigmatella*. Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de fructificación comienza con la formación de centros de agregación. A las 4 horas se comienza a observar el agregado celular y el desplazamiento. Después de 24 horas el cuerpo fructífero está prácticamente formado en su totalidad, esto puede variar dependiendo de la especie. Dentro del cuerpo fructífero se encuentran las mixoesporas (Grilione, 1975).

Cada cuerpo fructífero está formado por mixoesporas; cuando está maduro adquiere un tamaño, forma y color definidos. Los pigmentos de estas bacterias son carotenoides asociados a las células, que le sirve de defensa contra la luz.

El proceso completo para la formación del cuerpo fructífero toma 12-24 h bajo condiciones óptimas (Wolfgang D. 2000).

Las mixobacterias comprenden 4 subgrupos nutricionales; agarolíticos, quitinolíticos, bacteriolíticos y celulolíticos. La mayoría de las especies que se han estudiado son bacteriolíticas. Unas cuantas especies, todas ellas del género *Polyangium*, tienen requerimientos nutrimentales diferentes, ya que son activas degradadoras de la celulosa y crecen en un medio con una base de sales minerales suplementada con celulosa o con sus productos de hidrólisis (los azúcares solubles celobiosa, glucosa y carboximetil celulosa) (Reichenbach, H. 2001 y Bull C. 2002).

Dentro del orden I Myxobacterales, se encuentra el suborden *Sorangineae*, dentro del cual se encuentran dos familias con actividad celulolítica; *Sorangiaceae* y *Polyangiaceae*. En particular el género *Polyangium*, especie *cellulosum*, tiene la capacidad de atacar a la madera, al igual que *Sorangium aurantiaca*. *Polyangium cellulosum* es un bacilo de 0.8-1.2 por 3.0-10.0 micras que forma esporangios de entre 20 y 30 micras de diámetro. El color varía de amarillo pálido a diferentes tonos de rosa, naranja, rojo y café con reflejos de gris a negro. El crecimiento sobre papel filtro en medio mineral es lento, apareciendo en un período de 3 a 14 días. El rango de temperatura de crecimiento es de 20 a 37°C, aunque el óptimo es de 28 a 32°C (Lawrence J. 1990 y Wolfgang D. 2000).

b) Orden II *Cytophagales*

Son bacterias Gram negativas, crecen como bacilos aislados *flexuosos* y no es posible distinguirlos de las mixobacterias por la estructura de la célula vegetativa, puesto que son similares en estructura y desarrollo. Estas bacterias presentan las mismas condiciones de desarrollo que las mixobacterias, es decir, crecen en diferentes tipos de suelos. Algunas de estas bacterias producen cadenas de células de 100µm o más de longitud, un carácter que no existe en las mixobacterias (Prat L. 2003 y Wolfgang D. 2000).

Su metabolismo puede ser oxidativo o fermentativo. Presentan pigmentación por la presencia de carotenoides, generalmente de color amarillo, naranja o rojo dependiendo del género. Su temperatura óptima de crecimiento es entre los 20-30°C. El contenido de G+C se encuentra entre 33-42%.

En la familia de las *Cytophagaceae*, se encuentra el género *Cytophaga*, que se distinguen por sus propiedades nutrimentales. Pueden hidrolizar y crecer a expensas de polisacáridos complejos, debido a la capacidad de degradar agar, celulosa y quitina. La mayoría de estas bacterias son aerobios estrictos. Unas cuantas especies de *Cytophaga* y *Flexibacter* son anaerobios facultativos y pueden fermentar carbohidratos (Prat L. 2003 y Stanier R.1940).

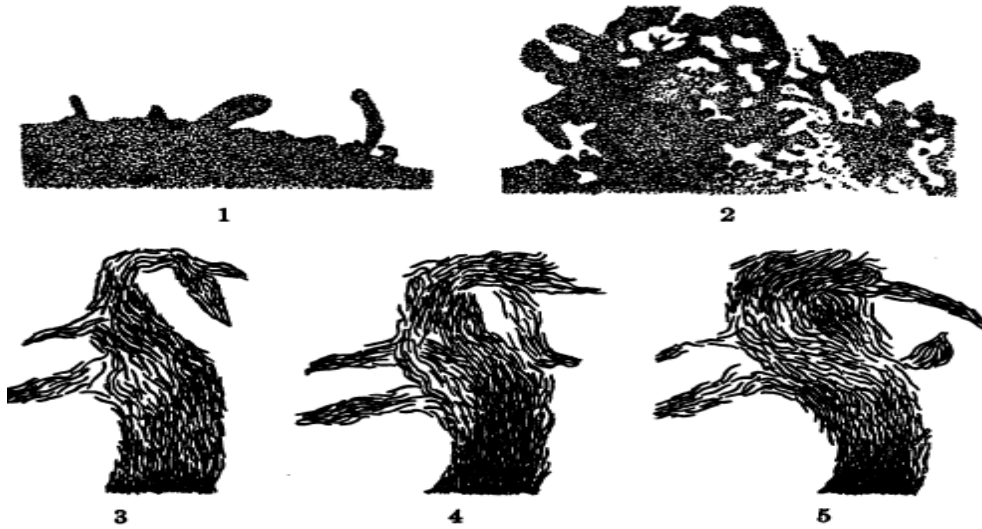


FIG.4. 1) *Cytophaga krzemieniewskii*. Desplazamiento de las células vegetativas, en la fase temprana del proceso. 2). *Cytophaga krzemieniewskii*. Desplazamiento de las células unas horas más tarde de la 1). Los irregulares espacios entre las bacterias son formados por la fusión de mas células continuando con su migración. 3) - 5). *Cytophaga krzemieniewskii*. Etapas sucesivas en el movimiento de las células, tomada en un periodo de 10 min. (Stanier, R.Y., 1940)

Como se muestra en la figura 4 las *Cytophagas* también forman agregados celulares, deslizándose hacia donde se encuentra el alimento (gliding) (Mark J., 2001). Las bacterias aeróbicas descomponedoras de celulosa más activas que hay en el suelo son ciertas especies de *Cytophaga* y *Sporocytophaga*. Pueden enriquecerse fácilmente a partir del suelo en un medio con una base de sales minerales que contenga papel filtro como única fuente de carbono y energía. Después de su aislamiento inicial, estas bacterias no son capaces de crecer a expensas de ningún otro sustrato orgánico. La capacidad celulolítica de estos organismos es notable (Duckworth, 1969)

Otra propiedad distintiva de las citofagas para hidrolizar a la celulosa es que requieren de un contacto directo con el sustrato celulósico; este comportamiento sugiere que el ataque primario sobre la celulosa está mediado por una exoenzima que no es difusible y que queda unida a la superficie

celular. Como consecuencia, las células de un cultivo que contiene celulosa se adhieren fuertemente a las fibras de celulosa, con frecuencia ordenándose de una manera muy regular, disponiéndose las células bacilares paralelamente a las fibrillas del polisacárido (Prat L. 2003 y Stanier R.1940).

Los microorganismos que pertenecen a la familia *Cytophagaceae* son capaces de degradar a la celulosa. Son células en forma de bacilos, quimiorganótrofos, aerobios facultativos. Los representantes típicos de esta familia son los bacilos aerobios estrictos, no fermentativos, gram negativos de colonias amarillas. Se sabe que todas degradan algún tipo de biomacromoléculas tales como gelatina, almidón, celulosa, pectina, agar y quitina (Stanier R.1940 y Wolfgang D. 2000).

La familia *Cytophagaceae* está formada por varios géneros, dos de los cuales son de interés para éste trabajo debido a que algunas de sus especies tienen capacidad de degradar celulosa. Tal es el caso de los géneros *Cytophaga* y *Sporocytophaga*.

En el género *Cytophaga* no se distinguen células latentes morfológicamente diferentes, son bacilos de menos de 15 micras de longitud, estrictamente aerobios; especies de vida libre en hábitats terrestre y marino, tienen la capacidad de lisar células de eucariontes y/o procariontes (*cytos* - del griego células; *phagos* - del griego devorar). Por otro lado, el género *Sporocytophaga* corresponde a bacilos degradadores de celulosa que genera microquistes diferenciados; la celulosa, la celobiosa y la glucosa, así como en ocasiones la manosa, son la únicas fuentes de carbono y energía para estos

microorganismos; su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C. (Stanier R., 1940 y Wolfgan D. 2006).

2. 3 Polisacáridos de la pared celular de plantas.

Se ha estimado que, a nivel mundial, anualmente se producen aproximadamente 4×10^9 toneladas de biomasa vegetal. Parte de esta biomasa no se acumula gracias a que es degradada por hongos y bacterias. Estos microorganismos juegan un papel muy importante en el ecosistema (Alvarez A., 2005).

Los polisacáridos constituyen del 80 al 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas, los cuales son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y por consiguiente se encuentra en diferentes tipos de desechos, siendo el papel uno de los más conocidos, y los generados en el procesamiento de algunas frutas y verduras. La pared celular se divide en tres grupos principalmente; celulosa, hemicelulosa y pectina (Bayer, 2004 y Biely, 1993).

La composición de la pared celular vegetal varía en los diferentes tipos celulares y en los diferentes grupos taxonómicos. En términos generales, la pared celular vegetal está compuesta por una red de carbohidratos y proteínas estructurales embebidos en una matriz gelatinosa compuesta por otros carbohidratos y proteínas (Cosgrove, J.1997).

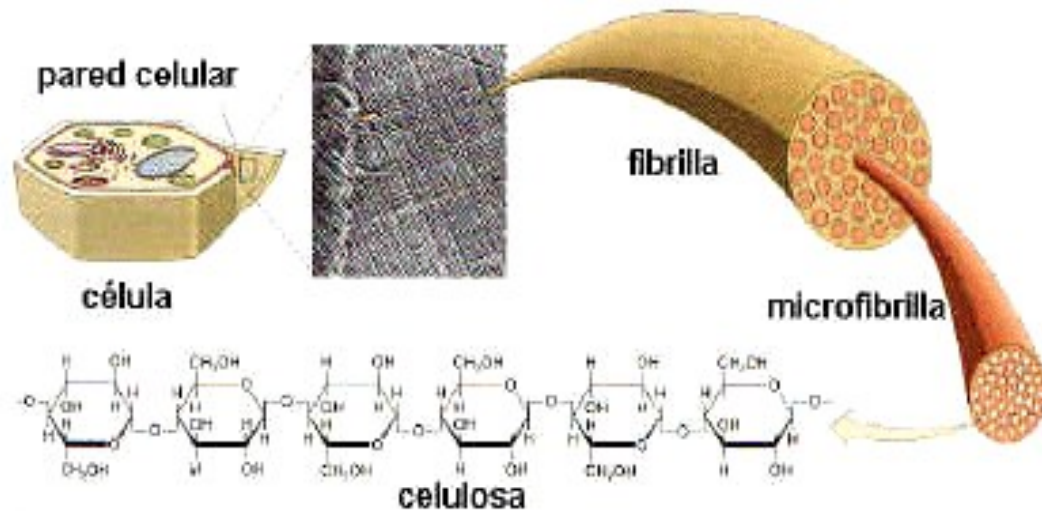


Figura 5 Modelo de la pared celular en planta. Las microfibrillas celulósicas contienen regiones no cristalinas, que pueden formarse por el enlace de la hemicelulosa (xiloglucano). El xiloglucano también puede unirse a la superficie de celulosa. Las pectinas constituyen un gel que forma un espacio y que a la vez sirve de pegamento. (Cosgrove J.D., 1997).

2.3.1 Celulosa

El principal componente de la pared celular vegetal es la celulosa. La celulosa es un polisacárido fibrilar que se organiza en microfibrillas y representa entre el 15% y el 30% del peso seco de las paredes vegetales. La celulosa es un agregado de polímeros lineales de residuos **D-glucopiranosil** en forma de cadena, los cuales están unidos en una configuración β-1,4. Esta configuración resulta en una estructura lineal rígida de celulosa (Coutts A. 1976).

La abundancia de los grupos hidroxil permite que se formen puentes de hidrógeno tanto inter como intramoleculares lo que contribuye a la agregación lineal y a la resistencia de este polisacárido (Warren. R., 1996). Así mismo, contribuye a la insolubilidad de la celulosa con solventes comunes, particularmente agua. El grado de polimerización (DP) de la celulosa varía según la fuente de extracción. Aun cuando la celulosa es un polímero bien

ordenado, existen zonas amorfas en las cuales los grupos hidroxilo reaccionan con más facilidad que en las zonas cristalinas (Ovando SL. 2005).

Actualmente la celulosa es la base de muchos productos de interés industrial (papel, fibras, aditivos, aplicaciones energéticas, etc.); así como la materia prima para los derivados de este polisacárido. Los derivados celulósicos (figura 6) constituyen uno de los grupos poliméricos más utilizados en la industria de cosméticos, alimentos, farmacéutica y textil (Henning J., 2002). Se pueden encontrar en el mercado dentro de una gran variedad de productos con un amplio margen de propiedades fisicoquímicas. Destacan entre otras, la utilización en: componentes de pastillas, reguladores de la viscosidad (cremas, geles, lociones, etc.), agentes enmascaradores de sabores y olores, materia prima para la fabricación de plásticos, hilos o ropa (Ovando SL. 2005).



Figura 6. Estructura de la molécula de celulosa, la cual está compuesta por una cadena de repetidas unidades anhidroglucósidas, donde n representa el número de unidades en la cadena y se conoce como el grado de polimerización de la celulosa (DP). Cada unidad anhidroglucósida contiene tres grupos hidroxílicos. Del lado derecho se observa la CMC, que se obtiene sustituyendo uno de los hidrógenos de estos hidróxilos por grupos carboximetílicos (Coffey, 1995)

En el área de alimentos se utiliza como agente auxiliar en el batido de helados, cremas y natas, como auxiliar en geles, gelatinas y pudines, como espesante en aderezos y rellenos, como agente suspensor en jugos de frutas, como coloide protector en emulsiones y mayonesas, entre muchas otras (Barba, C. 2002),

2. 3. 2 Hemicelulosa

La hemicelulosa y la pectina, así como la lignina, interactúan con las fibras de celulosa, creando una estructura rígida fortaleciendo la pared celular vegetal. Las microfibrillas de celulosa se encuentran unidas por carbohidratos no fibrilares a los que se denomina genéricamente hemicelulosa. Los componentes mayoritarios de la hemicelulosa son xiloglicanos (XiGs), glucuronarabinoxilanos (GAXs), etc (Katz M., 1967).

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura más abundante en la pared celular. Su composición química consta de pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), ácidos urónicos (galacturónico y glucorónico) y algunos desoxiazúcares (De Vries, 1999).

2. 3. 3 Pectina

La pectina es otro componente importante de las paredes celulares. Las sustancias pécticas o pectina son heteropolisacáridos estructurales principalmente encontradas en la lámina media de la pared celular, es un polisacárido no fibrilar, rico en ácido D-galacturónico, heterogéneamente

ramificado y muy hidratado. Los componentes mayoritarios de la pectina son: los homogalacturonanos (HGA) y los ramnogalacturonanos I (RG I). La matriz de pectina determina la porosidad de la pared y proporciona cargas que modulan el pH de la pared (De Vries, 1999 y 2001).

La pectina funciona como pegamento que sostiene a los otros polisacáridos de la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa y proteínas. La composición depende no solo de la especie sino también del tejido, etapa de crecimiento, maduración y las condiciones de crecimiento. Las pectinas son muy heterogéneas tanto en la estructura química como en el peso molecular (Cosgrove, D. 1997).

La pectina es el polisacárido más soluble de los polisacáridos de la pared. La pectina forma una fase gel en la que la red celulosa-hemicelulosa está anclada. La pectina puede actuar como un relleno hidrofílico que previene la agregación y el colapso de la red de celulosa (Henning J., 2002).

La pared celular puede ser dividida en tres láminas, la lámina media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. En la pared celular secundaria la pectina puede estar virtualmente ausente. La pectina de la lámina media es normalmente llamada “cemento intracelular” o “pegamento celular” (Carpita C., 1996).

2. 4 Bio-degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas.

La degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas es llevada a cabo por microorganismos, que se pueden encontrar libres en la naturaleza o como parte del tracto intestinal de animales. Debido a la heterogeneidad en la composición y estructura de estos polímeros se requiere de una amplia variedad de enzimas que trabajen sinérgicamente (Ramírez P., 2003).

2.4.1 Enzimas que degradan a los polisacáridos de la pared celular de plantas.

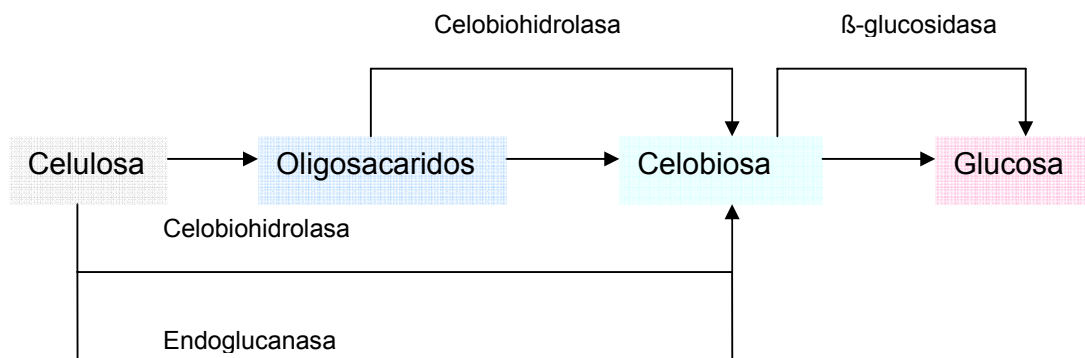
Las enzimas son catalizadores biológicos, permitiendo velocidades de reacción muy elevadas aunque estos dependen de la reacción que se lleve a cabo; por lo general, son proteínas de alto peso molecular que actúan como catalizadores de alta actividad y gran especificidad. Algunas tienen una estructura simple y otras tienen más de una unidad. Ciertas proteínas requieren de un grupo no proteínico para su actividad, que es un cofactor, como los iones metálicos, o una coenzima, como un complejo molecular orgánico (Voet D & Voet J, 1990).

Se han publicado numerosos artículos sobre la historia de las celulasas. Podría decirse que el interés sobre estas enzimas se inicia durante la segunda guerra mundial, cuando algunos artículos de algodón y lana necesarios para el ejército de Estados Unidos se descomponían rápidamente en zonas calidas. A

consecuencia de ello, la mayoría del cargamento era desechado y sustituido con artículos que no eran funcionales. Con el fin de encontrar una solución inmediata al problema, algunas organizaciones del ejército instalaron laboratorio de investigación; fue únicamente “Corps. Quartermaster” quien desarrolló un programa básico que consistía en estudiar la naturaleza de la descomposición, los organismos causantes, los mecanismos de acción y los métodos de control (Ovando SL., 2005).

Las celulasas son enzimas hidrolíticas (catalizadores biológicos) que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la pared celular. Esta última está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Hedges A. 1974).

Actualmente el mecanismo de acción de las celulasas se ha resumido en un complejo de cuatro enzimas cuyo mecanismo es mostrado de manera general en el esquema 1.



Esq. 1 Mecanismo de las celulasas (Breuli C., 1986).

La heterogeneidad de los sustratos y la complejidad de los sistemas celulolíticos hacen que su estudio no sea simple. Esto hace necesario que se realicen una serie de ensayos que permitan identificar cada tipo de celulasa involucrada en un complejo (Somerville C., 2006)

En general, tres tipos de enzimas conforman los sistemas celulolíticos: (1) endocelulasas (endoglucanasa o 1-4-β-D-glucan 4-glucanohidralasa), (2) exocelulasas (1-4-β-D-celobiosidasa o 1-4-β-D-glucan-celobiohidralasa) y (3) β-D-glucosidasas (β-D-glucosido glucohidrolasa).

- 1) **Endocelulasas** (endoglucanasa o 1,4-β-D-glucan 4-glucanohidralasa): rompe los enlaces glucosídicos internos de la celulosa en forma aleatoria, lo que provoca una rápida disminución en la longitud de la cadena de los β-glucanos con un incremento lento en los grupos reductores (Wood T., 1988). Las endoglucanasas son clasificadas en familias de acuerdo a sus propiedades hidrofóbicas y su dominio catalítico. Sus sustratos incluyen a la carboximetil celulosa y a la celulosa amorfa tratada con H₃PO₄ o álcali. La celulosa cristalina así como las fibras de algodón no son atacadas de manera efectiva por esta enzima (Hernández A., 1999).

- 2) **Exo-1.4-β-D-glucanasas**, también llamadas celobiohidrolasas, actúan cortando a la celobiosa del extremo no reductor de la cadena y en algunas ocasiones liberan pequeñas cantidades de glucosa (Hernández A., 1999).

3) **β -glucosidasas**, no son propiamente celulasas. No obstante, son componente muy importantes de los sistemas celulolíticos, ya que completan la hidrólisis de cadenas pequeñas de celo-oligosacáridos y de celobiosa, liberados por otras enzimas, hasta glucosa (Suzuki Y, 1967). Los sistemas celulolíticos con bajos niveles de β -glucosidasa tienen una baja actividad, debido a la inhibición de las endoglucanasas y las celobiohidralasas por el aumento de la celobiosa. Estas enzimas hidrólisan únicamente celo-oligosacáridos y no son específicas para el enlace β 1,4 (Hernández A., 1999).

Las enzimas celulolíticas también pueden ayudar a disminuir la contaminación, actuando en la digestión de residuos de excreción en fosas sépticas, drenaje y sobre desechos sólidos (Algeciras, N. 2002).

En síntesis, la utilización intensiva de las celulasas presenta problemas, siendo las limitaciones fundamentales las siguientes (Schwarz, W., 2001):

- a) El alto costo que implica obtener la enzima libre. Esto obedece a procesos poco eficientes de producción, que en parte se debe a los tiempos largos de incubación o fermentación que se requieren y a los bajos rendimientos de producción (Saxena I., 2001)
- b) Baja estabilidad en condiciones de reacción.

- c) Dificultades para la recuperación de la enzima después de la hidrólisis, problema que podría solucionarse, para sustratos de bajo peso molecular, inmovilizando a la enzima en un soporte adecuado y reducir así, el costo de proceso de hidrólisis. La heterogeneidad del medio dificulta esta operación (Poutanen K., 1997).

- d) Difícil ataque a ciertas formas estructurales de la celulosa, problema que ha sido parcialmente subsanado con técnicas de pretratamiento, ya que proporciona alta reactividad y accesibilidad de la enzima, aumentando así la eficiencia del proceso de hidrólisis (Stephen R., 2003).

- e) Necesidad de contar con actividades adicionales que permitan degradar compuestos a los que la celulosa está comúnmente asociada (hemicelulosa y lignina).

- f) Necesidad de contar con complejos celulolíticos completos, es decir, que contengan las actividades que aseguren la transformación de celulosa nativa a glucosa.

2. 5 Importancia de la producción de enzimas.

En muchas industrias son utilizadas para mejorar los productos y para bajar los costos con el consecuente incremento en la producción y en la economía y ahorro para sus usuarios. Esto se logra gracias a una sustitución de ingredientes o mediante el reemplazo de un proceso de manufactura más caro (Mejía C. 2000).

La industria extractiva de compuestos de interés, tales como la extracción de aceites esenciales y comestibles, la producción de jugos de fruta o de vegetales, la extracción de pigmentos, saborizantes y aromas, enfrenta problemas (el consumo de tiempo del proceso y la eficiencia de la extracción) debido a la naturaleza química compleja de los vegetales. La importancia y la demanda de estos productos naturales alimenticios ha propiciado el desarrollo de nuevas propuestas biotecnológicas, siendo una de ellas la aplicación de enzimas, como una alternativa para minimizar estos problemas. Las hidrolasas que tienen la capacidad de degradar los polisacáridos que constituyen la pared celular de los tejidos vegetales tales como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, reciben en la actualidad mayor atención principalmente en la industria alimentaria (Katz M., 1967 y Warren R., 1996).

Extracción de jugos. En la extracción de jugos los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación por dos razones: por un lado se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro, éstos presentan un sabor más agradable. En la extracción de los jugos a partir de la pulpa de fruta mediante actividad celulolítica y pectinolítica provocan un aumento en el contenido de sólidos solubles de 1.4 °Bx (°Brix = % de sólidos disueltos) al ser comparados con la muestra testigo (sin enzima). El aumento de los sólidos solubles fue atribuido a que las enzimas pectinasas solubilizaron la pectina y las membranas de la pared de las células que contienen el jugo, lo cual provocó un ablandamiento del tejido de la pulpa y aumentó la producción de jugo. La enzima celulasa adicionada sola, en las condiciones de estudio, no

presentó un efecto significativo ($p > 0.05$) con respecto al tratamiento testigo (sin enzima). Por lo tanto, los autores concluyeron que la efectividad de las enzimas dependerá de la naturaleza química del sustrato analizado (Warren R., 1996 y Ovando, S.L., 2005).

Adicionalmente, estos autores detectaron que durante la predigestión enzimática de la pulpa de naranja se liberaron otros componentes importantes de la fruta como son los aceites esenciales, además de los azúcares que juntos le imparten un mejor sabor al jugo. El efecto de la mezcla de dos preparados enzimáticos comerciales con actividad mixta provoca un efecto de sinergismo que ayuda a una mejor extracción en los jugos (Ovando, S.L., 2005 y Algeciras N., 2002).

Extracción de leche de coco. Mediante la degradación de los polisacáridos presentes en el coco es posible liberar la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído. Una mezcla que contenga actividades de pectinasa, celulasa, α -amilasa, amiloglucosidasa, proteasa y hemicelulasa, ha mostrado la extracción total de la leche de coco. Además, se ha observado que los azúcares, principalmente la glucosa que es producto de la degradación enzimática de los polisacáridos, permitieron obtener una leche de coco con un mejor sabor, debido a que le imparten mayor dulzura (Ovando, S.L., 2005).

Extracción de colorantes. La extracción de colorantes es otra aplicación atribuida a algunos preparados enzimáticos, principalmente de celulasa, hemicelulasa y pectinasa. El tratamiento de las flores de caléndula con

cualquiera de éstos preparados enzimáticos permitió una mayor extracción de la luteína, comparado con el testigo (sin enzima). El preparado comercial que presentaba también actividad de β -glucosidasa, fue el que provocó un mayor rendimiento en la extracción del carotenoide, a una concentración de 0.1 % w/w y un tiempo de incubación de 120 h, incrementando el contenido de luteína extraída de la caléndula (Ovando, S.L., 2005 y Castillo M., 2004).

El tratamiento enzimático es una alternativa viable para mejorar la producción de xantofilas extraídas de los pétalos de caléndula. El porcentaje obtenido de xantofilas representó un incremento del 53.9 % superior con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial, debido a que la reacción enzimática conduce a la degradación de los componentes de la pared celular (principalmente celulosa y hemicelulosa), lo que provoca un incremento en la permeabilidad de las células que mejora la transferencia de masa de los componentes hidrosolubles presentes en el tejido de las flores de la caléndula hacia la fase líquida (extracto enzimático) (Ovando, S.L., 2005).

Algunos otros ejemplos de las aplicaciones de las enzimas son:

- Reducción de viscosidad.
- Realización de bioconversiones (jarabe de fructosa)
- Separaciones (elaboración de queso),
- Cambio de funcionalidad (propiedades funcionales de la proteína de soya)
- Modificación del sabor (quesos italianos)

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en los vegetales y frutas, porque los preparados enzimáticos, al degradar a los polisacáridos presentes en el tejido, incrementan la formación de los poros, el tamaño del poro y la porosidad total del sustrato lo que permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos.

Pero la aplicación de algunos preparados enzimáticos no está limitada a facilitar la liberación de los componentes alimenticios o a mejorar la eficiencia del proceso y el rendimiento de la extracción, sino que también la acción de las enzimas presenta un impacto importante sobre el aspecto nutricional y sobre la calidad y la estabilidad de los productos extraídos (Ovando, SL, 2005).

Para obtener la máxima efectividad de un proceso de extracción acuoso enzimático se requiere de un estudio detallado por dos razones: primero, la selección adecuada del preparado enzimático depende fuertemente de la naturaleza química del sustrato, debido a que las enzimas catalizan reacciones específicas. Segundo, el grado de hidrólisis y la efectividad del proceso está influido por las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato, tiempo de reacción). Por lo tanto, la optimización de las condiciones del proceso es necesaria (Hernández A., 1999) Además, los resultados benéficos de la potencialidad de los preparados enzimáticos sobre la extracción de compuestos en la industria alimentaria da la

pauta para que en futuras investigaciones y a corto plazo, el uso de preparados enzimáticos resulte ser una alternativa promisorio en la extracción de productos farmacéuticos y de metabolitos a partir de materias primas vegetales (Ovando, SL.2005).

3. O B J E T I V O S

Objetivo General

Aislamiento y caracterización de Mixobacterias y Citofagas a partir de muestras ambientales: suelos urbanos y semi-urbanos con posible actividad celulolítica.

Objetivos Particulares

- Aislar mixobacterias y citofagas, con posible actividad celulolítica a partir de suelos urbanos y semi-urbanos.

- Establecer las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* de las bacterias aisladas para su estudio posterior.

- Caracterización de las cepas potencialmente celulolíticas.

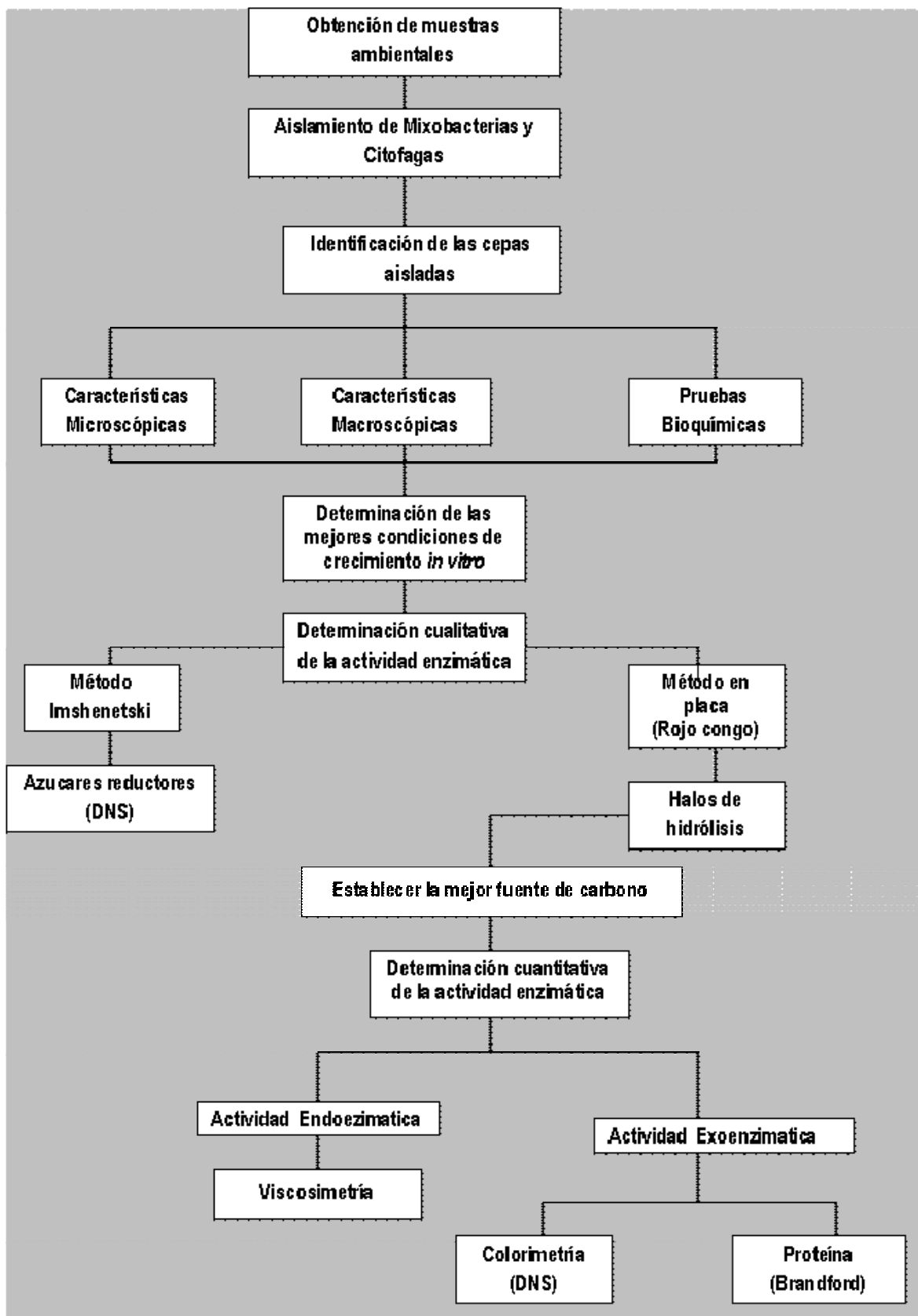
- Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica en papel filtro y carboximetil celulosa.

- Evaluar la capacidad endo-enzimática y exo-enzimática de mixobacterias y citofagas en carboximetil celulosa.

- Determinar la cantidad de proteína producida y su relación con la actividad específica.

*4. MATERIAL Y
MÉTODOS*

4. Diagrama de trabajo



4. 1 Obtención de muestras ambientales.

Se colectaron diferentes muestras de suelos urbanos (parques, jardines del D. F.) y semi-urbanos de la ciudad de México (Ajusco, Chalco, Xochimilco), ricos en materia orgánica en descomposición. Estas se tomaron a una profundidad de 15 cm. y fueron transportadas al laboratorio en bolsas con cierre hermético (con el fin de reducir la contaminación de hongos, disminuyendo la competencia entre los microorganismos y facilitando el aislamiento), posteriormente fueron tratadas con una solución benoamilo (10ml/10g de muestra) y se dejaron reposar durante 24 horas. Posteriormente, fueron secadas a temperatura ambiente y tamizadas, empacadas en bolsas para su posterior uso.

4. 2 Aislamiento de Mixobacterias y Citofagas

Se prepararon placas de silica gel en cajas petri utilizando las soluciones A y B (ver anexo). Se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones (A y B); a cada caja de Petri se le adicionó 15 ml de la mezcla final. Se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado, se dializaron con agua de la llave durante 24 horas con el fin de reducir el exceso de ácido y obtener un pH de 7 (Selman A., 1925).

A las placas solidificadas y lavadas se les colocó sobre la superficie círculos de papel filtro (Whatman no. 1) de aproximadamente 8cm de diámetro como sustrato, procurando no dejar burbujas de aire e hidratando con medio mineral. Las muestras de suelos previamente tratadas fueron colocadas en filas de cuatro por cuatro sobre la superficie del papel filtro. Se colocaron todas las

cajas petri perfectamente etiquetadas (fecha, lugar de origen de la muestra, etc.) en una cámara húmeda a una temperatura entre los 26 a 27°C en oscuridad durante una semana y posteriormente en luz para que desarrollaran su pigmentación, manteniendo hidratadas las cajas.

Las muestras se observaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico cada 3 días para ver el crecimiento y desarrollo de colonias o cuerpos fructíferos. Durante el monitoreo se adicionó medio mineral con cicloheximida (200µg/ml) para el evitar la deshidratación y contaminación por hongos.

Durante tres semanas se llevó a cabo el monitoreo de las cajas, observando el desarrollo de los microorganismos capaces de formar cuerpos fructíferos y colonias de bacterias que presentaron degradación del papel filtro

Estas cepas fueron aisladas en medio VY/2 (anexo) incubando a 37°C durante 24 horas. Las colonias obtenidas fueron resembradas por agotamiento en un medio selectivo (McConkey) con el fin de obtener colonias aisladas y puras. Las cepas puras se mantuvieron en medio CY líquido para su conservación y uso posterior.

4. 3 Identificación del microorganismo.

a) Morfología colonial

Las características generales estudiadas fueron: forma de la colonia y del borde, aspecto, color, olor y consistencia.

Por otro lado, se observó la formación de cuerpos fructíferos como características macromorfológicas propias de estas bacterias y con base en la clasificación de McCurdy (1994), en la cual es importante considerar: tipo de suelo, color del cuerpo fructífero, cuerpo fructífero con tallo o sin tallo y deslizamiento celular.

b) Características microscópicas

Las características micromorfológicas estudiadas fueron: forma, reacción al Gram, formación de endoesporas y tamaño (Bergey's Manual, 1994).

c) Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron, en primer lugar, aquellas sugeridas por McCurdy (1994). Estas son; catalasa, degradación de macromoléculas (agar, almidón, gelatina, pectina y quitina) y sensibilidad a antibióticos.

Por otro lado, se realizaron algunas de las pruebas sugeridas en el Bergey's Manual (1994), tales como; utilización de diferentes fuentes de carbono, fermentación de carbohidratos, utilización de citrato, hemólisis de glóbulos rojos de carnero y catalasa.

4. 4 Determinación de las condiciones de crecimiento y cultivo *in vitro*.

Para determinar las condiciones óptimas de cultivo de los microorganismos aislados, se probaron diferentes valores en dos variables importantes, pH (6, 6.5, 7 y 7.5) y temperatura (22, 27 y 32°C), en medio de cultivo Cy. Se realizaron, curvas de crecimiento de la densidad óptica contra tiempo de

incubación, utilizando el mismo medio de cultivo y se midió la densidad óptica a 660nm en un espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible, para estimar el crecimiento microbiano.

Cada medio utilizado fue inoculado con una concentración aproximada de 1×10^5 células /mL obtenidas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, cuantificadas indirectamente por densidad óptica a 660nm en un espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

4. 5 Determinación cualitativa de la actividad celulolítica.

a) Método de Imshenetski (1936)

Se sembraron las cepas en matraces Erlenmeyer con 50ml de medio stan 4 (ver anexo) con papel filtro, incubando por agitación durante 10 días a 200rpm y temperatura de 32°C, de acuerdo a las curvas de crecimiento previamente obtenidas.

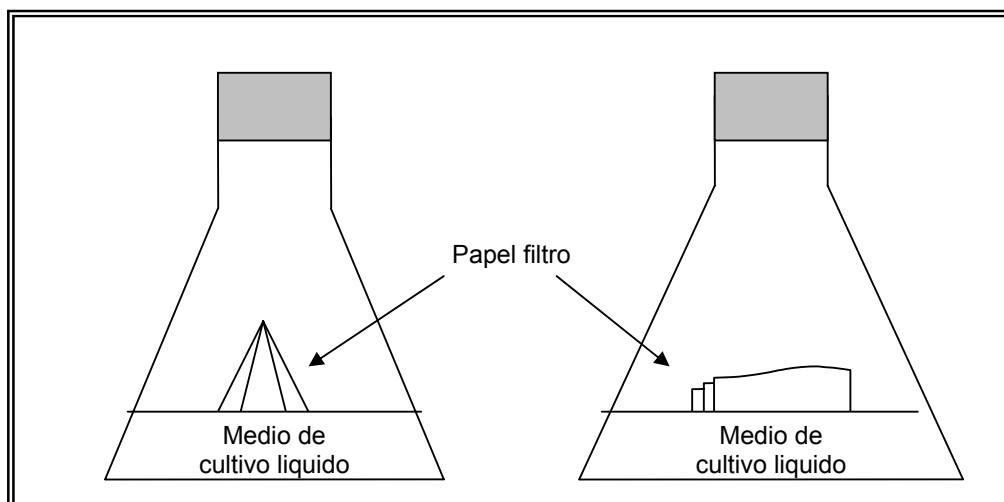


Figura 8. Método de Imshenetski (1936). Matraz Erlenmeyer con medio mineral y papel filtro como sustrato (celulosa), después de cierto tiempo de incubación el papel se comienza a degradar por la acción enzimática que poseen las bacterias.

La figura 8 representa el sistema recomendado por Imshenetski (1936), en el que se puede observar cómo el papel filtro queda parcialmente sumergido en el medio de cultivo. El medio de cultivo asciende por capilaridad a través del papel. Si este sistema se incubaba con agitación como se realizó en este estudio, la oxigenación favorece el crecimiento de bacterias celulolíticas aerobias.

Este es un método tradicional para determinar la presencia de enzimas celulolíticas en los microorganismos mediante la degradación del papel filtro durante un cierto tiempo.

b) Determinación de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Los azúcares reductores se determinaron en los filtrados libres de células por el método de DNS (Miller, 1959), la mezcla de reacción constó de 0.1 ml de filtrado enzimático + 0.9 ml de H₂O destilada + 2 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min., se le añadieron 5ml de H₂O destilada y se leyó a una $\lambda = 575$ nm en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar (1 a 10 mg/mL) de glucosa.

c) Método en placa con el colorante rojo congo. (Ruijsenaars H. J., 2001)

La actividad celulolítica en cada una de las cepas fue determinada de manera cualitativa en placas de carboximetil celulosa (CMC). Se sembró por triplicado cada uno de los microorganismos en placas de CMC (5g/L) a un pH 7, a 32°C por 24 y 48 horas, y se observó el crecimiento y la formación de halos de

hidrólisis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron teñidas con una solución acuosa de colorante rojo congo (1g/L) durante 10-15min. Transcurrido este tiempo, las placas fueron lavadas con una solución de NaCl (1M), con la finalidad de favorecer la interacción del colorante con el polisacárido. Posteriormente, las placas son lavadas con agua destilada para remover el exceso de colorante.

La degradación del polisacárido se demuestra por la ausencia del colorante, es decir, que alrededor de la colonia se observará un halo transparente, debido a que el polisacárido ya no interacciona con el colorante, y por lo tanto es posible observar el halo transparente. Para darnos una idea de idea de la actividad enzimática generada por el microorganismo los halos fueron comparados con los generados por la enzima pura de *Aspergillus Níger* (Hemicellulase H-0771).

4. 6 Determinación de las condiciones optimas de crecimiento para la producción de enzimas.

Con el fin de establecer la capacidad de crecimiento de las cepas en diferentes fuentes de carbono (celulosa) y determinar sus preferencias nutricionales, se evaluó el crecimiento de las cinco cepas en dos fuentes diferentes de celulosa: papel estraza sin tratamiento alguno (0.01g/l) y carboximetil celulosa (CMC 5g/l marca J.T. Baker) y medio mineral (anexo) a 32°C y modificando el pH (5 y 7), así como con la presencia de un inductor (extracto de levadura 0.01%), para determinar tanto la fuente de carbono y pH más adecuados, así como la selección de cepas.

La incubación se realizó durante 5 días en matraces Erlenmeyer de 50ml conteniendo 25ml del medio de cultivo correspondiente, a una temperatura de 32° C y con agitación constante de 200 r.p.m en una agitadora orbital. Durante el transcurso de los 5 días de incubación se tomaron muestras de 1ml en tubos eppendorf en condiciones estériles. Después de tomar las muestras se midió densidad óptica a 660nm en un espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

4.7 Evaluación de la actividad celulolítica.

a) Viscosimetría

Para cada bacteria se inoculó por duplicado en frascos de plástico que contenían 500ml de una solución de carboximetil celulosa (10g/L) y cicloheximida (200µg/ml) para evitar contaminación por hongos. Se incubaron a 37°C durante 5 días con agitación constante de 200 r.p.m. en una agitadora orbital: cada 24 horas se realizó la medición de la viscosidad, empleando un viscosímetro de Brookfield Engineering Laboratorios Inc., y el vástago No.1 a una velocidad de 6rpm.

Como blanco se determinó la viscosidad de una suspensión de carboximetil celulosa en medio mineral. Los porcentajes de disminución de la viscosidad se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{V_b - V_m}{V_b} \right] \times 100 = \% \text{ Dism. Viscosidad}$$

donde Vb: es la viscosidad del blanco y Vm es la viscosidad de la muestra al final del ensayo.

b) Colorimetría.

Una vez seleccionado el medio de cultivo y pH óptimo de crecimiento, se evaluó la actividad de endoglucanasa durante 5 días de incubación a 37°C, con agitación constante de 200 r.p.m en una agitadora orbital. Durante el tiempo de incubación se tomaron muestras de 5ml en tubos de ensayo en condiciones de asepsia y se centrifugaron a 7000 r.p.m. durante 10 minutos, se tomaron 3ml del sobrenadante y se adicionaron 5ml de una solución de carboximetil celulosa (CMC 5g/L) preparada en solución de buffer de fosfatos 100mM a pH 7. Se incubó durante 1 hora a una temperatura de 37°C en un baño de temperatura controlada. De la mezcla anterior se tomó 1 ml y se determinó la cantidad de azúcares reductores por el método del DNS. La actividad enzimática se determinó interpolando las lecturas ópticas a una curva estándar de glucosa en concentraciones de 1 a 10 mg/mL.

4. 8 Cuantificación de proteína.

El procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas está basado en el método diseñado por Bradford (1976). El colorante Coomassie G-250 (Reactivo de Bradford) interacciona con la proteína, formando un complejo colorido azul, la cantidad de proteína puede ser calculada determinando la cantidad de tinte en la forma iónica azul, que interactúa con la proteína y tiene un máximo de la absorbancia en 595 nm.

Se prepararon soluciones estándar de albúmina con concentraciones de 2-20 µg/ml, partiendo de una solución estándar de 1mg/ml. La cantidad de proteína

es determinada mediante una curva estándar de albúmina bovina sérica con concentraciones de 1 a 10 mg/ml. La concentración de albúmina en la solución se registra con el espectrofotómetro a 595nm.

Se determinó el contenido de proteína en 200 µl de sobrenadante obtenido del crecimiento en solución de carboximetil celulosa (CMC 10g/L) más 600µl de Tris 1M pH 8 y 200µl del reactivo de Bradford, para obtener un volumen final de 1 mL. Este método detecta proteína entre 1-15µg. La absorbancia resultante del problema se interpola a la curva patrón para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

5. RESULTADOS y DISCUSION

5.1 Muestras ambientales**Tabla 1.** Características de las muestras ambientales

Tipo de suelo	Características físicas
Suelo semi-urbano de Córdoba, Veracruz	Suelo no arcilloso, debido a su procedencia es rico en materia orgánica (hojas, ramas). Color café oscuro
Suelo semi-urbano, Ajusco	Proveniente de bosque de encinos, de la parte media Hojarasca, rico en desechos orgánicos.
Suelo urbano de la Cd. De México	Proveniente de un parque cerrado, es arenoso, hojarasca, rico en materia orgánica, color negro
Suelo semi urbano Chalco	Suelo agrícola, rico en restos fecales de diversos animales.

En la tabla 1 se muestran las principales características que presentaron los suelos utilizados en el proyecto. Se puede observar que los suelos son ricos en desechos orgánicos, tanto de origen animal como de origen vegetal. Esto es importante para el aislamiento de las bacterias con posible actividad celulolítica, debido a que la principal fuente de carbono esta dada por la celulosa.

En la figura 9, se muestra como fueron colocados los suelos sobre el papel filtro, para favorecer el desarrollo de bacterias celulolíticas y de donde posteriormente fueron aisladas.

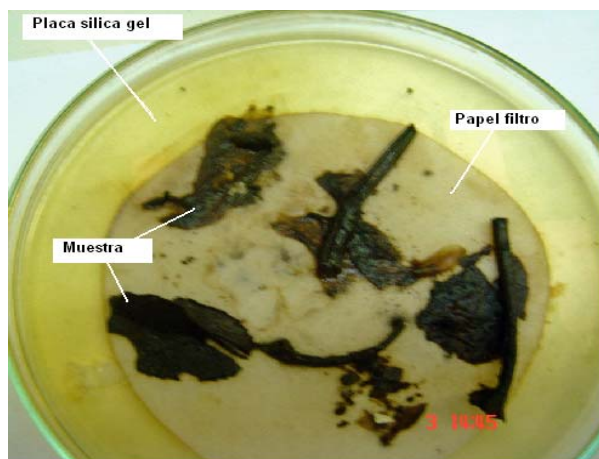


Figura 9. Cajas de silica gel, papel filtro y el suelo

Durante los primeros 5 días de incubación no se observaron cuerpos fructíferos. Sin embargo algunas de las cajas presentaron contaminación por hongos. En algunos casos, el crecimiento de los hongos fue abundante lo que dificultó la observación de cuerpos fructíferos o de alguna colonia, por lo que fue necesario adicionar cicloheximida al medio mineral para evitar que las cajas se siguieran contaminando. Después de 10 días de incubación se observó una disminución en el crecimiento de hongos y en algunos casos se evitó por completo su desarrollo. Después de 15 días se comenzó a observar el crecimiento de algunos cuerpos fructíferos y zonas de degradación en el papel filtro, lo que nos indicó de manera presuntiva la capacidad enzimática que poseen estos microorganismos para hidrolizar la celulosa.

5. 2 Aislamiento de Mixobacterias y Citofagas.

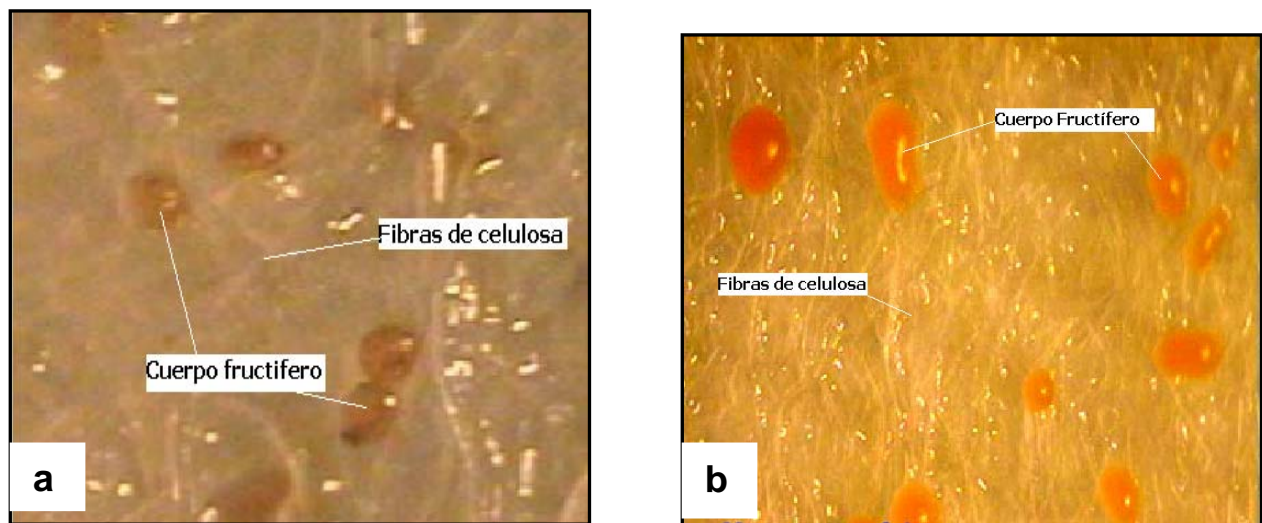


Figura 10. a) y b) Formación de dos diferentes cuerpos fructíferos sobre las fibras de celulosa

En la figura 10 se muestran los diferentes cuerpos fructíferos formados por Mixobacterias. El aislamiento se realizó a partir de los cuerpos fructíferos, considerando la descripción taxonómica descrita por Reichenbach (2000) y Hans (1994).

La figura 10.a) se muestra un cuerpo fructífero de color café claro de forma elongada desarrollándose sobre las fibras de celulosa. La figura 10.b) muestra otro tipo de cuerpo fructífero, de color anaranjado, con formas un poco más variables, tanto esféricas como elongadas, creciendo sobre las fibras de celulosa.

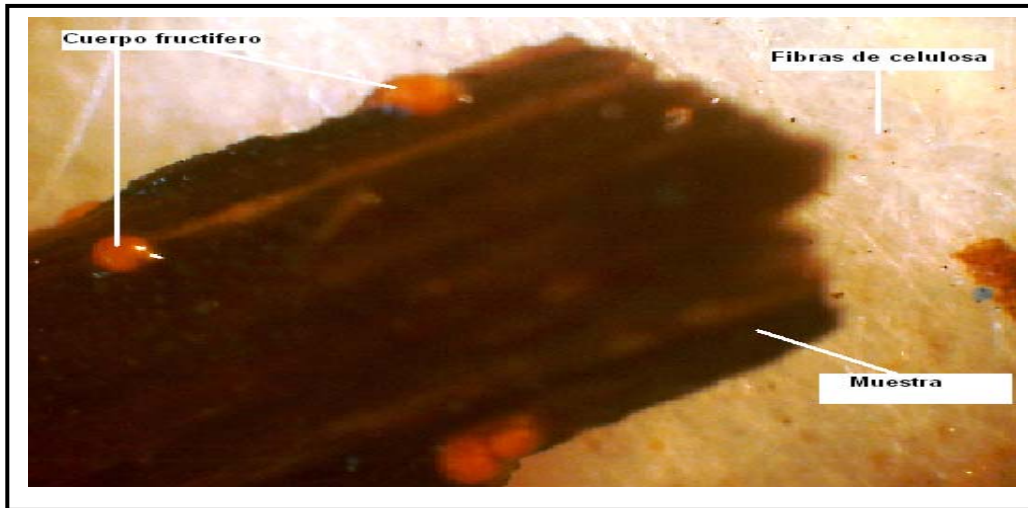


Figura 11. Después de 15 días de incubación se logra observar cuerpo fructífero sobre la muestra de materia orgánica

En la figura 11, se muestra otro tipo de cuerpo fructífero de color anaranjado un poco más oscuro (naranja como el de la yema de huevo) con forma mas esférica, pero a diferencia de las anteriores, éste se desarrolló sobre la materia orgánica (rama).



Figura 12. Degradación de las fibras de celulosa del papel filtro por posible actividad enzimática de *Cytophaga*.

En la figura 12 se pueden observar zonas en las cuales el papel filtro se encuentra degradado. Esto se puede deber a la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Cytophagaceae*, las cuales se caracterizan por entrelazarse entre las fibras de celulosa e hidrolizarla sin formar cuerpos fructíferos. Con el microscópico estereoscópico se pudo observar en las zonas de degradación la presencia de colonias blancas translúcidas, muy viscosas, y de donde se tomaron muestras para su identificación posterior.

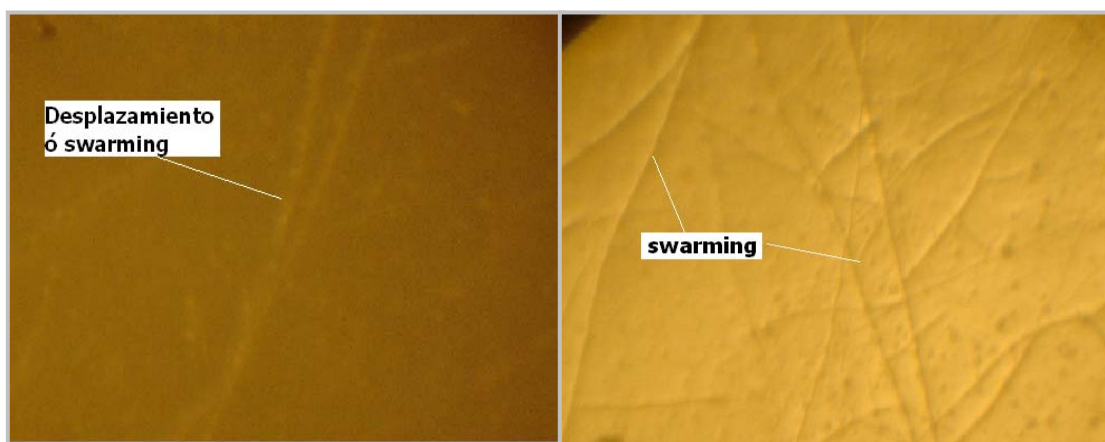


Figura 13. Deslizamiento generado por el desplazamiento de las bacterias, característico de las mixobacterias

En la figura 13 se muestran las huellas del deslizamiento generado por el desplazamiento de las bacterias, y el cual es una característica importante para la identificación de las mixobacterias y citofagas. Las huellas fueron observadas en las mismas cajas en donde se observaron los cuerpos fructíferos antes mencionados.

En el caso de las Mixobacterias es importante llevar a cabo el aislamiento a partir del cuerpo fructífero, debido a que este tipo de bacterias en la fase de colonia pueden ser confundidas con algún otro tipo de bacteria, y es mucho más fácilmente reconocerlas y diferenciarlas de otros microorganismos, cuando el cuerpo fructífero se ha desarrollado son fácilmente vistas por su tamaño con el microscopio estereoscópico y facilitan el aislamiento.

5.3. Porcentaje de cepas aisladas y purificadas por tipo de suelo.

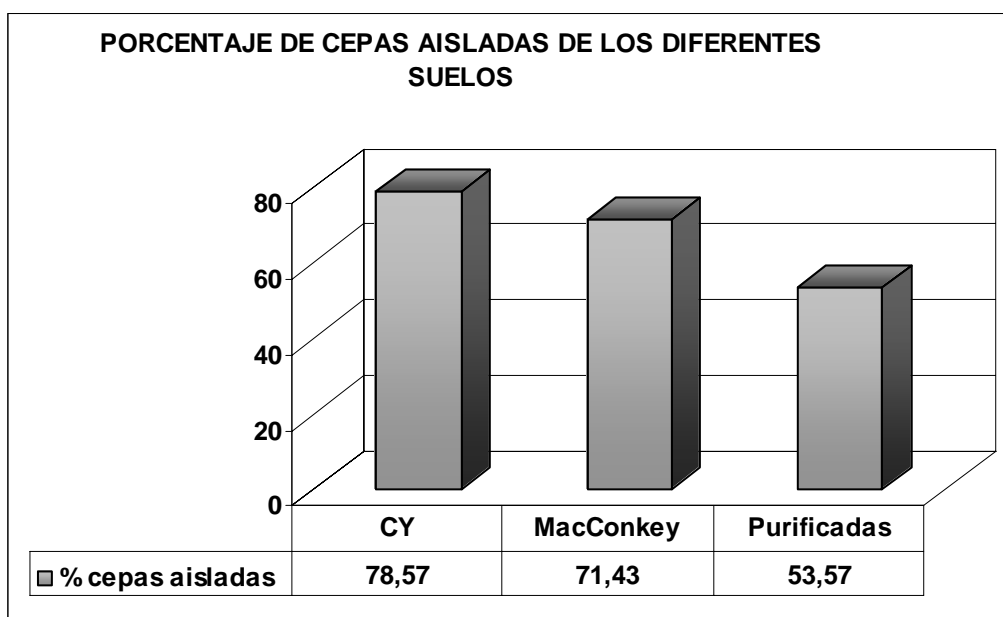


Gráfico 1. Porcentaje de cepas aisladas de los diferentes suelos

En el gráfico 1 se muestra el porcentaje de cepas aisladas de los diferentes suelos. Se aislaron un total de 28 cepas, el 78.57% fueron capaces de crecer en el medio selectivo CY, al resembrar en medio selectivo para bacterias Gram negativas (McConkey), el porcentaje disminuye al 71.43% equivalente a 20 cepas.

Al final se obtuvieron 15 cepas purificadas (53.57%) que cumplieron con las características necesarias de mixobacterias o citofagas.

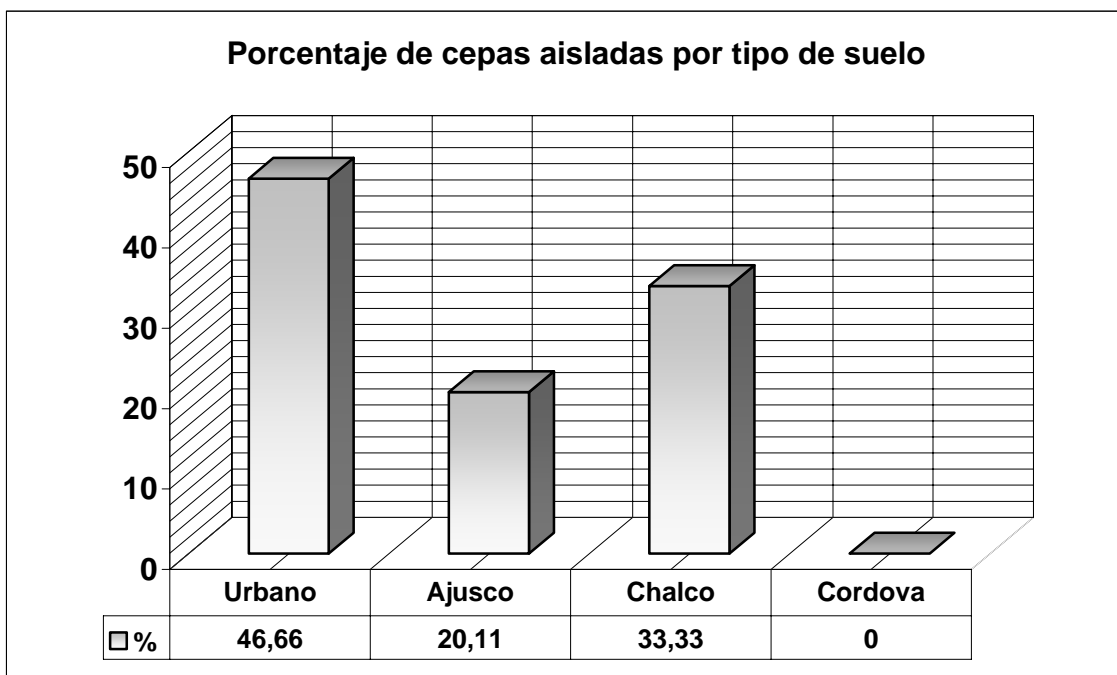


Gráfico 2. Porcentaje de cepas aisladas de acuerdo al tipo de suelo.

En el gráfico 2 se muestran los porcentajes que se obtuvieron de las cepas aisladas en cada tipo de suelo, se puede observar que el mayor porcentaje corresponde al suelo urbano, el cual presentó una mayor cantidad de desechos orgánicos de origen vegetal, el segundo lugar corresponde al suelo semi-urbano de chalco, y con el 20.11% el suelo de Ajusco. En el caso del suelo de Córdoba, no se obtuvo ninguna cepa, debido al desarrollo excesivo por hongos. Es importante mencionar que de las 15 cepas aisladas 9 presentaron cuerpo fructífero, lo que nos sugería Mixobacterias y 6 de ellas fueron muestras tomadas de la degradación del papel filtro, por lo que pudieran pertenecer a las Citofagas.

La diferencia entre los porcentajes no es muy grande y nos da una idea de la diversidad que posee este tipo de bacterias para desarrollarse en diferentes tipos de suelos en diferentes condiciones ambientales. Ello proporciona ventajas para su obtención y su posible utilización en la industria.

De estas 15 cepas aisladas se seleccionaron 5 de ellas, ya que no resulta práctico trabajar con 15. Para la selección fue necesario considerar las características macroscópicas, microscópicas, tipo de cuerpo fructífero y degradación de papel filtro (prueba presuntiva de la posible actividad enzimática). De las 5 cepas seleccionadas, 2 provenían de cultivos con degradación del papel filtro pero sin formación de cuerpos fructíferos y 3 con cuerpo fructífero y degradación del papel filtro a su alrededor.

5. 4 Caracterización microscópicas y macroscópicas.

En la tabla 2 se muestran las características macroscópicas, principalmente lo que se refiere al cuerpo fructífero. En la tabla 3 se muestran las características coloniales y en la tabla 4 los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas.

Tabla 2. Identificación por cuerpo fructífero (Wolfgang D. 2000; Reichenbach, 1992)

CEPAS	CARACTERISTICAS				
	<i>cuerpo fructífero</i>	<i>color</i>	<i>forma</i>	<i>deslizamiento</i>	<i>Mixob./Citofaga</i>
gama a-1	si	Café	Redondo y elongado	Si	mixobacteria
A1gde	no	----	-----	No	citofaga
A3N	si	Naranja	esférico	Si	mixobacteria
A1'	no	----	-----	No	citofaga
A3'	si	Amarillo huevo	esférico	Si	mixobacteria

Tabla 3 Características coloniales de las cepas aisladas.

CEPAS	CARACTERISTICAS COLONIALES					
	<i>FORMA</i>	<i>TAMAÑO</i>	<i>BORDE</i>	<i>ELEVACION</i>	<i>TEXTURA</i>	<i>COLOR</i>
gama a-1	circular	2-3mm	entero	convexa	butirosa	No pigmentada
A1gde	circular	2-3mm	entero	convexa	viscosa	Amarillo
A3N	circular	2-3mm	ondulado	plana	viscosa	No pigmentada
A1'	circular	2-3mm	entero	elevada	butirosa	Naranja
A3'	circular	2-3mm	entero	convexa	butirosa	No pigmentada

Tabla 4. Pruebas Bioquímicas

Pruebas	Cepas							
	A3'	gama a-1	* <i>Sorangium</i>	A3N	* <i>Polyangium</i>	A1'	A1gde	* <i>Cytophagaceae</i>
Hemólisis	-	-	Negativo	-	Negativo	-	+	Negativo
Catalasa	+	+	Positiva	+	Positiva	-	-	Negativo
Citrato	+	+	Negativo	+	Negativo	+	+	Positivo
O/F	O	O	Oxidativo	O	Oxidativo	O	O	Variable
Fuentes de carbono								
Almidón	+	+	Positiva	+	Positiva	+	+	Positivo
Acetato	+	-	Negativo	+	Positiva	+	+	Positivo
Glucosa	+	+	Positiva	+	Positiva	+	+	Positivo
Lactosa	-	-	Negativa	+	Positiva	-	-	Positivo
Sacarosa	+	v	Positiva	+	Positiva	-	v	Variable
Degradación de:								
Agar	-	+	Positiva	+	Positiva	-	-	Positivo
Almidón	+	+	Positiva	+	Positiva	+	-	Positivo
Gelatina	-	-	Positiva	-	Positiva	-	-	Positivo
Pectina	+	-	Positiva	+	Positiva	-	-	Positivo
Quitina	-	-	Positiva	-	Positiva	-	-	Positivo

NOTAS: O/F significa metabolismos oxidativo o fermentativo (glucosa, lactosa y sacarosa). (v) significa que las cepas presentan comportamiento variable. (*) Son datos indicados por la literatura (Begey's Manual)

Tabla 5. Sensibilidad a antibióticos.

Sensibilidad a:	Cepas							
	A3'	gama a-1	(*) <i>Sorangium</i>	A3N	(*) <i>Polyangium</i>	A1'	A1gde	(*) <i>Cytophagaceae</i>
cloranfenicol	+	-	positivo	+	positivo	-	+	positivo
Penicilina	-	-	negativo	-	negativo	-	-	negativo
Ampicilina	-	-	negativo	-	negativo	-	-	negativo
Eritromicina	+	+	positivo	-	positivo	-	-	positivo
Estreptomina	+	+	positivo	+	positivo	+	+	positivo
Enoxacilina	+	+	positivo	+	positivo	+	+	positivo
Cefalotina	+	+	positivo	+	positivo	+	+	positivo

NOTAS: (+) en la prueba significa inhibición, (*) Son datos indicados por la literatura (Begey's Manual)

5. 5 Identificación de las cepas aisladas.

De acuerdo a los resultados anteriores, la cepa A3' (**cepa 1**) corresponde a un bacilo pleomorfo Gram negativo aerobio, de 0.8 a 1.6 μm de largo por 0.3 a 0.5 μm de ancho, presenta deslizamiento (gliding). Catalasa positivo y pectinolítico, las células vegetativas son bacilos cilíndricos. Sus características lo identifican como miembro del género *Sorangium*, según el Bergey 's Manual (1994).

La cepa A1gde (**cepa 2**) corresponde a un bacilo Gram negativo aerobio, de 2 a 3 μm de largo, con agrupación. Colonias lisas, redondas con pigmentación amarilla claro y que presenta degradación abundante sobre el papel filtro. Esto habla de la posible actividad celulolítica. De acuerdo al Bergey's Manual (1994), estas características sugieren un bacilo de la Familia *Cytophagaceae*.

La cepa gama a-1 (**cepa 3**) corresponde a bacilos pleomorfos aerobios Gram (-), de 0.8 a 1.6 μm de largo por 0.3 a 0.5 μm de ancho, sin agrupación. Las colonias no presentan pigmentación. Hay presencia de deslizamiento al momento de ser aislada, lo cual sugiere una bacteria deslizante de la familia Mixobacteria del género *Sorangineae*.

La cepa A1' (**cepa 4**) corresponde a un bacilo Gram negativo, de 0.9 a 1.7 μm de largo por 0.5 a 0.7 μm de ancho, con agrupación y posible actividad celulolítica puesto que fue aislado de donde había degradación del papel filtro, las colonias presentaron pigmentación naranja. Estas características sugieren una bacteria deslizante de la familia de las *Cytophagaceae* (Reichenbach, 2000).

La cepa A3N (**cepa 5**) corresponde a un bacilo aerobio Gram negativo, de 0.8 a 1.4 μm de largo por 0.4 a 0.5 μm de ancho. Las colonias son lisas, redondas, brillantes, pero sin pigmentación, elevadas, translúcidas, son catalasa positiva, pectinolíticas y amilolíticas, cuyas características las identifican como posible miembro del género *Polyangium*.

Dos de las mixobacterias aisladas corresponden al suborden *Sorangineae*, al género de *Sorangium* la cual se caracteriza por presentar un cuerpo fructífero en forma de una simple esfera elongada de color naranja amarillento (figura 14 y 16). La cepa 5 fue identificada como del género *Polyangium* al presentar un cuerpo fructífero esférico amarillo huevo (figura 15) característico de este género, además de las características antes mencionadas. Las cepas 2 y 4 se identificaron como del género de las cytophagas, básicamente por la ausencia del cuerpo fructífero y por el conjunto de características antes mencionadas, además de ser aisladas de la zona de degradación del papel filtro. El género *Cytophaga* también se caracteriza por tener bacilos un poco más grandes que las mixobacterias, es decir, tienden a ser más largos y a estar en forma de cadenas (figura 17). En el caso particular de *Cytophaga* sus colonias son usualmente amarillas, naranjas ó hasta rojas debido a la producción de pigmentos no difusibles (tabla 4), se ha reportado que estas bacterias del suelo son degradadoras más activas de celulosa que las mixobacterias.

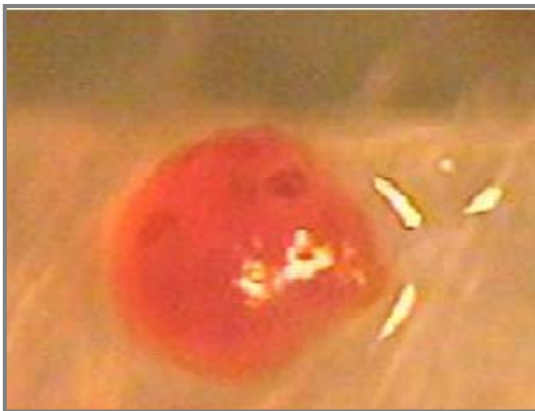


Figura 14. Cuerpo fructífero sobre fibras de celulosa, perteneciente al género *Sorangium*



Figura 15. Cuerpos fructíferos sobre la muestra orgánica, perteneciente al género *Polyangium*

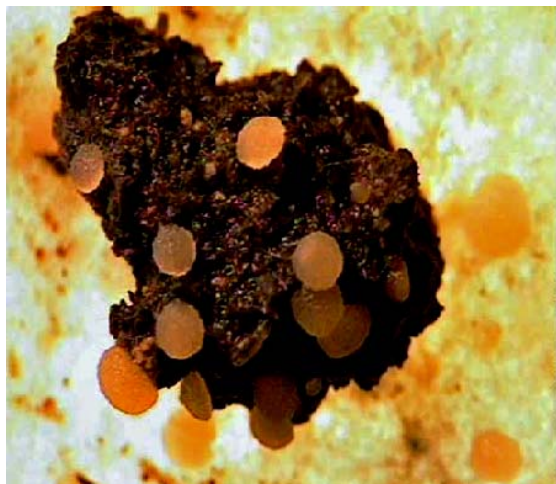


Figura 16. Cuerpos fructíferos sobre fibras de papel de celulosa, perteneciente al género *Sorangium*.

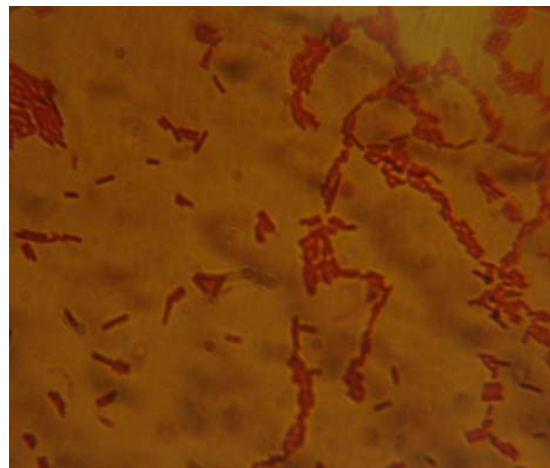


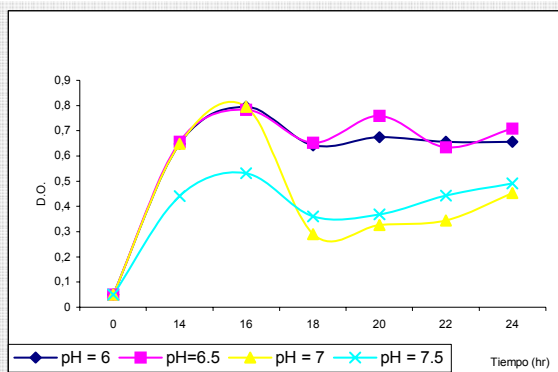
Figura 17. Bacilos largos en cadenas Gram negativos, característicos de la familia *Cytophagaceae*.

5. 6 Determinación de las condiciones óptimas de cultivo *in vitro*.

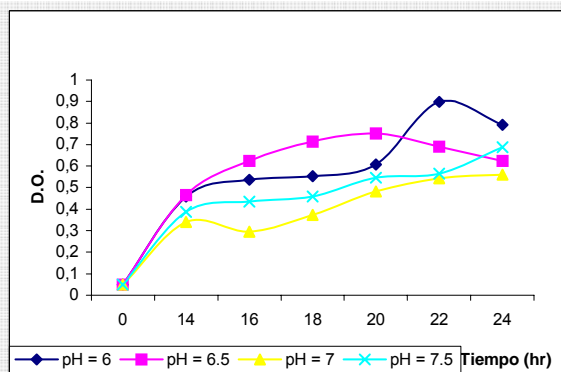
Una vez identificadas cada una de las cepas, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en donde se evaluaron diferentes temperaturas (22°, 27° y 32°C) y pH's (6.0, 6.5, 7.0 y 7.5) con el fin de establecer las condiciones óptimas de cultivo *in vitro*.

En la figura 18 se muestra el crecimiento de las 5 cepas incubadas a 22°C a diferente pH. La gráfica 18-A corresponde a la cepa 3 (*Sorangium*) la cual muestra un crecimiento muy variable a cada pH, sin poder determinar fácilmente el pH óptimo en estas condiciones, también se puede observar que el mayor crecimiento se da durante las primeras 14 a 16 horas de incubación, después de este tiempo hay un descenso en el crecimiento, y comienza la fase estacionaria. La gráfica 18-B correspondiente a la cepa 4 (*Cytophagaceae*), muestra un crecimiento mucho más estable, obteniendo el mayor crecimiento entre las 16-18 horas. A pH 7 se observa un crecimiento escaso, a diferencia del pH 6 y 6.5 en donde el crecimiento es mayor. La gráfica 18-C corresponde a la cepa 1 (del género *Sorangium*) muestra un comportamiento un poco inestable, su máximo crecimiento se observó entre las 20 y 22 horas de incubación, no hay una fase estacionaria tan notable como en las cepas anteriores, pero sí se logra apreciar que después de las 22 horas de incubación el crecimiento es mucho más lento. La gráfica 18-D, correspondiente a la cepa 2 (*Cytophagaceae*), muestra una fase logarítmica muy larga de aproximadamente 22 a 24 horas de incubación, no se alcanza a ver una fase estacionaria después de las 24 horas de incubación, por lo que podemos suponer que estas condiciones no son las óptimas para su desarrollo: posiblemente, la temperatura (22°C) de incubación no sea la adecuada.

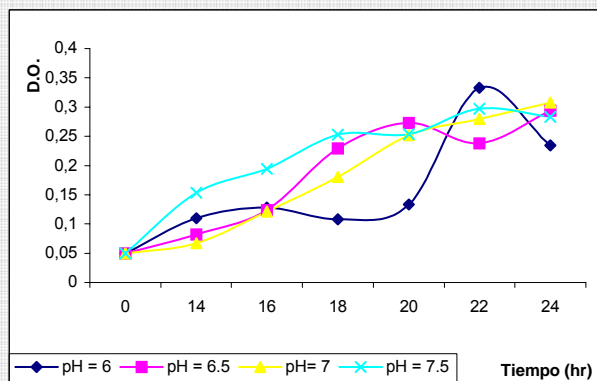
En la gráfica 18-E que corresponde a la cepa 5, (género *Polyangium*) se observa un comportamiento muy parecido al de la cepa 2 (*Soramgium*), la fase logarítmica es muy larga, no se logró observar una fase estacionaria, pero suponemos que su máximo crecimiento está dado entre las 22 y 24 horas de incubación, y que la temperatura de incubación tampoco es adecuada para su crecimiento.



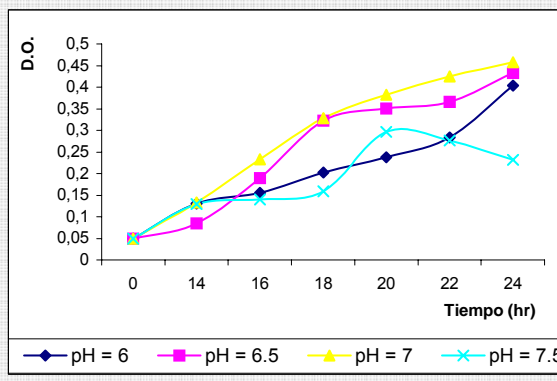
Gráfica a) Curva de crecimiento a 22°C de la cepa gama a-1 identificada como del género *Sorangium*



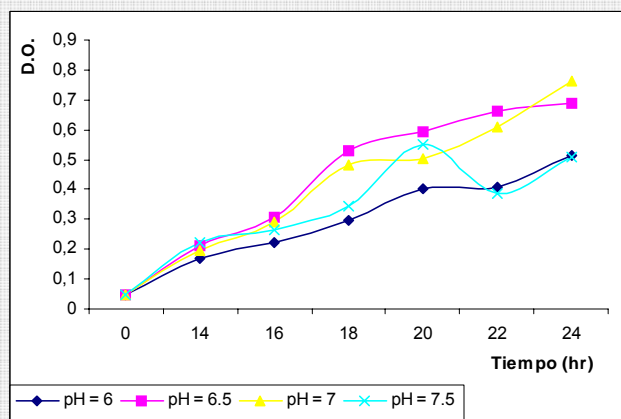
Gráfica b) Curva de crecimiento a 22°C de la cepa A1' identificada como *Cytophagaceae*



Gráfica c) Curva de crecimiento a 22°C de la cepa A3' identificada como del género *Sorangium*



Gráfica d) Curva de crecimiento a 22°C de la cepa A1dge identificada como *Cytophagaceae*

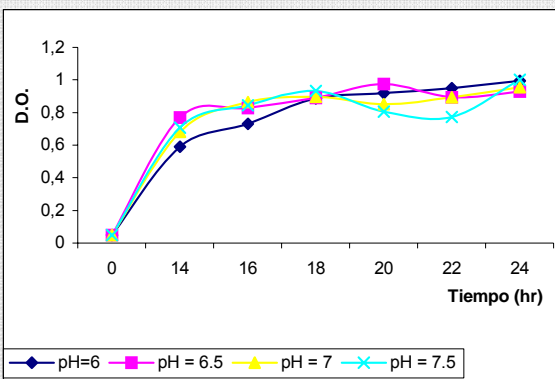


Gráfica e) Curva de crecimiento a 22°C de la cepa A3N identificada como del género *Polyangium*

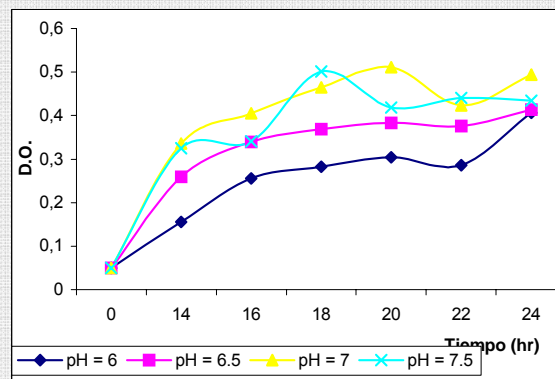
Figura 18. Crecimiento a 22°C a diferentes pH, en donde se puede observar de manera general un comportamiento variable.

La figura 19 muestra las curvas de crecimiento de cada una de las cepas aisladas a 27°C. La gráfica 19-A corresponde a la cepa 4 (de la familia *Cytophagaceae*), en la cual se puede observar que el mayor crecimiento se da cuando el pH es 7. Hay claramente una diferencia en el crecimiento a pH 7, con respecto a pH 6, 6.5 y 7.5, lo que sugeriría que conforme se aumenta la temperatura, el microorganismo se desarrolla mejor a pH 7. En la gráfica 19-B correspondiente a la cepa 5 (*género Poliyangium*) muestra un crecimiento similar en los diferentes pH's. A pH 7 se puede observar que se favorece un poco más el crecimiento, sin embargo la diferencia entre los otros pH's no es muy grande, por lo que no podemos asegurar que afectivamente el pH 7 sea el óptimo para esta cepa. En la gráfica 19-C (de la familia *Cytophagaceae*) se observa notablemente un mayor crecimiento cuando el pH es de 7, mientras que a pH 6, 6.5 y 7.5, el crecimiento se ve reducido sensiblemente. Prácticamente presenta el mismo comportamiento que la cepa 4 (*Cytophagaceae*) (gráfica 19-A) además de que ambas corresponden al género de *Cytophaga*. La gráfica 19-D correspondiente a la cepa 1 (del género *Sorangium*), muestra un crecimiento similar cuando el pH es 6, 7.0 y 7.5; su crecimiento es satisfactorio, no hay mucha variación. Cuando el pH es 6.5, el crecimiento se ve reducido notablemente en comparación con las condiciones anteriores, lo cual es un poco extraño ya que la diferencia entre el pH de 6.5 y 7 no es mucha, pero parece que afecta el crecimiento del microorganismo, lo que nos reafirma la importancia de determinar las condiciones óptimas de cultivo, antes de determinar la posible actividad enzimática. La gráfica 19-E corresponde a la cepa 3 (*género Sorangium*), ésta presentó un mejor comportamiento y mayor crecimiento cuando el pH fue 7, durante las primeras 12 horas de incubación. Después de este tiempo

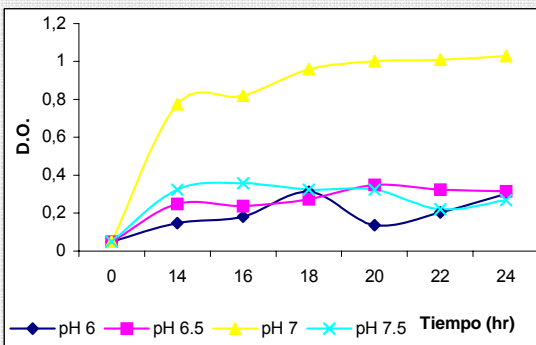
comienza la fase estacionaria. A pH 6, 6.5 y 7.5 el crecimiento es muy lento, en comparación con pH 7, y el tiempo de incubación donde se da el máximo crecimiento es durante las primeras 4 horas de incubación, lo cual podría ser una ventaja, puesto que lo que se busca es encontrar las condiciones en donde el microorganismo crezca más y en el menor tiempo posible, sin embargo el comportamiento siguió siendo inestable.



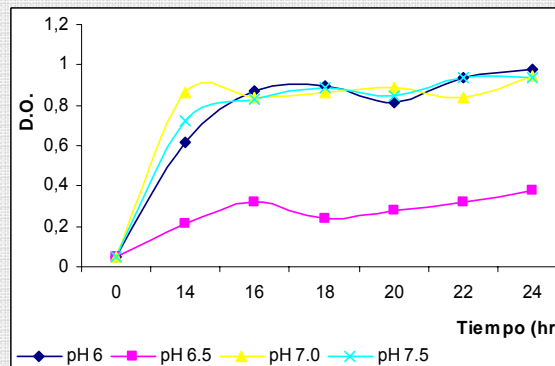
Gráfica a) Curva de crecimiento a 27°C de la cepa A1', identificada como *Cytophagaceae*



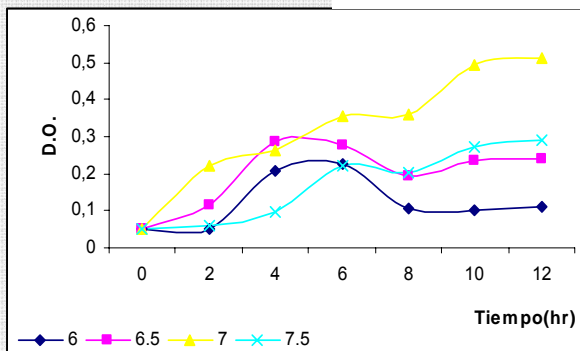
Gráfica b) Curva de crecimiento a 27°C de la cepa A3N, identificada como del género *Polyangium*.



Gráfica c) Curva de crecimiento a 27°C de la cepa A1gde identificada como *Cytophagaceae*



Gráfica d) Curva de crecimiento a 27°C de la cepa A3' identificada como *Sorangium*.



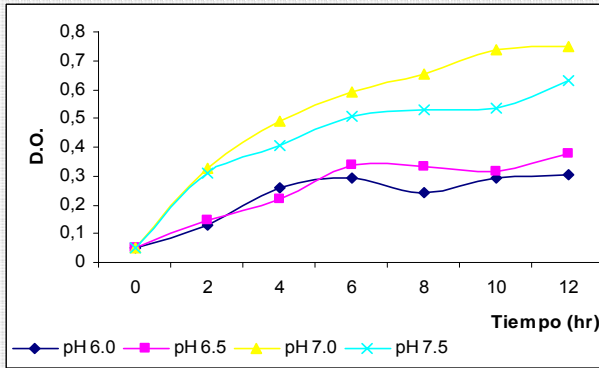
Gráfica e) Curva de crecimiento a 27°C de la cepa gama a-1 identificada como *Sorangium*.

Figura 19. Crecimiento a 27°C en diferentes pH. El comportamiento de las cepas es variable a pH 6, 6.5 y 7.5, mientras que a pH 7 el comportamiento es mas estable y la densidad óptica es mayor.

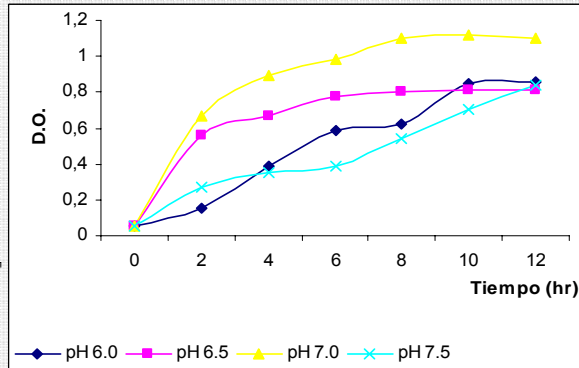
La figura 20 muestra las gráficas de crecimiento a una temperatura de incubación de 32°C. La gráfica 20-A correspondiente a la cepa 5 (*Polyangium*) muestra que el mejor crecimiento está dado cuando el pH fue 7, los tiempos de incubación se reducen notablemente, el crecimiento es rápido durante las primeras 6 horas de incubación, después de este tiempo se puede observar que el crecimiento se detiene, hasta notar claramente la fase estacionaria. A pH 6 y 6.5 el crecimiento es menor y más errático, de igual forma la fase estacionaria aparece después de las 6 horas de incubación. En el caso de la cepa 1 mixobacteria (gráfico 20-B), presenta un comportamiento semejante al de la cepa A3N, es decir, que el mayor crecimiento se da cuando el pH es 7, sin embargo, el crecimiento a pH 6, 6.5 y 7.5 no es muy diferente, es algo menor pero también puede desarrollarse satisfactoriamente el microorganismo. La cepa 4 (*Cytophagaceae*), presentó también un mayor crecimiento cuando el pH es 7 (gráfica 20-C). Como las cepas anteriores, a pH 6 y 7.5 la fase exponencial se prolonga. Cuando el pH es 7, los tiempos de incubación se reduce de manera general a 10 horas y el crecimiento es satisfactorio. La cepa 2 (*Cytophagaceae*) (gráfica 20-D) también muestra un mayor crecimiento a pH 7. Después de 6 horas de incubación, no se observó cambios notables en la velocidad del crecimiento. La cepa 3 (*Sorangium*), muestra un mayor crecimiento cuando el pH es de 7. Sin embargo, a pH 6, 6.5 y 7.5 el comportamiento en el crecimiento no es tan variado a esta temperatura (32°C) como en las evaluadas anteriormente, lo que nos sugiere que el crecimiento y el comportamiento es favorecido conforme se aumenta la temperatura.

Con base en los resultados obtenidos se decidió que las condiciones óptimas de cultivo para las cepas aisladas es de 32°C, pH 7.

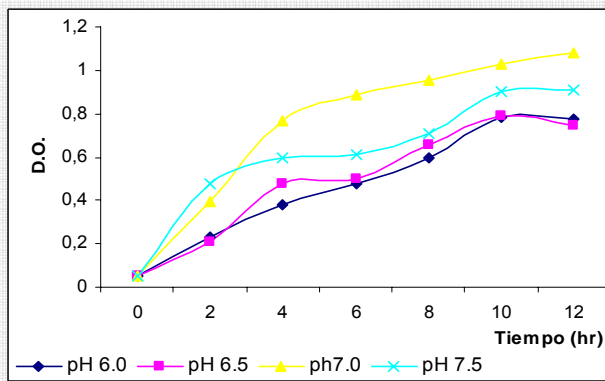
Una vez establecidas las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* en las cepas aisladas se evaluó de manera cualitativa la posible actividad celulolítica.



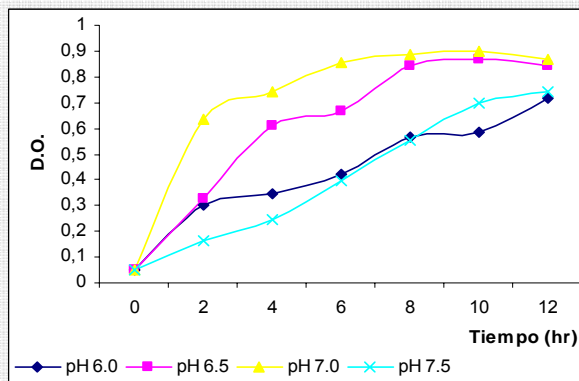
Gráfica a) Curva de crecimiento 32°C de la cepa A3N identificada como *Polyangium*.



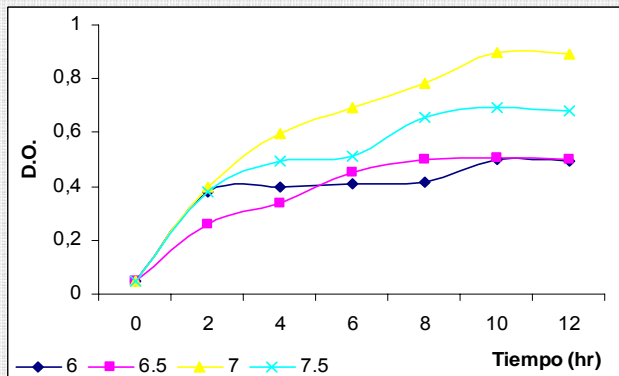
Gráfica b) Curva de crecimiento a 32°C de la cepa A3' identificada como *Sorangium*.



Gráfica c) Curva de crecimiento a 32°C de la cepa A1' identificada como *Cytophagaceae*.



Gráfica d) Curva de crecimiento a 32°C de la cepa A1gde identificada como *Cytophagaceae*.



Gráfica e) Curva de crecimiento a 32°C de la cepa gama a-1 identificada como *Sorangium*.

Figura 20. Crecimiento a 32°C en diferentes pH's El comportamiento de las 5 cepas se vio favorecido a 32°C en pH 7

5. 7. Determinación cualitativa de la actividad celulolítica.

a) Método de Imshenetski

Después de 10 días de incubación en las condiciones de crecimiento determinadas previamente, no se observó degradación visible del papel, pero sí se observó crecimiento en los matraces y mucosidad sobre el papel filtro, por lo que se decidió evaluar la posible presencia de azúcares reductores por el método del DNS. Desafortunadamente no se obtuvieron resultados que comprobaran la posible degradación del papel filtro a glucosa, lo que nos llevó a pensar en la posibilidad de que las bacterias no poseen el complejo enzimático como para degradar a las fibras de celulosa del papel filtro hasta glucosa. La segunda posible conclusión es que las condiciones de pH y temperatura así como el tiempo de incubación no son óptimos para que el microorganismo lleve a cabo la hidrólisis completa de la celulosa y la tercera posible conclusión es que las bacterias están degradando lentamente la celulosa hasta glucosa, la cual utilizan como fuente de energía para sobrevivir con mayor facilidad.

b) Método en placa y el colorante rojo congo.

A las 24 horas de incubación (32°C a pH 7) se observó crecimiento sobre las placas de CMC, fueron teñidas, sin halos de hidrólisis. A las 48 horas de incubación, las cajas presentaron un mayor crecimiento, se tiñeron y se observaron halos de hidrólisis alrededor de cada colonia desarrollada.

En la figura 21, se muestran los halos de hidrólisis a las 48 horas de incubación (32°C y pH 7). La figura 21.a corresponde a la **cepa 5** (*Polyangium*), en donde se lograron observar 24 colonias y alrededor de cada una de ellas se observó un halo transparente. La figura 21.b corresponde a la **cepa 4** (*Cytophagaceae*), en la cual se observaron 30 colonias con halo de hidrólisis. La figura 21.c corresponde a la **cepa 2** (*Cytophagaceae*) en la cual se contabilizaron 22 colonias cada una con halo de hidrólisis. En la **cepa 3** (*Sorangium*) se observaron únicamente 12 colonias y en la **cepa 1** (*Sorangium*) se observaron 15 colonias, en ambos casos con halos de hidrólisis. En total se obtuvieron 103 colonias con halos de hidrólisis, partiendo de una alícuota de 500µl en cada caja.

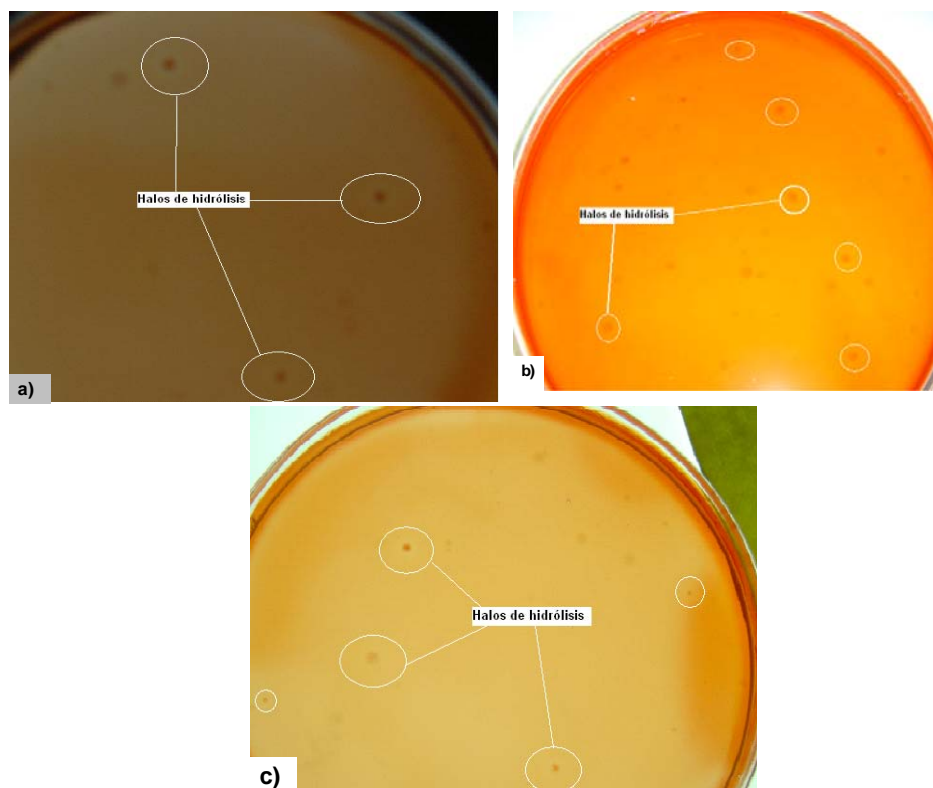


Figura 21 a, b y c. Degradación de la celulosa en placas con carboximetil celulosa (CMC). La figura a) corresponde a la cepa A3N, la figura b) a la cepa A3' y la figura c), a la cepa A1gde.

Tabla 6. Halo de degradación en placas con CMC

Género	Cepas	Promedio del halo (mm)
<i>Aspergillus</i>	Control (enzima pura)	18.33
<i>Sorangium</i>	gama a-1	9.0
<i>Cytophaga</i>	A1'	12.1
<i>Cytophaga</i>	A1gde	12.5
<i>Polyangium</i>	A3'	10.5
<i>Polyangium</i>	A3N	11.8

En la tabla 6 se muestra el promedio del diámetro en los halos observados y fueron comparados con los que se obtuvieron de la enzima pura de *Aspergillus niger* (Hemicellulase H-0771), para darnos una idea de cómo es la actividad de estas bacterias. El halo que se obtuvo con la enzima pura es mucho más grande que con las bacterias. La cepa A1' y A1gde son las que poseen el diámetro más grande de aproximadamente 12.1-12.5 mm, ambas *Cytophagaceae*. En el caso de las mixobacterias la cepa que presenta el mayor diámetro es A3N perteneciente al género *Polyangium*, con un diámetro de aproximadamente 11.8 mm. Las cepas A3' y gama a-1 del género *Sorangium* son las que presentan el menor diámetro, lo que nos hace suponer que las citofagas presentan una mayor actividad enzimática que las mixobacterias tal y como se indica en la literatura (Pei-Bin-Hou., 2004).

No es posible comparar el diámetro de las bacterias con el diámetro de hidrólisis generado por la enzima del hongo, debido a las condiciones en cada uno de los casos (enzima/bacteria), además la cantidad de enzima es mucho mayor que la que se tiene con el microorganismo. Sin embargo, nos puede dar una idea de la actividad presente en las bacterias.

5. 8 Determinación de las condiciones de crecimiento para la producción de enzimas.

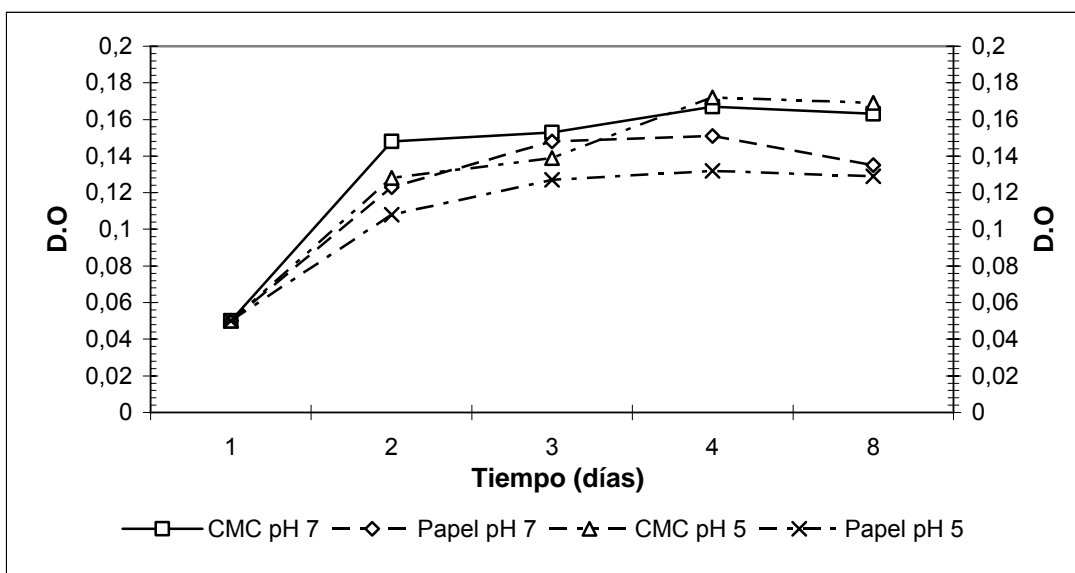
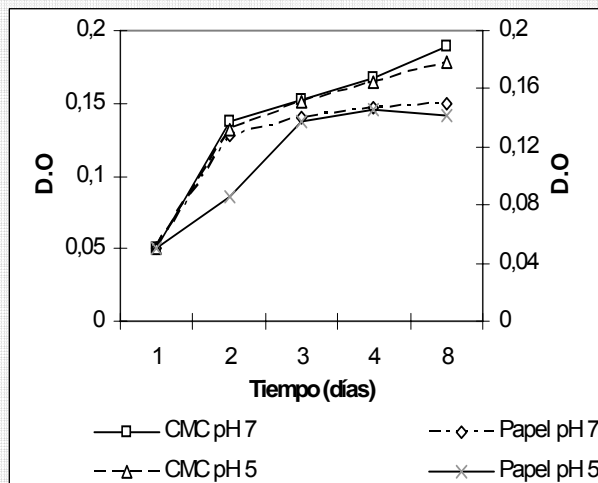


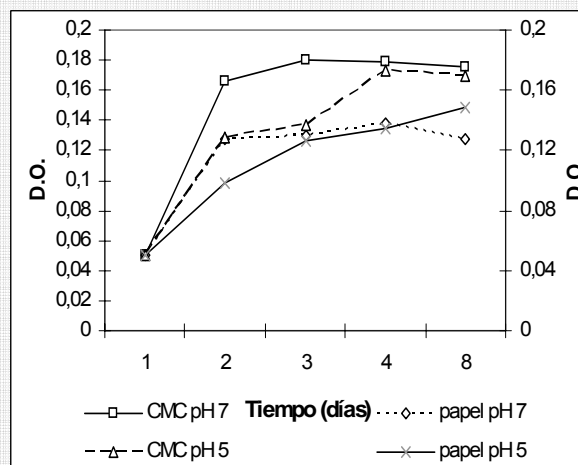
Figura 22. Curva de crecimiento de la cepa A1gde *Cytophagaceae* en dos diferentes fuentes de carbono a pH 5 y 7

En la figura 22 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa A1gde *Cytophagaceae* en pH 5 y 7, con las dos fuentes de carbono. Podemos observar que el crecimiento se ve ligeramente más favorecido cuando el pH es 7 y la fuente de carbono es carboximetil celulosa.

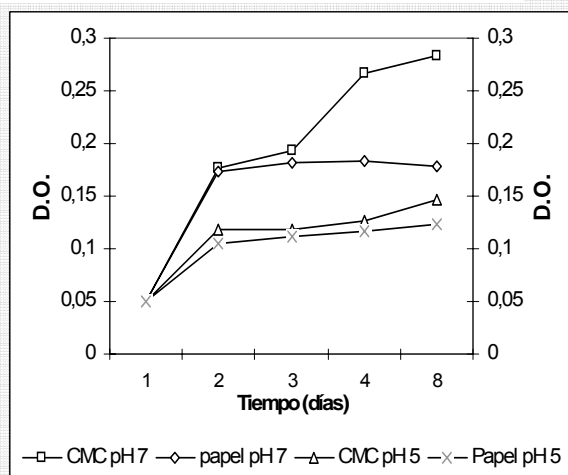
También se puede observar que a pH 5 con carboximetil celulosa hay un buen crecimiento, lo que nos indica la importancia que tiene la fuente de carbono para el desarrollo de la cepa. Sin embargo, cuando la fuente de carbono es papel estroza y pH 5, el crecimiento se ve disminuido notablemente. Esto no es sorprendente puesto que en el papel estroza la forma de las cadenas de celulosa son mucho más estrechas (también llamada celulosa nativa) mientras que en el caso del derivado de celulosa (carboximetil celulosa), las cadenas de celulosa se encuentran ligeramente hidrolizadas y mucho más disponibles para el ataque enzimático del microorganismo.



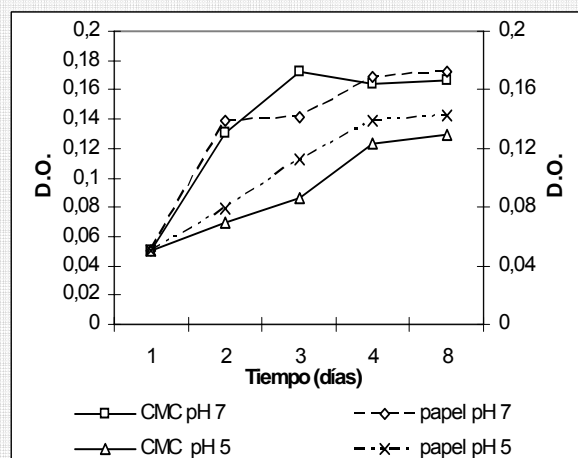
Gráfica a) Curva de crecimiento de la cepa A3' *Sorangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica b) Curva de crecimiento de la cepa A3N *Polyangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica c) Curva de crecimiento de la cepa A1' *Cytophagaceae* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica d) Curva de crecimiento de la cepa gama a-1 *Sorangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7

Figura 23 Curvas de crecimiento de las cepas aisladas en diferentes fuentes de carbono y diferentes pH sin la presencia de un promotor del crecimiento.

En la figura 23 se muestran las gráficas de las curvas de crecimiento de cada cepa. La grafica 23-A, corresponde a la cepa A3' (mixobacteria), en la cual se puede observar claramente que el mayor crecimiento estaba dado cuando la fuente de carbono fue carboximetil celulosa, independientemente del pH. Cuando la fuente de carbono fue papel estraza el crecimiento se veía reducido

considerablemente, sin importar mucho el pH, por lo que se puede inferir que el factor más importante para el desarrollo del microorganismos es la fuente de carbono. La gráfica 23-b corresponde a la cepa A3N (mixobacteria), se observó el efecto del pH sobre el crecimiento, debido a que se pudo constatar un mayor crecimiento cuando el pH era de 7 y la fuente de carbono la carboximetil celulosa. Cuando el pH fue de 5 con la misma fuente de carbono, el crecimiento se vio ligeramente afectado. En la gráfica 23-C, se muestran las curvas de crecimiento de la cepa A1' (citofaga). En ellas se observó claramente el efecto del pH y la fuente de carbono sobre el crecimiento del microorganismo, en este caso la cepa A1' se vió claramente favorecida cuando el pH del medio es 7 y la fuente de carbono es la carboximetil celulosa. En la gráfica 23-D se muestran las curvas correspondientes a la cepa gama a-1 (mixobacteria), en donde a pH 7 se favoreció el crecimiento del microorganismo sin importar mucho la fuente de carbono. Se observó que cuando el pH es 7, el microorganismo es capaz de crecer en las dos fuentes de carbono (papel estraza y carboximetil celulosa), mientras que a pH 5 el crecimiento es mucho menor.

De lo anterior se podría inferir que la mejor fuente de carbono para las bacterias es la carboximetil celulosa a pH 7. Sin embargo, se puede observar en cada uno de las gráficos que el crecimiento de cada uno de los microorganismos no es muy elevado, considerando que durante la elaboración de las curvas de crecimiento en medio CY la turbidez alcanzada era mucho mayor en tan solo 12 horas de incubación, y lo que se pretende es que el microorganismo sea capaz de crecer en celulosa como única fuente de carbono con la finalidad de favorecer la producción

de enzimas. Fue por ello que se decidió adicionar a cada medio un promotor del crecimiento (extracto de levadura, EY) al 0.01%, debido a que contiene vitaminas, amino ácidos esenciales, entre otros compuestos que ayudan al microorganismo a su crecimiento.

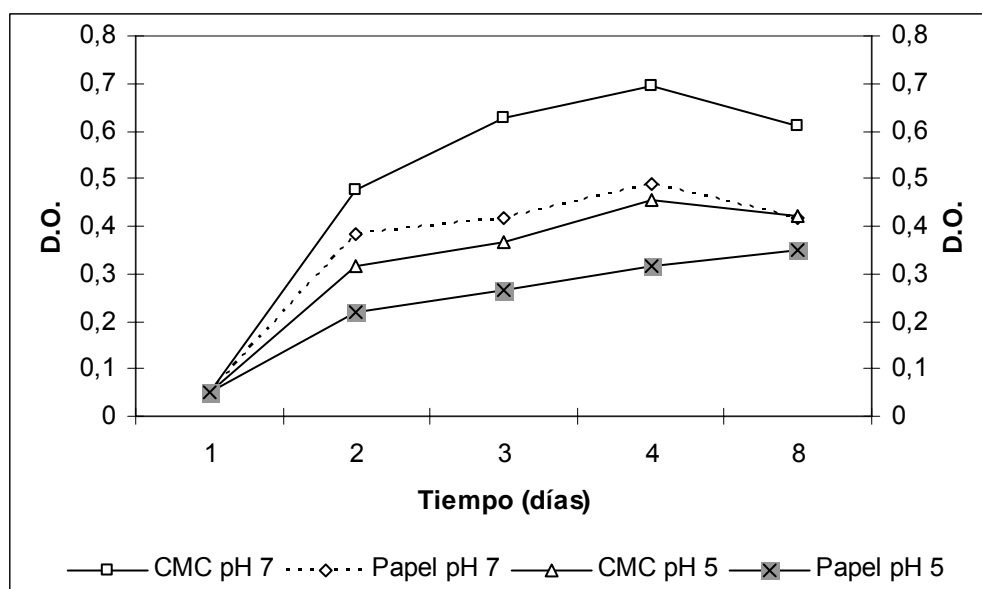
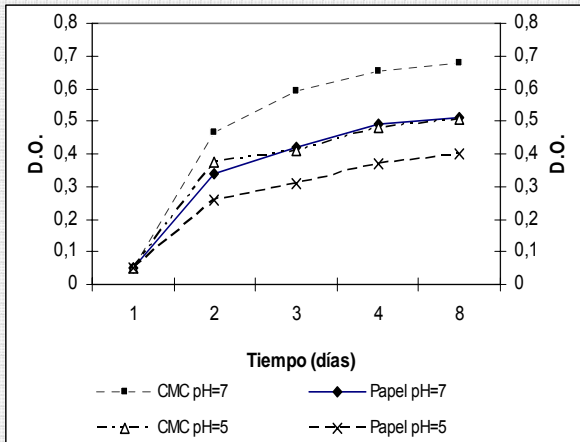
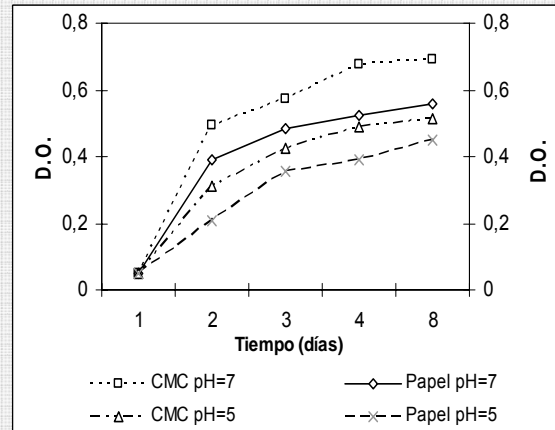


Figura 24 Comportamiento en el crecimiento de A1 de con diferentes fuentes de carbono y diferentes pH, con la presencia de un promotor de crecimiento (extracto de levadura).

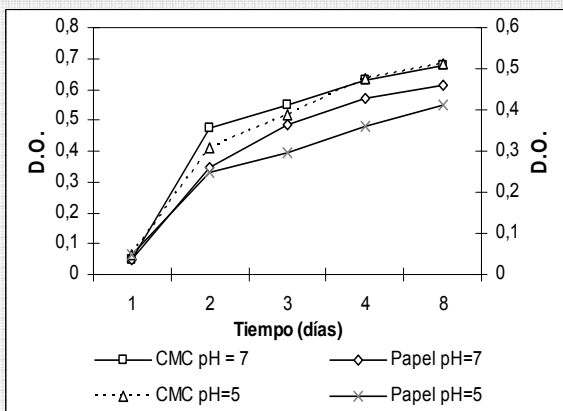
En la figura 24 se muestra las curvas de crecimiento de la cepa A1gde, *Cytophagaceae*, con el promotor de crecimiento (EY) presente en el medio de cultivo. Como era de esperarse el crecimiento se vió favorecido, sobre todo cuando la fuente de carbono fue la carboximetil celulosa a pH 7. Sin embargo, a pH 5 con papel estraza el crecimiento sigue siendo mucho menor, no hay un incremento considerable en el crecimiento con la adición del EY, lo que nos indicaba que a pesar de la adición del promotor de crecimiento, para el microorganismo es más difícil desarrollarse utilizando como fuente de carbono el papel estraza.



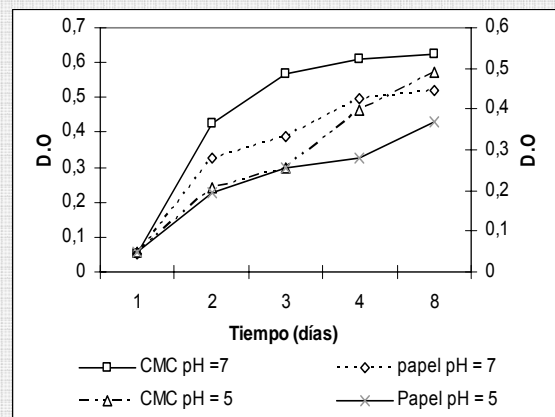
Gráfica a) Curva de crecimiento de la cepa A3' *Sorangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica b) Curva de crecimiento de la cepa A3N *Polyangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica c) Curva de crecimiento de la cepa A1' *Cytophagaceae* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7



Gráfica d) Curva de crecimiento de la cepa gama a-1 *Sorangium* con diferentes fuentes de carbono en pH 5 y 7

Figura 25. Curvas de crecimiento de cada cepa en diferentes fuentes de carbono y diferentes pH, cuando existe la presencia de un promotor del crecimiento (extracto de levadura), se puede observar que se sigue manteniendo el mejor crecimiento cuando la fuente de carbono esta dada por la carboximetil celulosa a pH 7.

En la figura 25 se muestran las gráficas de crecimiento de cada microorganismo con extracto de levadura presente en el medio. La gráfica 25-A corresponde a la cepa A3' (Mixobacteria) y en la cual se observó claramente que las condiciones que favorecerían el crecimiento de la bacteria eran cuando el pH es 7 y la fuente de carbono estaba dada por la carboximetil celulosa. En la gráfica 25-B correspondiente a la cepa A3N (Mixobacteria), se observó prácticamente el mismo

comportamiento que en la cepa A3', el crecimiento se favorece cuando el pH es 7 y la fuente de carbono esta dada por la carboximetil celulosa. La gráfica 25-C correspondiente a la cepa A1' (*Cytophagaceae*), mostró un comportamiento diferente. En primer lugar, el crecimiento se vió favorecido por la presencia del extracto de levadura (EY); sin embargo, el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono y pH es prácticamente igual. Se puede observar un ligero incremento en presencia de carboximetil celulosa a pH 7, pero aun así es interesante ver que el comportamiento es prácticamente el mismo. En la gráfica 25-D se observan las curvas de crecimiento de la cepa gama a-1 (Mixobacteria), la cual también se observó que el crecimiento se favoreció con la presencia del EY, a pH 7 y como fuente de carbono la carboximetil celulosa.

En todos los casos la presencia del extracto de levadura favoreció el crecimiento de los microorganismos, y con ello se esperaba mayor producción de enzima. Además, se mantuvo la tendencia a un mejor crecimiento cuando la fuente de carbono era carboximetil celulosa en pH 7. Con base en estos resultados se decidió utilizar como medio base para la cuantificación de proteína y actividad enzimática, medio mineral, extracto de levadura y carboximetil celulosa, a pH 7.y una temperatura de incubación de 32°C.

5. 9 Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica.

a) Viscosimetría (actividad endo enzimática)

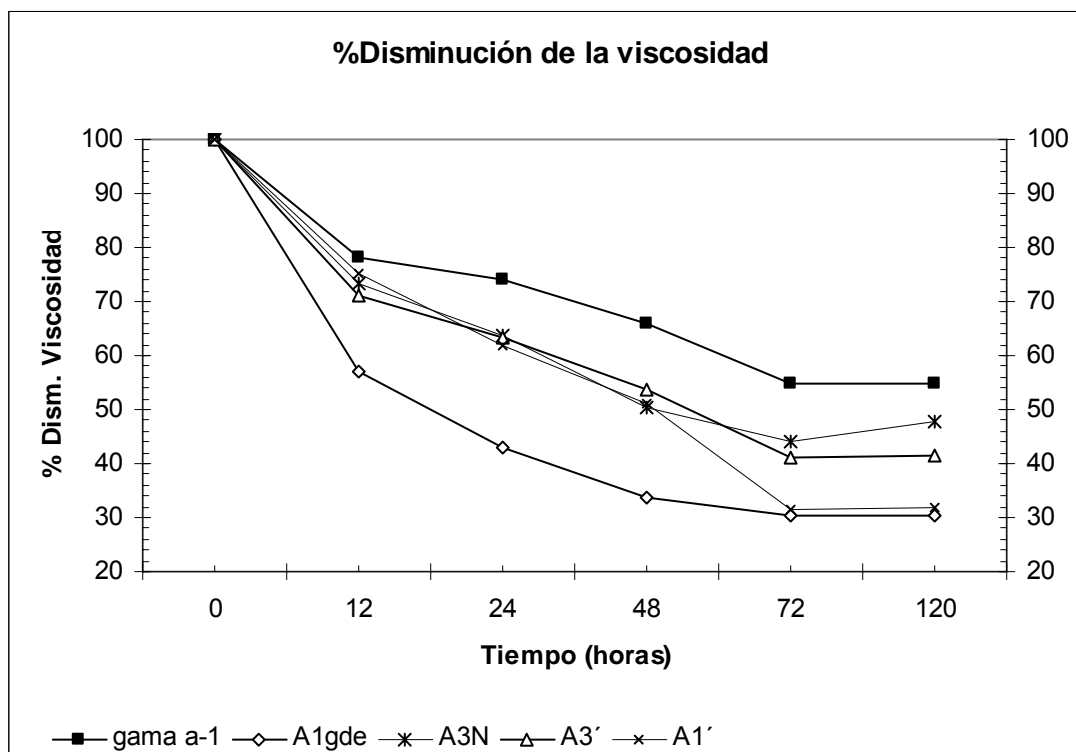


Figura 26. Relación del porcentaje de la caída de la viscosidad de una solución de C.M.C. en función del tiempo de incubación.

En la figura 26 se muestra la caída de la viscosidad conforme pasa el tiempo de incubación. A las 72 horas se alcanza el máximo porcentaje de disminución en la viscosidad. Como se muestra en el gráfico las dos cepas que presentaron mayor actividad es la cepa A1gde, alcanzando un 69.61% en la disminución de la viscosidad y la cepa A1' con un 68.63%, ambas de la familia *Cytophagaceae*. En el caso de las mixobacterias la cepa con mayor actividad es la cepa A3' del género *Sorangium*, reduciendo la viscosidad hasta en un 58.82%; la cepa gama a-1 también del género *Sorangium*, presentó la menor actividad (45.09%), menos

del 50%. En el caso de la industria, se necesita una actividad mayor al 50%, para que sean competitivas con los hongos. Sin embargo, el simple hecho de que las cepas sean capaces de reducir la viscosidad en un tiempo de 72 horas las hace una posible herramienta para uso biotecnológico.

En general estas bacterias son capaces de producir la ruptura de las cadenas de carboximetil celulosa, posiblemente gracias a que producen de manera eficiente la enzima endoglucanasa, que es la encargada de hidrolizar a las cadenas de celulosa junto con la celobiohidrolasa en derivados de celulosa. Es importante resaltar que el medio no contenía promotor de crecimiento (extracto de levadura).

Como segunda parte de este experimento se decidió evaluar la actividad exoenzimática, utilizando únicamente el sobrenadante obtenido del medio de cultivo, a diferentes tiempos de incubación del microorganismo y con ello evaluar la actividad específica.

b) Colorimetría (actividad exo-enzimática)

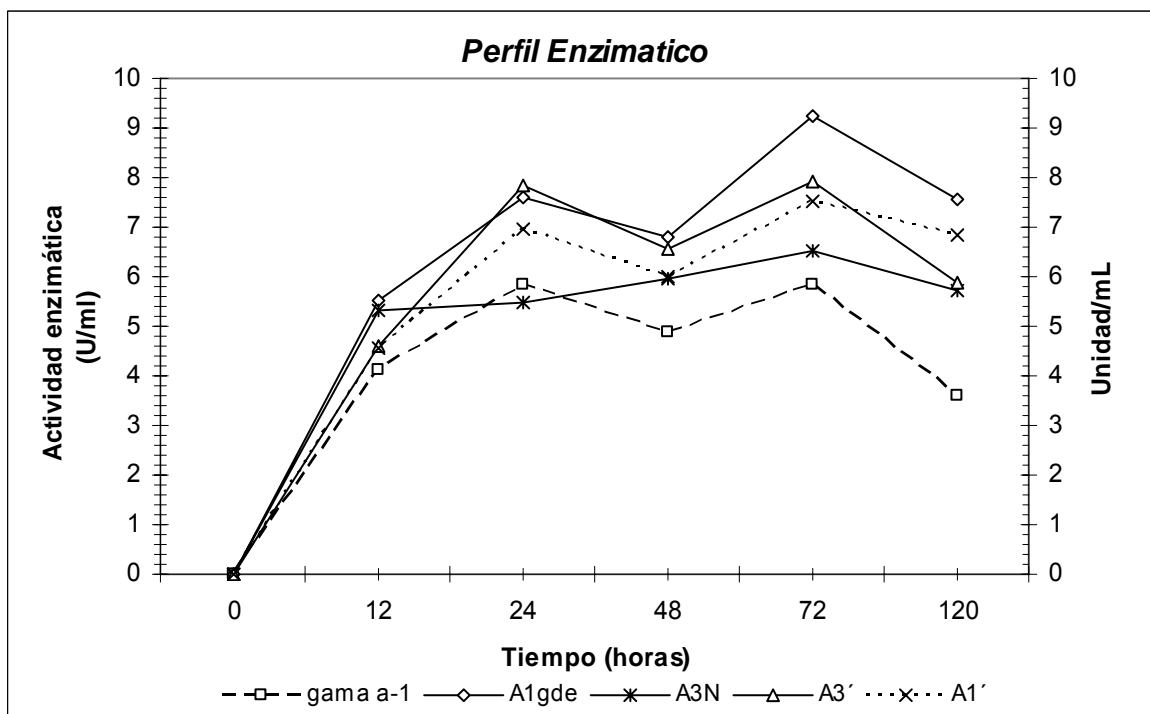


Figura 27. Actividad enzimática presente en el medio de cultivo libre de células a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 27 se muestra las actividades enzimáticas presentes en cada sobrenadante del medio de cultivo de las bacterias. La mayor actividad se observa con el sobrenadante de la cepa A1gde, la cual pertenece a las *Cytophagaceae*, alcanzado una actividad de hasta 9 U/ml, a tan solo 72 horas de incubación (U se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de glucosa en las condiciones establecidas). Después de este tiempo, hay una disminución considerable en la actividad. El sobrenadante de la cepa gama a-1 es el que presentó la menor actividad (5 U/ml), y la cual desde un principio mostró una baja actividad sobre las placas de carboximetil celulosa, en comparación con las demás cepas. Además, se observó que las actividades

disminuyen de manera general a las 24 horas de incubación. Posteriormente aumentan, y vuelve a decaer a las 120 horas de incubación. Este comportamiento se vió desde las curvas de crecimiento en donde también se tenía una disminución en el crecimiento y luego volvía a elevarse, no conociéndose la razón por la cual se comporten de esta manera. Los sobrenadantes obtenidos de las cepas A1' y A3' muestran un comportamiento semejante en la actividad, ambas alcanzan un actividad de aproximadamente 7 U/ml. Sin embargo, A1' corresponde a la familia de *Cytophagaceae* y A3' del género *Sorangium*.

5. 10 Relación entre la actividad enzimática y la concentración de proteína.

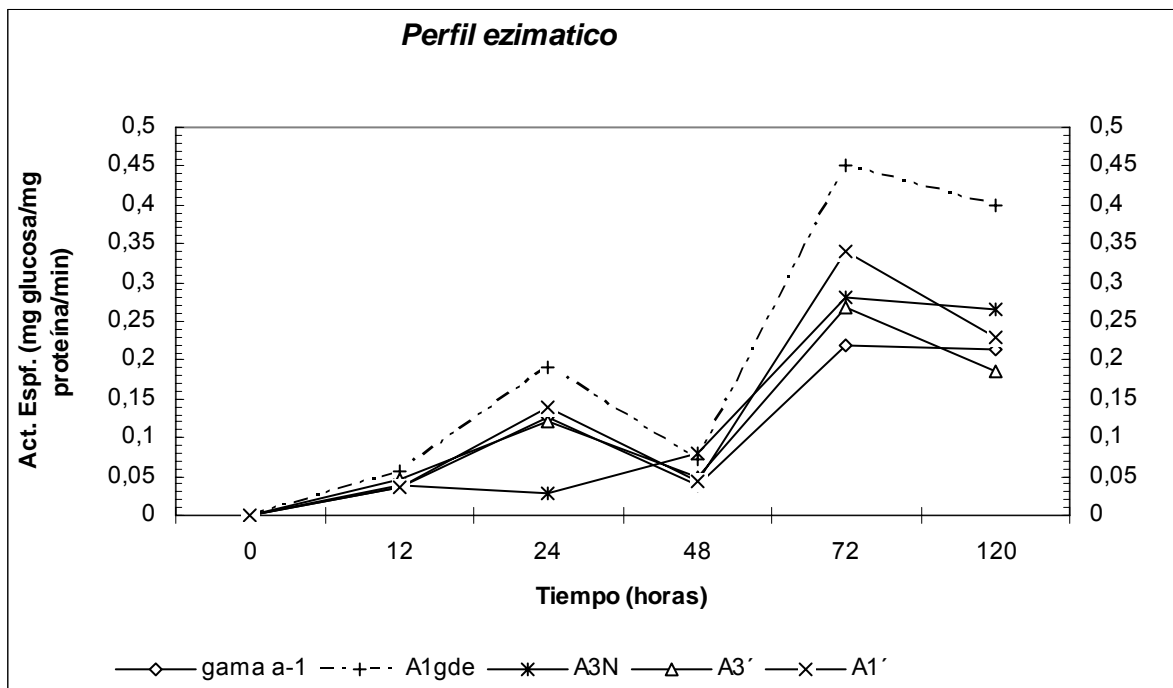


Figura 28. Perfil enzimático en el sobrenadante de las cepas aisladas sobre una solución de carboximetil celulosa, en diferentes tiempos de incubación.

En la figura 28 se muestra el perfil enzimático obtenido en diferentes tiempos de incubación de las cepas, la cepa que presenta menor actividad es gama a-1, las otras cuatro cepas presentan una actividad semejante a las 72 horas de incubación siendo A1gde la que sobresale un poco más. En todos los casos se puede observar como a las 48 horas de incubación la actividad enzimática disminuye notablemente y vuelve a subir a las 72 horas de incubación. Esto se puede deber a que después de 48 horas de incubación las bacterias han logrado hidrolizar la CMC (carboximetil celulosa) a glucosa, inhibiendo la producción de enzimas, una vez que es consumida la glucosa, se vuelven a secretar enzimas.

Tabla 8. Concentración de proteína

Cepas	Conc. Proteína(mg/mL)	Actividad específica (mg glucosa/mg proteína/min.)
gama a-1	0,1155	0.22
A1gde	0,0718	0.45
A3N	0,0769	0.28
A3'	0,063	0.267
A1'	0,0523	0.45

En la tabla 8, se muestra la concentración de proteína que se obtuvo a las 72 horas de incubación, tiempo en el que se observó la mayor actividad enzimática. La cepa gama a-1, quien fue la que presentó una baja actividad fue en la que se detectó una mayor cantidad de proteína, lo que nos indica que esta cepa esta secretando proteínas que no poseen actividad enzimática sobre la carboximetil celulosa. La cepa A1gde es la que presentó la mayor actividad enzimática, lo que nos indica que la proteína posee actividad enzimática de β -glucosidasa e hidrolizar las cadenas la carboximetil celulosa hasta glucosa.

Al comparar los resultados obtenidos con los diferentes métodos y con lo establecido en la literatura, se pudo inferir de la posible actividad endoglucanasa que poseen este tipo de bacterias; siendo el método viscosimétrico un indicativo más sensible y selectivo de la actividad endoglucanasa ya que se ha reportado previamente que esta enzima es la que se encarga principalmente de romper las cadenas de la carboximetil celulosa y de esta forma disminuir la viscosidad. El obtener resultados positivos en la cuantificación de glucosa, hace sospechar de la

presencia de la β -glucosidasa, la cual se encarga de hidrolizar a la celobiosa a glucosa.

Se ha reportado que la mayoría de las bacterias poseen estas dos enzimas (endoglucanasa y β -glucosidasa) (Hernández A., 1999), aunque en algunos casos, sólo una de ellas. Sin embargo para poder llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa nativa hasta glucosa es indispensable que el microorganismo cuente con el complejo enzimático (celobiohidrolasa, endoglucanasa y β -glucosidasa).

Durante el desarrollo de esta investigación no se detectó actividad enzimática sobre la celulosa nativa, mediante las pruebas realizadas en las condiciones y tiempos establecidos.

6. C O N C L U S I O N E S

- Se aislaron 15 cepas de tres diferentes suelos; 7 cepas de suelo urbano, 5 cepas de suelo semi-urbano (Chalco) y 3 cepas de suelo semi-urbano (Ajusco).
- Las 5 bacterias celulolíticas con las que se trabajó fueron identificadas como: 2 del género *Sorangium*, 1 del género *Poliyangium*; y 2 cepas pertenecientes a la familia *Cytophagaceae*.
- Se establecieron como condiciones de mejor de crecimiento y cultivo *in vitro* pH 7 y temperatura de 32°C,
- Las 5 cepas presentaron actividad sobre placas de carboximetil celulosa, siendo las cepas identificadas como de la familia *Cytophagaceae*, las que presentaron una mayor actividad en comparación con las mixobacterias.
- No se observó beneficio alguno en la actividad enzimática al adicionar extracto de levadura, el crecimiento aumenta debido a la capacidad proteolítica que poseen estas bacterias.
- De manera general, la máxima capacidad que se observó en las bacterias para disminuir la viscosidad fue dada a las 72 horas de incubación al cansando una disminución mayor al 50%.

- En el caso de la industria se necesita una actividad mayor al 50% en la reducción de la viscosidad para que se considere competitiva una enzima, por lo que estas enzimas pudieran ser aprovechado en la industria alimentaria en la reducción de la viscosidad durante la producción de concentrados de frutas secas y productos vegetales.
- La actividad específica mostró que las bacterias pueden producir mucha proteína extracelular pero solo una pequeña parte de ésta posee actividad celulolítica sobre el sustrato.
- Las bacterias que presentaron mayor actividad exo-enzimática son: A1' y A1gde de la familia *Cytophagaceae*, dentro de las mixobacterias la cepa A3N perteneciente al género *Polyangium* es la que presntó la mayor actividad.

1. Es importante establecer las condiciones óptimas para la enzima, ya que en este proyecto únicamente se establecieron las mejores condiciones de crecimiento para el microorganismo.
2. Encontrar las condiciones óptimas para que las bacterias degraden el papel filtro, puesto que en la literatura se afirma la capacidad que tienen estas bacterias para degradar las fibras de celulosa.
3. Duplicar las concentraciones de trabajo tanto de microorganismo como de sobrenadante.
4. Evaluar la actividad sobre un sustrato complejo (bagazo), ya que en los hongos se ha reportado que la presencia de otros compuestos ayudan a incrementar la producción y actividad de la enzima.
5. Medir disminución de viscosidad sobre concentrados de frutas o verduras y observar el comportamiento de la enzima en estas condiciones.

1. **Algeciras N.** *Desarrollo de un sistema de biofiltración con bacterias proteolíticas y amilolíticas inmovilizadas utilizando subproductos del beneficio de café.* Journal of the Mexican Chemical Society 46:271-276 (2002).
2. **Alvarez A. Ma. Elena.** *Evaluación de residuos de tamarindo como fuente de carbono para la producción de enzimas por cepas de Aspergillus.* Tesis 2005. Facultad de Química.
3. **Bangi A. Kundim.** *Novel antifungal polyene amides from the myxobacterium Cystobacter fuscus: isolation, antifungal activity and absolute structure determination.* Available online at [-www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Tetrahedron 60:10217-10221 (2004).
4. **Bayer A. Edward** *The cellulosomes: Multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides.* Annu. Rev. Microbiol. 58:521-554 (2004).
5. **Biely, P.** *Hemicellulose and hemicellulases,* Ed. Coughlan y Hazlewood (Portland Press Research Monograph, 1993) p. 29.
6. **Bradford, M.M.** *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding.* Analytical Biochem 72: 248-254 (1976).
7. **Breuli C.** *Substrate conditions that influence the assays used for determining the glucosidase activity of cellulolytic microorganisms.* Biotechnology and Bioengineering. 28:1653-1656 (1986).
8. **Bull, C. T.** *Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents.* University of California Davis, U.S. Agricultural Research Station, Salinas. 86:889-896 (2002).
9. **Castillo Mejia.** *Proteínas con afinidad a celulosas: una herramienta en biotecnología.* Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. 21:267-271 (2004).
10. **Carpita C.** *Structure and biogenesis of the cell walls of grasses.* Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 47:445-4476 (1996).
11. **Crespi B. J.** *The evolution of social behaviour in microorganisms.* TRENDS in Ecology & Evolution 16:4 (2001).
12. **Coffey, D.G.,** and Bell, D.A. *Cellulose and Cellulose Derivatives.* En: Alistar M. Stephen. Food polysaccharides and their applications. Marcer Dekker Inc. New York USA 123-153 (1995).

13. **Cosgrove J. D.** *Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants.* Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 13:171-200 (1997).
14. **Cosgrove J. D.** *Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility.* Annu. Rev. Plant. Physiol. 50:391-417 (1999).
15. **Coutts A.** *Factors influencing the production of cellulases by Sporotrichum thermophile.* Applied and Environmental Microbiology 31:819-825 (1976).
16. **De Vries, R.P.** Accessory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation, Tesis de Doctorado. Wageningen Agricultural University. Holanda, 2-29 (1999).
17. **De Vries, R.P.,** and Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(4): 497-522 (2001).
18. **Duckworth M.** *An extracellular agarase from a Cytophaga species.* Biochem. Journal 113-139 (1969).
19. **F. Gaspari, Y. Paltan.** *Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives.* Journal of Applied Microbiology 98:429-439 (2005).
20. **Fernandez R. E.** *Métodos para cuantificación de proteínas.* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales, Córdoba.
21. **Fuller W. H.** and Norman A. G., *Cellulose decomposition by aerobic mesophilic bacteria from soil.* Iowa Agricultural Experimental Station (1943).
22. **Grillione P. L.** *Scanning electron microscopy of fruiting body formation by Mixobacteria.* Journal of Bacteriology 1158-1565 (124) (1975).
23. **Ghose T. K.** *Measurement of cellulase activities.* Pure & Appl. Chem. 59:257-268 (1987).
24. **Hans R.,** Martin Dworkin. *The Prokaryotes, the order myxobacterales,* chapter 20, Vol. 1 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
25. **Hart T. D.** *Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw.* Journal of Microbiology & Biotechnology 18:471-480 (2002).

26. **Hedges A.** *Extracellular enzyme from myxobacter AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities.* Journal of bacteriology 120:844-853 (1974).
27. **Henning J.** *Investigation of cellulase and hemicellulase production in *Penicillium brasilianum* by capillary electrophoresis.* Appl. Microb. and Biotechnology (2002) 59:310-317.
28. **Hernández A.** *Celulosomas: Sistemas multienzimáticos.* Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM. Sociedad Química de México 43:3 137-142 (1999).
29. **Imshenetski and Solntseva.** *On aerobic cellulose-decomposing bacteria.* (In Russian, with English summary.) Izvestiia Akad. Nauk SSSR, Classe Sci. Math. Natl. Ser. Biol., 1115–1172 (1936).
30. **Katz M.** *Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose.* Applied Microbiology. 6:419-420 (1967).
31. **Lawrence J.** *Shimkets Social and developmental biology of mixobacteria.* Microbiological Reviews 473-503 (1990).
32. **Lawrence J. S.** *Intercellular signalling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*.* Annual Review Microbiology 53:525-549 (1999).
33. **Mark J.** *Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces.* Annu. Rev. Microbiol. 55:49-75 (2001).
34. **Mejía C. T.** *Proteínas con afinidad a celulosa, una herramienta en biotecnología.* XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, vol 21, 2000.
35. **Miller, G.** *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.* Anal. Chem. 31:426-428 (1959).
36. **McCurdy, H. D.** *Fruiting gliding bacteria: The Myxobacteria en: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.* Editorial Williams & Wilkins, 9^{na} edición (1994).
37. **Ovando, SL.** *Preparativos de celulosa comerciales y aplicaciones en procesos extractivos.* Unidad y Ciencia. Instituto Tecnológico de Veracruz 21(42): 113-122 (2005).
38. **Olvera T.** *Identificación de una bacteria celulolítica y producción de sus celulasas.* Tesis de Maestría. Facultad de Química (1990).

39. **Olvera T.** *An endoglucanase from an isolated strain of Bacillus circulans.* Applied Microbiology and Biotechnology. 146-149 (1989).
40. **Pei-Bin-Hou** *Cellulolytic complex exists in cellulolytic Myxobacterium Sorangium.* Enzyme and Microbial Technology 38:273-278 (2004).
41. **Poutanen K.** *Enzymes: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods.* Trends in food science & technology. 8:300-306 (1997)
42. **Prat L.** *Microbial Multicellularity. Many species of bacteria live in a social, coordinated fashion, and they'll even die to keep it that way.* The Scientist 17, 23:20 (2003).
43. **Ramírez P.** *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica.* Rev. Perú Biol. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM 10:67-77 (2003).
44. **Reichenbach H.** The mixobacterias. In: The prokaryotes, 2^{ad} edición, vol. IV. Springer Verlag, New York. 3416-3487(1990).
45. **Reichenbach H.** *Myxobacteria, producers of novel bioactive substances.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 27:149-156 (2001).
46. **Reese E.** *Estimation of exo-β-1-4 glucanasa in crude cellulose solutions.* Advances in Chemistry Series 26-33 (1969).
47. **Ruijsenaars H. J., S. Hartmans** *Plate screening methods for the detection of polysaccharase-producing microorganisms.* Applied Microbiology Biotechnology 55:143-149 (2001).
48. **Saxena I.M.** *Structure and function characterization of cellulose synthase.* Phytochemistry 57:1135-1148 (2001).
49. **Schwarz W. S.** *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria.* Applied Microbiology Biotechnology 56:634-649 (2001).
50. **Schurmann C.** *Growth of Myxococci in suspension in liquid media.* Applied Microbiology 15:971-974 (1967).
51. **Selman A. W. and Cornelio C.** *The use of the silica gel plate for demonstrating the occurrence and abundance of cellulose-decomposing bacteria.* Journal of Bacteriology, 12:87-95 (1925).

52. **Stephen R.** *Automated filter paper assay for determination of cellulase activity.* Applied Biochemistry and Biotechnology 107:689-703 (2003).
53. **Stanier R.Y.** Roger, Adelberg A. *Studies on the Cytophagas.* Hopkins Marine station (1940).
54. **Somerville C.** *Cellulose synthesis in higher plants.* Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 22:53-78 (2006).
55. **Suzuki Y.** *Production of extracellular α -glucosidase by a Thermophilic Bacillus species.* Applied and Environmental Microbiology. 31:807-812 (1967).
56. **Vladimir-Puchart.** *Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus.* Enzyme and Microbial Technology 24:355-361(1999).
57. **Voet Donald & Voet J.** *Bioquímica.* Ediciones Omega. Barcelona. España (1990).
58. **Warren. R. A.** *Microbial hydrolysis of polysaccharides.* Annu. Rev. Microbiol. 50:183-212 (1996).
59. **Wolfgang D.** *Biology and global distribution of myxobacteria in soil.* FEMS Microbiology Rev. 403-427 (2000).
60. **Wood T.** *Methods for measuring cellulase activities.* Methods in enzymology 160:87-112 (1988).
61. **Zhang Percival.** Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances 24:452-481 (2006).

9. ANEXO

Composición de los medios de cultivos empleados

Solución de elementos traza

Para preparar un litro de solución de sales minerales se disolvieron en agua destilada, las siguientes sales.

Micronutrientes	pesar (gr)	Aforo (ml)	Concentración
H ₃ BO ₄	2,86	100	0,0286
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,181	100	0,00181
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	100	0,00222
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,191	100	0,00191
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	100	0,00079
Co(NO ₃) ·2 H ₂ O	0,0494	100	0,000494

Macronutrientes	pesar (gr)	Aforo (ml)	Concentración
NH ₄ SO ₄	20	100	0,2
K ₂ HPO ₄	3,9	100	0,039
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5	100	0,075
Na ₂ CO ₃	2	100	0,02
EDTA	0,1	100	0,001
Citrato de sodio	0,6	100	0,006
FeSO ₄	0,3	100	0,003

Nota: Las soluciones no se esterilizan debido a que las sales precipitan, por lo que se deben de preparar en condiciones de esterilidad y con agua ya estéril.

Medio para aislamiento

1.2.1 Silica Gel	} Solución A	Silicato de sodio.....18ml	} Solución B
HCl conc.....61ml		H ₂ O destilada.....82ml	
H ₂ O (destilada).....39ml			

HCl de presentación comercial = 96-97%
Silicato de Sodio (Droguería Cosmopolita 40%)

Preparación

Mezclar volúmenes iguales de la mezcla A y B.

Se vacía en cajas de petri, se espera a que solidifiquen y posteriormente se dejan reposar con agua de la llave para que se elimine el exceso de HCl.

Impregnación del gel para neutralización del pH de la silica

- Solución salina de Winogradski ... 100ml
- Carbonato de calcio20g

Se dejan reposar las cajas en la solución de bicarbonato hasta neutralizar el pH ácido generado por el HCl.

En este caso se utiliza papel filtro como fuente de carbono. Papel filtro (Whatman No. 4) en círculos.

Agar VY/2 para mantenimiento y aislamiento de mixobacterias

Composición por litro

- Agar bacteriológico.....15 g
- Levadura seca..... 5 g
- CaCl₂ * 2H₂O..... 1 g

pH = 7.2 ± 0.2 a 25°C, se esteriliza a 120°C por 15 min

Agar CY

- Peptona de caseína.....3 g
- Extracto de levadura.....1 g
- CaCl₂ * 2H₂O..... 1 g
- Agar bacteriológico.....15 g

pH ajustado a 7.2 y se esteriliza a 120°C por 15 min.

Medio de cultivo Agar Stan 4

Composición por litro

Solución A 350mL

Solución B 650mL

Solución A

Composición por 350mL

CaCl_a* 2H₂O.....1.0 gKNO₃.....1.0 gMgSO₄*7H₂O.....1.0g

Solución de elementos traza 1.0 mL

Solución B

Composición por 650mL

Agar..... 10.0 g

K₂HPO₄.....1.0g**Buffer de fosfatos**

pH	Vol (ml) Na ₂ HPO ₄ , 1M	Vol (ml) NaH ₂ PO ₄ , 1M
5,8	7,9	92,1
6	12	88
6,6	35,2	64,8
7	57,7	42,3
7,6	84,5	15,5

Mezclar los volúmenes indicados para tener una solución stock 1M; diluir con agua destilada a 1000mL para preparar una solución 0.1M.

PREPARACIÓN DE DNS

Pesar 1 g de NaOH y disolver en 20mL de agua, agitando constantemente. Aparte, pesar 1g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) y adicionarle poco a poco y con agitación constante agua destilada para ir disolviendo el DNS, tener cuidado de no adicionar más de 40mL. Ya disuelto, agregarlo a la solución de NaOH, seguir agitando (la solución pasa de un color amarillo a uno naranja), adicionar 0.2g de fenol, 0.05g de metasulfito de sodio, 10g de sal Roche (tartrato de sodio y potasio). Ya disueltos todos los reactivos, aforar a 100mL con agua destilada. Mantener en un frasco ámbar.

Nota.

*Disolver en orden cada uno de los reactivos

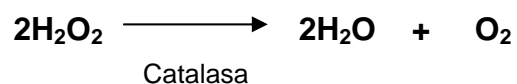
*Agregar uno a uno hasta que se disuelva perfectamente y después se adiciona el siguiente

Reactivo de Bradford

Reactivo preparado del siguiente modo: mezclar 10mg de Comassie Blue G-250 con 10 mL de fosfórico al 88% y 4.7 mL de etanol absoluto. Añadir H₂O hasta 100 mL. Filtrar a través de papel filtro y guardar en la oscuridad.

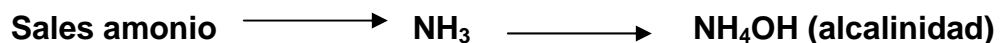
Pruebas Bioquímicas

- a) **Prueba de Catalasa**; se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas que contienen citocromo. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono.



En una caja petri con agar nutritivo, se siembra por estría recta el microorganismo, se invierten las casa e incuban a 37 °C durante 24 horas. Se agregan unas gotas de peróxido de hidrógeno (3.0%) sobre el desarrollo microbiano. Una rápida efervescencia indica la producción de oxígeno gaseoso y una prueba positiva.

- b) **Prueba del Citrato**: Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.



Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador del pH.

Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), genera una fuerte gasificación del medio que será aparente por un cambio del indicador (de verde a azul).

Indicador; azul de bromotimol	{	H ⁺ amarillo	Prueba - = colora amarillo
		OH ⁻ azul	Prueba + = color azul

Agar citrato de Simmons

MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.2g/l de agua
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0 g/l
K ₂ HPO ₄	1.0g/l
Citrato de sodio	2.0g/l
Cloruro de sodio	5.0g/l
Agar	15g-20g/l
Azul de bromotimol	0.8 g/l
pH	7.0 ± 0.02

Disolver los ingredientes, agregar en el orden indicado, fundir, distribuir en tubos, esterilizar a 121°C durante 15min. Al término inclinar los tubos y dejar solidificar. El medio debe tener un color verde esmeralda.

Caldo básico rojo de fenol, pH 7.4

Peptona	10g/l de agua destilada
Extracto de carne	1g/l
Cloruro de sodio	5g/l
Rojo de fenol	0.018g/l

Disolver los ingredientes en el volumen indicado de agua destilada, distribuir en los tubos, esterilizar a 121°C durante 15min.

Degradación de polímeros (agar, almidón, gelatina pectina y quitina): Las hidrólisis de los polisacáridos son ensayos ampliamente utilizados en la identificación y caracterización de microorganismos.

En condiciones de asepsia, se toma una asada del cultivo fresco (24 horas de incubación), sembrando por estría recta empezando por el borde de la caja que contienen cada uno de los polímeros. Invertir las cajas, incubar a 37°C durante 3 días.

Degradación de almidón: Se cubre la superficie de la caja con solución de lugol, observar la coloración que se produce al reaccionar el almidón del medio con el lugol, las zonas transparentes son indicativos de la degradación del polisacárido.

Degradación de gelatina: Después del tiempo de incubación se cubre la superficie de la placa con la solución saturada de sulfato de amonio, dejando actuar durante 30min. Tratar de identificar las zonas transparentes alrededor de las colonias bacterianas.

Degradación de pectina: Después del tiempo de incubación las cajas son tratadas con una solución del colorante rojo de rutenio (1g/l) durante 30min. Se enjuagan con agua destilada y se identifican las zonas transparentes alrededor de las colonias bacterianas.