

Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas

H. RODRÍGUEZ, A. ENRÍQUEZ Y W. FERNÁNDEZ

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 20 de mayo de 1980

Recibido: 25 de mayo de 1981

ABSTRACT. The isolation 7 strains of cellulolytic bacteria from samples of soil and cane stalks was carried out. A procedure of successive inoculations was carried out to the best of the strains, together with the slant conservation of the populations obtained in this way using sugarcane bagasse as substrate. This method was successful in getting a substantial improvement in the biomass production of the strain. Thus, the possibility of its generalized use is recommended. The strain after this procedure seen as stable and compares well with the strain used up-to-date in the studies of direct growth, in base of the results obtained in the experiments at shaker level.

RESUMEN. Se realizó el aislamiento de 7 cepas de bacterias celulolíticas a partir de muestras de suelo y tallos de caña. La mejor de estas cepas se sometió a un procedimiento de inoculaciones sucesivas, utilizando bagazo de caña pretratado como sustrato, junto con la conservación en cuñas de las poblaciones así obtenidas en cada estadio. El método resultó exitoso en el logro de un mejoramiento sustancial en la producción de biomasa de la cepa recomendándose la generalización de su empleo. La cepa después del procedimiento resulta estable y se compara bien con la cepa empleada hasta el momento en los estudios de crecimiento directo (cepa IIbc), en base a los resultados alcanzados a nivel de zaranda.

INTRODUCCION

La proteína unicelular es una vía prometedora para la obtención de proteínas a partir de fuentes no convencionales, con vista a aliviar las necesidades mundiales de proteínas.

El crecimiento directo de bacterias celulolíticas sobre desechos celulósicos plantea una alternativa alentadora como fuente de proteína unicelular (*Dunlap, 1969; Callihan y cols., 1975; Herrera, 1975; Srinivassan y cols., 1977 y Enríquez, 1978*).

Para el desarrollo y aplicación de este proceso, es importante ir a la búsqueda de nuevas cepas de bacterias celulolíticas capaces de crecer en estos materiales con mejores resultados que los existentes hasta el momento. Para ello es importante asegurar la imposición de condiciones selectivas rigurosas en el proceso de aislamiento de la nueva cepa.

Diferentes métodos han sido empleados en el aislamiento de bacterias celulolíticas (*Riviere, 1961; Charpenter, 1968*). Han y Srinivassan (*1968*) han descrito un método que resulta efectivo en el aislamiento de estos microorganismos a partir de desechos de tallos de caña, obteniendo una cepa con buenos resultados en su crecimiento sobre desechos de la industria azucarera (*Han y cols., 1971*).

Los objetivos del presente trabajo han sido el aislamiento de una nueva cepa de bacterias celulolíticas con buenas características en su crecimiento sobre bagazo de caña pre-tratado, así como la aplicación de un método simple de selección para el mejoramiento de la cepa aislada.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento

El método de aislamiento se basó en el procedimiento descrito por Han y Srinivassan (*1968*), con algunas modificaciones.

El medio de aislamiento presentó la composición siguiente:

Solución de sales minerales conteniendo NaCl, 6.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; CaCl_2 , 0.1 g y litro de agua destilada.

Esta fue suplementada con extracto de levadura 0.1% y una tira de papel de filtro.

Los cultivos en placas fueron realizados en los medios siguientes:

Agar bagazo: 8 g de bagazo de caña pre-tratado alcalinamente según Dunlap (*1969*); agua destilada, 900 ml; agar Oxoid No. 1, 15 g; (se esteriliza junto). A esto se le añaden 100 ml de M9 $\times$ 10 (solución de sales M9 10 veces concentrada) y 10 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 2.5%, estériles, suplementándose optativamente con 0.1 ml de tiamina al 1%.

Agar-CMC: Solución de Carboximetilcelulosa (CMC) al 1%, 500 ml; H_2O destilada, 400 ml; Agar Oxoid No. 1, 15 g; a esto se le añaden 100 ml de

M9 $\times$ 10 y 10 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 2.5% estériles, suplementándose optativamente con solución de tiamina al 1%, (0.1 ml).

Solución de sales M9: KH_2PO_4 3 g/l; Na_2HPO_4 , 12 H_2O , 15 g/l; NH_4Cl , 1 g/l; NaCl , 0.5 g/l.

Se siguió el proceso de aislamiento y enriquecimiento en el medio líquido con papel de filtro, y al final del mismo, el cultivo fue sembrado en placas de agar-bagazo y agar-CMC con y sin tiamina. Colonias representativas de tipos diferentes de acuerdo a su morfología fueron tomadas de las distintas placas y sometidas al proceso de purificación.

Purificación

Las colonias representativas fueron sometidas a purificación por el método de dilución terminal, utilizándose igualmente medios de agar-CMC y agar-bagazo con y sin tiamina para la siembra en placas. La pureza de los cultivos aislados fue verificada por exámenes microscópicos y de morfología de las colonias encontradas en las placas.

Conservación y mantenimiento de las cepas. Las cepas así obtenidas fueron pasadas a cuñas de agar-CMC y parafinadas para ser conservadas a 5°C. El mantenimiento del cepario se efectuó paralelamente con pases semanales en cuñas del mismo medio.

Corridas experimentales

Corridas en medio de Srinivassan. Con vista a probar el comportamiento de todas las cepas obtenidas sobre bagazo de caña pre-tratado como sustrato, se inoculó el crecimiento bacteriano de 2 cuñas de agar-CMC de 72 horas en 80 ml de medio de Srinivassan con 0,8 g de bagazo en erlenmeyers de 500 ml de capacidad, modificados con la adición de un tubo nefelométrico. Los cultivos se incubaron a 30°C en una zaranda recíprocamente. El crecimiento fue seguido turbidimétricamente, midiendo la densidad óptica del cultivo después de un tiempo de 10 minutos para la sedimentación de las partículas de bagazo en el tubo nefelométrico.

Para chequear las posibles contaminaciones se realizaron siembras en placas de agar-CMC al inicio y al final de cada corrida.

Determinación de bagazo y biomasa seca. Al final de cada experimento, los cultivos fueron filtrados al vacío a través de una frita porosa No. 1, centrifugados a $26000 \times g$ · 15 minutos a 2°C , lavados dos veces con agua destilada y secados a 90°C durante 48 horas, determinándose el peso seco de la biomasa producida.

El bagazo retenido en la frita porosa se llevó a peso constante en una estufa a 90°C , calculándose el peso del bagazo residual. Igualmente se calculó el % de humedad del bagazo inicial.

Procedimiento de inoculaciones sucesivas. A partir de la cepa de mejor comportamiento entre las aisladas (cepa G) se realizó un procedimiento para tratar de obtener una mejor variante de la misma.

Se realizó una corrida experimental en zaranda en medio de Srinivassan con bagazo como fuente de carbono y energía, al final de la cual se tomaron 2 ml del cultivo para inocular en el medio fresco de la siguiente corrida. Este procedimiento fue repetido sucesivamente en tres ocasiones, llamándosele a cada etapa primera, segunda y tercera etapa de selección, y a la cepa finalmente obtenida "Gi_{III}".

Una vez finalizado este proceso se realizaron siembras en placas de agar-CMC, pasándose a cuñas del mismo medio, donde fue conservada la cepa (cada uno de los estadios intermedios fueron conservados de la misma manera). A partir de estas cuñas se realizaron corridas en zaranda para determinar el comportamiento de la cepa tras el proceso de selección sufrido.

Comparación con la cepa IIbc

Con vista a comparar el comportamiento de la cepa finalmente obtenida (Gi_{III}) con la cepa empleada hasta el momento en nuestros laboratorios en los estudios de crecimiento directo (IIbc) se realizaron corridas experimentales en zaranda de ambas cepas paralelamente, en medio de Srinivassan con bagazo como fuente de carbono y energía.

RESULTADOS Y DISCUSION

Corridas experimentales

El método de aislamiento y purificación empleado resultó efectivo en la obtención de 7 cepas con habilidad para degradar la celulosa.

En el proceso de aislamiento se introdujo la modificación de emplear "agar-bagazo" en lugar de agar nutriente (según el método original) por considerarlo más apropiado en el aislamiento de este tipo de microorganismo.

A su vez, estas placas y las de agar-CMC se utilizaron indistintamente con y sin tiamina, para dar posibilidad al aislamiento de bacterias tanto prototróficas como auxotróficas.

Los resultados obtenidos en las corridas de las 7 cepas en medio de Srinivassan se muestran en la Tabla I. En ella podemos observar los valores de las constantes de velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\max}$), correspondiente en algunos de los casos con dos fases en el crecimiento sobre bagazo o crecimiento diáuxico (μ_1 y μ_2). (Enríquez, 1978), así como los tiempos de generación, calculados por regresión lineal.

TABLA I

Corridas experimentales en medio de Srinivassan para cepas aisladas

Cepa	D.O. Máxima	Bio- masa g/l	Velocidades de crecimiento (h ⁻¹)		Tiempo de Gene- ración (h)		Rendi- mientos		% de Bagazo Resi- dual
			μ_1	μ_2	g ¹	g ²	(1)	(2)	
A	0,39	0,40	0,118	*	6,64	—	0,049	0,404	90,63
B	0,44	0,43	0,093	0,043	7,45	16,11	0,046	0,310	83,54
C	0,45	0,40	0,111	0,015	5,77	46,83	0,043	0,576	93,60
D _i	0,35	0,27	0,044	*	17,05	—	0,028	0,421	92,45
D _{ii}	0,37	0,29	0,127	*	5,51	—	0,020	0,369	89,75
D _d	0,43	0,37	0,100	*	6,95	—	0,038	0,364	89,38
H	0,33	0,37	0,202	*	3,76	—	0,039	0,459	88,74
G	0,76	0,93	0,115	0,085	6,67	8,12	0,127	0,397	69,30
I	0,37	0,39	0,362	*	19,19	—	0,033	—	89,10

(1) g biomasa/g bagazo inicial

(2) g biomasa/g bagazo metabolizado

* No se detecta

Como puede apreciarse, la mayoría de las cepas tuvieron tiempos de generación relativamente cortos, pero que no se corresponden con un buen crecimiento, ya que los cultivos se estacionan rápidamente, por lo que sus rendimientos resultan muy bajos. Esto puede deberse a que estas cepas utilicen solamente la fracción más fácilmente degradable del bagazo, es decir, las hemicelulosas y quizás la celulosa amorfa, sin que exista un ataque posterior a la estructura cristalina de la celulosa del bagazo, posiblemente por carecer del componente necesario de las celulosas, probablemente una β -1,4 exoglucanasa (Pettersson, 1957).

La cepa G se aparta de este análisis, ya que alcanzó concentraciones de 0.93 g/l con un rendimiento de 0.15 g biomasa/g bagazo inicial, comportándose mucho mejor que el resto de las cepas, por lo que fue seleccionada para ser sometida al proceso de inoculaciones sucesivas ya descrito.

Las colonias de esta cepa producidas en medio de agar-CMC se muestran en la Fig. 1.

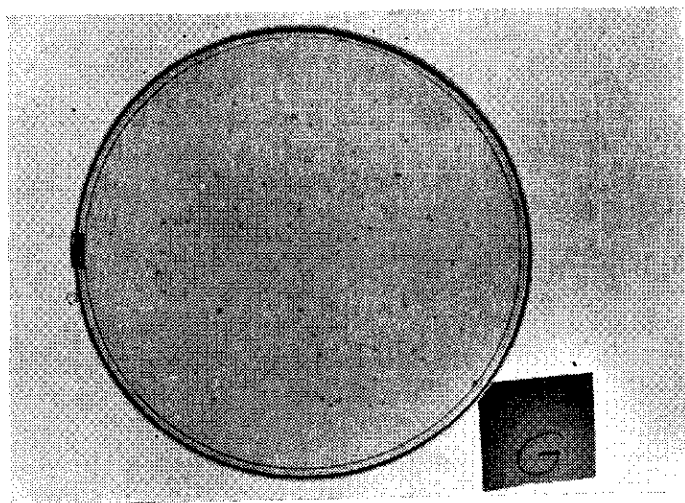


Fig. 1. Colonias de la cepa G sobre medio de agar-CMC

Selección de la cepa G_{III}

El proceso para el mejoramiento de la cepa G por inoculaciones sucesivas fue desarrollado basándonos en las consideraciones siguientes:

Al final del crecimiento de un microorganismo al que se le han impuesto condiciones selectivas rigurosas (bagazo como única fuente de carbono y energía), deben predominar en el cultivo las células con mayor actividad celulolítica, que han sido capaces de atacar las fracciones más cristalinas del bagazo y permanecer viables al final del crecimiento. Si en este momento se toma un inóculo, que está enriquecido con estas células vigorosas y de mayor actividad celulolítica, y se transfiere a medio fresco en forma sucesiva, estaremos enriqueciendo cada vez más estos individuos dentro de la población por un fenómeno de selección natural y artificial, siendo posible así la selección de una cepa que alcance ahora mejores resultados en su ataque al sustrato celulósico.

En la Tabla II se muestran los valores promedios obtenidos para el producto del último estadio del proceso de selección (G_{III}), después de ser corrido varias veces en medio de Srinivassan, comparados con los de la cepa G original.

TABLA II

Valores promedios obtenidos para las cepas G y G_{III} en medio de Srinivassan

Cepa	D.O. Máxima	Biomasa g/l	Rendimientos		Velocidad de Crecimiento (h ⁻¹)	
			(1)	(2)	μ_1	μ_2
G	0,76	0,93	0,127	0,397	0,115	0,085
G _{III}	1,50	1,64	0,173	0,513	0,118	0,031

(1) g biomasa/g bagazo inicial

(2) g biomasa/g bagazo metabolizado

Como puede observarse, la cepa tras el proceso de selección, presenta un comportamiento superior a la cepa originalmente aislada en cuanto a la concentración de biomasa alcanzada, así como a los rendimientos

obtenidos, reafirmado por el análisis estadístico (test de student, 95% de confianza).

De todo esto podemos concluir que estos parámetros han sido mejorados a través del proceso de selección efectuado, con relación a la cepa original.

De la Tabla II podemos observar también que aparece una disminución en la velocidad de crecimiento (segunda etapa) con respecto a la cepa original.

No obstante, la cepa es ahora capaz de un mayor ataque a la estructura de la celulosa, lo que permite alcanzar una mayor producción de biomasa sobre el mismo sustrato. Sin embargo, este fenómeno debe ser objeto de estudios posteriores para elucidar sus causas y coadyuvar así a la búsqueda del microorganismo óptimo a nuestros intereses.

Es importante recalcar que las características alcanzadas por la cepa Gi_{III} se mantienen luego de pases sucesivos a partir de la cuña original después de un año de conservación, y de numerosas corridas experimentales, por lo que es de pensar que las características alcanzadas resultan genéticamente estables.

Por esta misma razón es factible sugerir que el procedimiento empleado pudiera generalizarse como un método sencillo para el mejoramiento de cepas en sistemas similares.

Es necesario señalar el crecimiento diáuxico encontrado tanto en esta cepa como en algunas de las aisladas, fenómeno observado y estudiado en sistemas semejantes por Enríquez y Hernández, (1978) y Enríquez, (1978).

Comparación de la cepa IIbc

Los resultados promedios obtenidos para las cepas Gi_{III} y IIbc en medio de Srinivassan se ilustran en la Tabla III.

El análisis estadístico realizado (Test de Student) arrojó que la cepa Gi_{III} alcanzó una concentración final de biomasa superior a la cepa IIbc, con un 90% de confianza en este medio de cultivo en las condiciones ensayadas, lo cual es un resultado alentador aunque preliminar. Para realizar una evaluación y comparación integral es necesario la continuación de los estudios y la evaluación de otras características de la cepa aislada.

TABLA III

Comparación de los valores promedios para las cepas Gi_{III} y IIbc en medio de Srinivassan

Cepa	D.O. Máxima	Biomasa g/l	Rendimientos		Velocidad de Cre- cimiento (h ⁻¹)	
			(1)	(2)	μ_1	μ_2
Gi _{III}	1,50	1,64	0,157	0,513	0,118	0,031
IIbc	1,28	1,26	0,134	0,482	0,139	0,046

No obstante, estos resultados demuestran la obtención de una cepa con buenas características en su crecimiento sobre bagazo de caña pretratado.

CONCLUSIONES

El método de aislamiento empleado resultó efectivo en la obtención de cepas de bacterias con habilidad para crecer en bagazo de caña pretratado.

El procedimiento de inoculaciones sucesivas del final de una corrida en el inicio de la siguiente, con la conservación en cuñas de las poblaciones obtenidas después de tres etapas sucesivas, resultó exitoso en el logro de un mejoramiento de la cepa originalmente aislada en cuanto a su crecimiento sobre bagazo como fuente de carbono y energía.

La cepa finalmente obtenida mantuvo sus características después de ser cultivada y transferida varias veces, lo que hace pensar en una selección de individuos con mejores características dentro de la población, por las condiciones impuestas en el proceso. Se sugiere, por tanto la utilización de este método en el mejoramiento de cepas en sistemas similares.

La cepa obtenida es comparable con la cepa hasta el momento utilizada en los estudios de crecimiento directo (IIbc), en cuanto a la producción de biomasa, al menos en las condiciones ensayadas.

Se observó el fenómeno del crecimiento diáuxico, anteriormente reportado para otra cepa de bacterias celulolíticas cultivadas en condiciones similares.

RECONOCIMIENTOS

Queremos expresar el reconocimiento al trabajo de las compañeras técnicas Isolina Argüelles y Digna Real del Sol, así como a la disposición de ayuda brindada en todo momento por el Ing. Gerardo Iglesias y demás miembros del Dpto. de Fermentaciones del CENIC.

REFERENCIAS

- CALLIHAN C.D., IRWIN G.H., CLEMMER J.E. AND HARGROVE D.W. Proteins from waste cellulose. *App. Polymer Symp.*, 28, 189, 1975.
- CHARPENTER M. Dégradation de la cellulose dans le sol. Mécanismes enzymatiques. Rapport général. *Ann. Inst. Pasteur* 115, 499, 1968.
- DUNLAP C.E. Proteins from Waste cellulose by chemical microbial processing. Department of Chemical Engineering of the Louisiana State University. Ph. D. Thesis. 1969.
- ENRÍQUEZ A. The obtainment of single cell protein from cellulosic wastes by the fermentation process. Tesis para el grado de Candidato a Doctor en Ciencias. Inst. Microb., Acad. Ciencias Checoslovaquia. Praga, 1978.
- ENRÍQUEZ A. Y HERNÁNDEZ D. Parámetros cinéticos del crecimiento de bacterias celulolíticas en bagazo de caña. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas* 7, 1, 1976.
- HAN W. AND SRINIVASSAN V.R. Isolation and Characterization of a cellulose utilizing bacterium. *Appl. Microb.* 16, 1140, 1968.
- HAN W., DUNLAP C.E. AND CALLIHAN C.D. Single cell protein from cellulosic Wastes. *Food Technology* 25, 130, 1971.
- HERRERA A. La fermentación de los materiales celulósicos de la caña de azúcar. *Rev. Ciencias. Serie 5. Bioquímica Farmacéutica.* No. 13 Marzo, 1975.
- PETTERSSON R.G. The mechanism of enzymatic hydrolisis of cellulose by *Trichoderma viride*. En: *Symp. on Enz. Hyd. of Cellulose.* Aulanko, Finland, 12-14 March., 255, 1975.
- RIVIERE J. Activité cellulolytique des bacteries aerobiques du sol. I. Isolement et purification, *Ann. Agron.* 12, 385, 1961.
- SRINIVASSAN R., FLEENOR M.B. AND SUMMERS R.J. Gradient feed method of growing high cell density cultures of *Cellulomonas* in a benchscale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 153, 1977.