

Cellulolytic enzymes production from isolated fungus from environmental samples of Cuatro Ciénegas, Coahuila

Producción de enzimas celulolíticas a partir de hongos aislados de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Dafne Hebe Ramírez-Lozano¹, Alma Soria-Ortiz², Baltazar Gutiérrez-Rodríguez², Raúl Cuauhtémoc Baptista-Rosas¹, Yolanda Garza-García¹, José Gerardo Gaona-Lozano^{1*}
Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, CP 25280.

*jggaona@uadec.edu.mx

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant polymer in nature and currently is used as a promising energy source. Their biological transformation is made possible by the action of microorganisms able to produce different types of cellulases. The objective of this work focuses on the reactivation of fungal strains isolated from environmental samples of Cuatro Ciénegas, Coahuila and evaluation their cellulolytic activity to determine their potential to degrade cellulose in order to produce these enzymes for biotechnological application. To explore the fungus diversity were realized macroscopic and microscopic studies of 24 strains from the Biotechnology department, the cellulolytic activity of this microorganism was evaluated qualitatively through hydrolysis halo using congo-red and carboxymethylcellulose (CMC) as the substrate, seven fungal strains presented this activity and were selected. The selected strains identification was made by molecular techniques according with the 18S SSU rRNA nucleotidic sequence analysis, resulting the genera *Penicillium*, *Alternaria* and *Phaeosphaeria*.

Keywords: cellulases, Cuatro Ciénegas, fungi.

RESUMEN

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y en la actualidad una fuente de energía promisoría. Su transformación biológica es posible gracias a la acción de microorganismos capaces de producir diferentes tipos de celulasas. El objetivo del presente trabajo se centra en la reactivación de cepas fúngicas aisladas a partir de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila y la evaluación de su actividad celulolítica para determinar su potencial para degradar celulosa con la finalidad de producir estas enzimas para su aplicación Biotecnológica. Para explorar la diversidad fúngica se realizaron estudios macroscópicos y microscópicos de 24 cepas de la colección de hongos del departamento de Biotecnología, la actividad celulolítica de estas cepas fue evaluada cualitativamente mediante el revelado de halos de hidrólisis con rojo-congo en medio Carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato, seleccionando siete cepas fúngicas que presentaron esta actividad. La identificación de las cepas seleccionadas se realizó

empleando técnicas moleculares mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del gen 18S SSU ARNr, predominando los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Phaeosphaeria*.

Palabras clave: celulasas, Cuatro Ciénegas, hongos.

1. INTRODUCCIÓN

La abundante disponibilidad de celulosa en la naturaleza hace que sea una materia prima atractiva para la producción industrial de muchos productos básicos importantes (Gupta *et al.*, 2012). Estructuralmente, la celulosa es un carbohidrato compuesto de unidades de glucosa unidas en una larga cadena lineal por enlaces en los átomos de carbono 1 y 4 de la molécula de azúcar (Gaitan, 2007). Con la ayuda de los sistemas celulolíticos, la celulosa puede ser convertida a glucosa que es un producto de utilidad múltiple, en un proceso mucho más barato y biológicamente favorable (Gupta *et al.*, 2012). En la naturaleza, la degradación de la biomasa celulósica es realizada por mezclas de enzimas hidrolíticas colectivamente conocidas como celulasas. Las celulasas incluyen enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y α -glucosidasas, que actúan de manera sinérgica en microbios que degradan la biomasa (Dashtban *et al.*, 2009). Las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de la fibra de celulosa, creando así sitios para las exoglucanasas las que entonces proceden hacia las regiones cristalinas de la fibra. Las α -glucosidasas llevan a cabo el último paso de la hidrólisis e impiden la acumulación de la celobiosa, la que inhibe a las exoglucanasas (Arroyo, 2010).

Cuatro Ciénegas, como componente del ecosistema del Desierto de Chihuahua, forma parte del complejo de grandes desiertos de Norteamérica. El estudio micológico de la zona es muy limitado, ya que solo corresponden a taxones fúngicos entre el 1 al 2.5 % de los filotipos identificados en los sustratos terrestres y acuosos estudiados (Hendrickson *et al.*, 2008). Muchos microorganismos han sido reportados con actividad celulolítica incluyendo muchas cepas bacterianas y fúngicas tanto aeróbicas y anaeróbicas (Gupta *et al.*, 2012). De los microorganismos empleados, se destacan los hongos filamentosos que se caracterizan por la formación de hifas que les permiten colonizar matrices sólidas y ser más eficientes y competitivos por su gran potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, su tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Escudero *et al.*, 2013). La glucosa, por ser un producto que posee diferentes características, entre ellas el ser edulcorante, preservativo de la humedad, inhibidor frente a levaduras y mohos, estabilizador de la viscosidad, etc, tiene gran aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos (Gaitan, 2007). Actualmente, las celulasas son ampliamente usadas en la industria alimenticia, fábrica de cerveza y vino, industria textil, de papel y de ropa, así como en investigación y desarrollo (Bhat, 2000).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estudios macroscópicos y microscópicos de las cepas en estudio.

Se emplearon un total de 24 cepas de la colección de hongos provenientes de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Tabla 1) las cuales fueron reactivadas por siembra por picadura, empleando un asa bacteriológica en punta y en presencia de la flama de un mechero Fisher. Las cepas fueron inoculadas en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (previamente esterilizados en autoclave durante 20min a 121°C y 15 lb de presión), se incubaron a 31°C de 4 a 7 días.

Los estudios macroscópicos consistieron en evaluar el color de la colonia, textura y tasa de crecimiento. Los estudios microscópicos consistieron en evaluar el tipo de hifas, conidias y tipo de conidióforo. Para ello se realizaron preparaciones en fresco con azul de algodón lactofenol y con una pequeña muestra de micelio en un portaobjetos cubierto por un cubreobjetos para su observación al microscopio (Zeiss) a 10x y 40x.

Tabla 1. Claves de las cepas aisladas de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila

SDA	PDA	SDA	PDA
1A	3A	2C	7B
1B	3B	3B 7714	1A 7714
1C	5A	5A 7714	1B 7714
1RA	6A	6A 7714	1RA 7714
2A	6B	6B 7714	2C 7714
2B	7A	7B 7714	3A 7714

2.2 Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica de las cepas de hongos en estudio.

Para medir la actividad celulolítica se utilizó el medio Agar Rojo-Congo a base de: Carboximetil-celulosa (0.5 %), Extracto de levadura (0.1 %), Colorante rojo-congo (0.5 %) y Agar bacteriológico (1.5 %). Se ajustó a un pH de 6 a 6.5. Se homogenizó y se esterilizó el medio a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos, se enfrió y se vació en cajas petri estériles. En condiciones asépticas, se inocularon cada una de las cepas fúngicas por picadura en el centro del agar rojo-congo. Posteriormente se incubó a 25°C durante 5 días. La evaluación cualitativa de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante la observación de una zona clara (placa) formada alrededor de la colonia de hongos por reacción entre las enzimas secretadas por los hongos y los sustratos cromogénicos. Durante los 5 días de incubación se midió el diámetro del halo de hidrólisis alcanzado por cada cepa.

2.3 Identificación molecular de las cepas fúngicas seleccionadas.

2.3.1 Producción y cosecha de Micelio.

La obtención de micelio se realizó de la siguiente manera: las cepas seleccionadas en la etapa anterior se sembraron por repique en matraces Erlen Meyer de 250ml sobre 50ml de medio líquido dextrosa Sabouraud (Dextrosa 20g/L, Peptona 5g/L, Extracto de levadura 5g/L) en condiciones estériles. Los matraces se incubaron a 25°C por 4 días a 250rpm. Se filtró dicha solución empleando una gasa estéril para la cosecha del micelio, el cual se almacenó a -20°C para su posterior utilización. Las muestras congeladas fueron liofilizadas durante 24 horas y maceradas en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.

2.3.2 Identificación Molecular

Para llevar a cabo la identificación molecular se realizaron ensayos de acuerdo al método descrito por James Borneman y R. Jack Hartin (2000), que incluye la extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel), siguiendo las recomendaciones del proveedor con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. La

verificación de la concentración e integridad del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9%; posteriormente la amplificación por PCR de un fragmento de 422 pb del gen 18S ARNr SSU (small subunit 18S RNA) a partir del ADN genómico extraído (Borneman and Hartin, 2000), seguido de la secuenciación de los productos de PCR mediante un servicio externo (Macrogen, USA) y finalmente se realizaron alineamientos (BLAST) con cada una de las secuencias obtenidas de los amplificados (422 pb) empleando la base de datos "Standar Nucleotide" del NCBI.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización morfológica de las cepas en estudio

La morfología macroscópica mostro diversidad de color en cada una de las colonias, que va desde el color café oscuro, a verde oscuro, blanco, crema y algunas con pigmentos rojos. Presentan apariencia algodonosa, aterciopelada y pulverulenta, su tasa de crecimiento alcanza alrededor de los 4 a 7 días. La morfología microscópica muestra hifas septadas y en algunas cepas no septadas, hialinas, con conidias redondas, elípticas y hialinas, el aparato reproductor es conidióforo que en algunas cepas es recto y en otras es ramificado. La Fig. 1. presenta las imágenes macroscópicas y microscópicas observadas en 7 de las 24 cepas estudiadas.








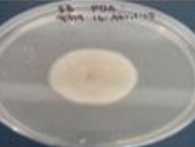
Clave Designada	1RA, 3A, 6A, 1RA 7714	3B	7A	3B 7714
Imagen Microscópica				
Imagen Macroscópica				

Fig. 1. Descripción de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas fúngicas.

3.2 Evaluación cualitativa de la Actividad Celulolítica

A partir de las 19 cepas sometidas a la evaluación de la producción de enzimas celulolíticas, se seleccionaron 7 cepas productoras de celulasas. Durante la evaluación cualitativa estas cepas fueron las que presentaron halos de hidrolisis alrededor de la colonia del hongo indicando la presencia del complejo celulolítico. En la Fig. 2. se muestran las cepas que presentaron halos de hidrólisis y el diámetro alcanzado al finalizar los 5 días de

incubación, la cepa 2C 7714 se usó como testigo ya que esta no muestra actividad celulolítica.

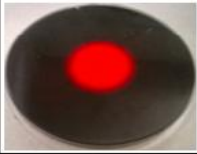
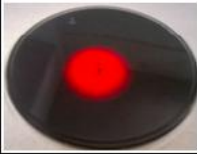

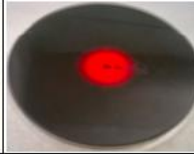




Cepa	3B	1RA 7714	3A	1RA
Diámetro (cm)	3.2	3.1	2.7	2.6
Imagen				
Cepa	6A	3B 7714	7A	2C 7714
Diámetro (cm)	2.5	2.05	1.05	-
Imagen				

Fig. 2. Cepas fúngicas con Actividad Celulolítica.

3.3 Identificación Molecular

Después de seleccionar las cepas que presentaron actividad celulolítica, se llevaron a cabo pruebas moleculares para su identificación. En la Fig. 3. se presenta la imagen obtenida después del procedimiento de la PCR en el cual se obtuvieron los fragmentos amplificados de ADN_r de un tamaño de 422 pb, correspondiente a una región variable de la subunidad pequeña del gen 18S rRNA de cada cepa. En la Tabla 2 se describe las secuencias nucleotídicas de los primers empleados en la amplificación del gen 18S ARN_r SSU. Posteriormente se realizaron los alineamientos correspondientes (BLAST) con cada una de las secuencias obtenidas empleando la base de datos "Standar Nucleotide" del NCBI. Se identificaron los siguientes géneros de hongos, *Penicillium*, *Alternaria* y *Phaeosphaeria*.

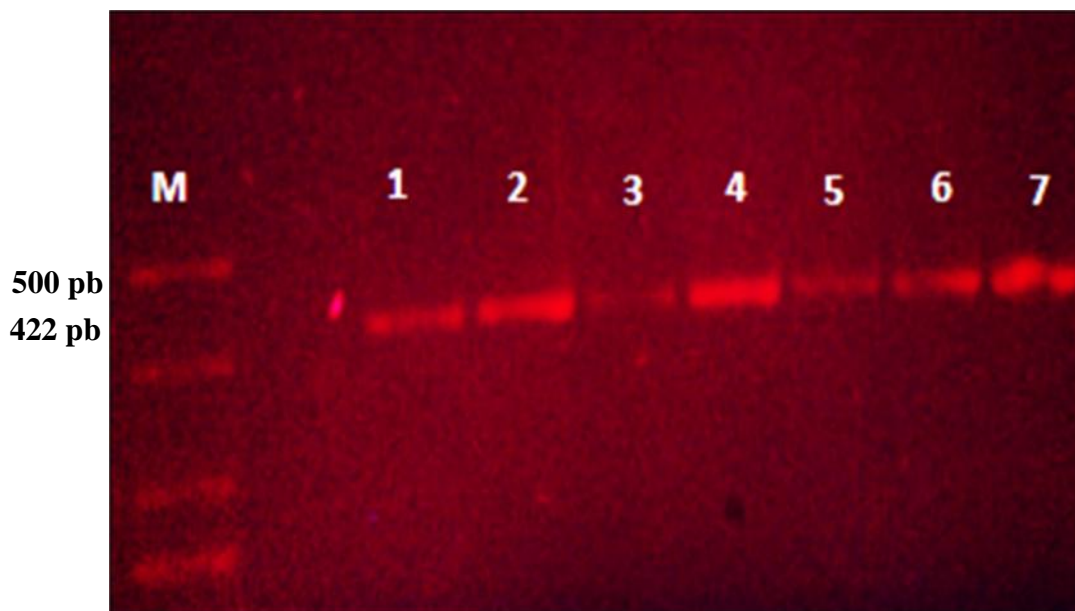


Fig. 3. Gel de agarosa al 1.8% mostrando los amplicones obtenidos por PCR. M) Marcador Hyperladder V 500 pb; 1) 1RA; 2) 3A; 3) 3B; 4) 6A; 5) 7A; 6) 1RA 7714; 7) 3B 7714

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los primers empleados para la amplificación del gen 18S ARNr SSU.

Primer	Secuencia nucleotídica
nu-SSU-0817-5' (foward)	5' - TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA- 3'
nu-SSU-1193-3' (reverse)	5' - TCTGGACCTGGTGAGTTTCC -3'

4. DISCUSIONES

4.1 Caracterización morfológica de las cepas en estudio

Basándonos en las observaciones de las cepas en estudio, podemos reportar que las especies probables encontradas dentro de la colección de cepas fúngicas son: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, sin embargo, la identificación basada en características morfológicas puede llegar a ser relativa por lo que se llevó a cabo una identificación a nivel de género mediante técnicas moleculares. De las 24 cepas de la colección de muestras ambientales de Cuatro Ciénegas, Coahuila se logró reactivar un total de 19 cepas fúngicas de las cuales no se tenían registros macroscópicos y microscópicos. La conservación en PDA y SDA en refrigeración proporcionó un 80% de reactivación.

4.2 Evaluación cualitativa de la Actividad Celulolítica

La actividad celulolítica se evidenció mediante la evaluación cualitativa del revelado de zonas de aclaramiento alrededor de la colonia de hongo, con el fin de seleccionar las cepas que segreguen las enzimas, utilizando colorante rojo-congo, ya que esta prueba se basa en que este colorante interacciona con los polisacáridos que tienen unidades D-glucopiranosil contiguas unidas por enlaces $\alpha(1-4)$. La ventaja de este sistema deriva del intenso color del complejo colorante-glucano el cual permite la diferenciación visual entre organismos que utilizan celulosa y los que no. Yoon et al., (2007) reportan que el rojo-congo es el colorante más recomendado para la realización de ensayos en placa para la selección de la degradación de celulosa llevada a cabo por hongos. Se seleccionaron 7 cepas fúngicas que presentaron actividad celulolítica de un total de 19 cepas.

4.3 Identificación Molecular

Mediante el análisis de la secuencia nucleotídica del gen 18S ADNr, se obtuvo la identificación molecular de las cepas en estudio, predominando los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Phaeosphaeria*, los cuales corresponden con las características microscópicas

descritas para cada una. Los primers nu-SSU-0817-5' y nu-SSU-1193-3' muestran alta especificidad para ADNr de hongos, logrando amplificar las regiones variables V4 (parcial) y V5 de la subunidad pequeña del gen 18S ARNr a partir de cualquiera de los cuatro principales *phyla* fúngicos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridomycota* y *Zygomycota*.

CONFLICTO DE INTERES

Todos los autores participantes estamos de acuerdo con el contenido del artículo y no existe conflicto de intereses en el orden de aparición del nombre de cada uno.

REFERENCIAS

Arroyo Cruz José. 2010. "Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de agave (*Agave tequilana*)". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Bhat MK. 2000. "Cellulases and related enzymes in biotechnology". Elsevier. *Biotechnology Advances*. 18:355-383.

Dashtban Mehdi, Schraft Heidi and Qin Wensheng. 2009. "Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives". *International Journal of Biological Sciences*. Vol. V, No. 6:578-595.

Escudero Agudelo Janneth, Daza Merchán Zunny Tatiana, Gil Zapata Nicolás Javier, Mora Muñoz Oscar Yesid. 2013. "Evaluation of cellulolytic enzymes produced by native fungi through solid state fermentation (SSF) using sugarcane harvesting residues". *Revista Colombiana Biotecnol*. Vol. XV, No. 1:108-117.

Gaitan Bohorquez Diana Maria. 2007. Aislamiento y Evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia.

Gupta Pratima, Samant Kalpana and Sahu Avinash. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*. Article ID 578925, 5 pages. doi:10.1155/2012/578925.

Hendrickson D., Marks C., Moline B., Dinger C, Cohen E. 2008. Combining ecological research and conservation: a case study in Cuatro Ciénegas, Mexico. In: Stevens L., Meretsky V.J. (eds). *Every last drop: ecology and conservation of North American desert springs*. University of Arizona Press, Tucson, pp 127–157.

James Borneman and R. Jack Hartin. 2000. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No. 10, p. 4356-4360.

Ji Hwan Yoon, Ji Eun Park, Dong Yeon Suh, Seung Beom Hong, Seung Ju Ko and Seong Hwan Kim. 2007. Comparison of Dyes for Easy Detection of Extracellular Cellulases in Fungi. *Mycobiology* 35(1): 21-24.