

*Artículo original de investigación*

## **Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela**

Franca Viviano<sup>1</sup>; Luís Medina<sup>2</sup>; Nairalith Ramos<sup>2</sup>; Luís Amaíz<sup>3</sup>; Oscar Valbuena<sup>2, 3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT).

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC),  
Facultad de Ciencias de la Salud (FCS).

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT).  
Universidad de Carabobo. Campus Bárbula, Valencia, Venezuela

\* Autor de correspondencia: ovalbuena@uc.edu.ve

### **Resumen**

La búsqueda, caracterización y purificación de enzimas celulolíticas es relevante a actividades industriales: química, textil, papelera, alimentos, farmacéutica, entre otras. Además, la demanda energética ha potenciado las investigaciones para obtener biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos, proceso en el cual es necesaria la liberación y conversión de la celulosa a glucosa. Esta última etapa puede ser mediada por celulasas de diversas fuentes, entre ellas, las de origen bacteriano. En este trabajo se reporta el aislamiento de dos cepas bacterianas, termófilas moderadas, *Geobacillus stearothermophilus* (cepa 4cm) y *Brevibacillus brevis* (cepa 3cm), con actividad celulolítica, y provenientes del manantial geotermal de Las Trincheras, Estado Carabobo, Venezuela. Estas dos cepas, predominantes en la microflora total estudiada en muestras del agua termal, crecieron en un medio mineral mínimo suplementado con celulosa microcristalina 1% p/v. El crecimiento máximo de la cepa 4cm ocurrió a las 60 h de cultivo, a 60 °C, a pH 7, con agitación y en aerobiosis. La actividad celulolítica *in vitro*, en sobrenadantes libres de bacterias (SLB), fue constante durante 96 h de cultivo, con una velocidad enzimática de 0.0032 mmoles de grupos reductores generados por hora. Los productos de hidrólisis de la celulosa, determinados por cromatografía en capa fina, fueron glucosa y celobiosa, detectándose otros productos de naturaleza glucídica. La actividad *in vitro* determinada en SLB sugiere que las enzimas son secretadas al medio de cultivo y que son capaces de trabajar en condiciones extracelulares.

**Palabras claves:** *B. stearothermophilus*, celulosa, celulasas, termófilos.

## Cellulose degradation by bacteria from the hot spring at Las Trincheras, Venezuela

### Abstract

The search, characterization and purification of cellulolytic enzymes is relevant to industrial activities such as the chemical, textile, paper, food and pharmaceutical industries, among others. Besides, the energetic demand has promoted the search for obtaining biofuels from lignocellulosic materials, a process requiring the cellulose release and conversion to glucose. The latter step could be achieved by cellulases from different sources, included the bacterial ones. This study reports the isolation of two cellulolytic bacterial strains, moderate thermophiles, *Geobacillus stearothermophilus*, strain 4cm and *Brevibacillus brevis*, strain 3cm, from the hot spring at Las Trincheras, Carabobo State, Venezuela. The strains, the predominant bacteria in the total microflora assayed in thermal water samples, grew in a minimal mineral medium supplemented with 1% microcrystalline cellulose. The maximal growth of strain 4cm occurred at 60 h culture, 60 °C, pH 7, under aerobiosis and shaking. The *in vitro* cellulolytic activity, detected in the bacterial free supernatants (BFS), was constant through 96 h culture, at a rate of 0.0032 mmol of reductant groups per hour. The products from the cellulose degradation, evaluated by thin layer chromatography, were glucose and cellobiose. The BFS *in vitro* activity suggests the cellulolytic enzymes are secreted to the culture medium and could work at extracellular conditions.

**Key words:** *B. stearothermophilus*; cellulose, cellulases, thermophiles.

### 1. Introducción

La celulosa, una de las moléculas poliméricas más abundantes en la biosfera (Martínez *et al.* 2005; Pérez *et al.* 2002; Hernández-Santoyo *et al.* 1999), constituida por moléculas de D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ 1-4 (Mejía-Castillo *et al.* 2002), es degradada naturalmente por sistemas enzimáticos conformados por endo  $\beta$ 1-4 glucanasas (E.C.3.2.1.4), exo  $\beta$ 1-4 glucanasas (E.C. 3.2.1.74) y  $\beta$  glicosidasas (E.C.3.2.1.21), las cuales de manera sinérgica transforman el polímero en D-glucosa (Maki *et al.* 2011; Yin *et al.* 2010; Cuervo *et al.* 2009; Sheble y El-diwany, 2007; Atlas y Bartha, 2005; Terry-Brown *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2002; Mejía-Castillo *et al.* 2002; Hernández-Santoyo *et al.* 1999, Hreggvidsson *et al.* 1996). Las celulasas tienen un amplio uso industrial y

particularmente en los procesos para fabricar textiles, cueros y papel se requieren enzimas que funcionen a temperaturas y pH extremos, lo cual ha despertado el interés por la búsqueda de organismos termófilos celulolíticos (Liang *et al.* 2009; Liang *et al.* 2010; Ovando-Chacón y Wahszewski, 2005). Además de sus aplicaciones en las industrias de alimentos y químicas (Sheble y El-dewany, 2007; Ovando-Chacón y Wahszewski, 2005) las celulasas constituyen un insumo importante en la fabricación de biocombustibles, debido a que degradan el componente celulósico de materiales lignocelulósicos generando glucosa, la cual finalmente, por procesos biológicos se transformará en etanol (Maki *et al.* 2011; Cuervo *et al.* 2009; Sánchez-Gómez *et al.* 2009; Cruz *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2009; Martínez-Anaya *et al.* 2008; Gray *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2006; Terry-Brown *et*

al. 2004; Mejia-Castillo et al. 2002; Sissons et al. 1987). Esta alternativa biotecnológica surge por la alta demanda energética satisfecha por el uso de combustibles fósiles y la problemática generada por los altos costos implicados en su producción, la generación de sustancias volátiles tóxicas, las lluvias ácidas y el efecto no deseable sobre el clima del planeta (Maki et al. 2009; Carrete, 2005; Mejia-Castillo et al. 2002; Pérez et al. 2002; Ranson y Rivas, 1999; Bubenick et al. 1983). Los sistemas celulolíticos se organizan aparentemente de manera diferente de acuerdo a la condición aeróbica o anaeróbica de los organismos (Cuervo et al. 2009; Gray et al. 2006). En microorganismos anaeróbicos las enzimas están incorporadas a complejos supra-moleculares, constituyendo sistemas agregativos (Mejia-Castillo et al. 2002) denominados celulosomas (Martínez-Anaya et al. 2008; Pérez et al. 2002; Hernández-Santoyo et al. 1999) unidos a la superficie celular y la actividad enzimática se efectúa en la interfase célula-celulosa. En organismos aerobios, las actividades enzimáticas se encuentran como moléculas aisladas, sistemas no agregativos, que usualmente se excretan al medio de cultivo (Cuervo et al. 2009; Martínez-Anaya et al. 2008; Lynd et al. 2002). En todos los sistemas las enzimas poseen un dominio que enlaza la celulosa, el cual es indispensable para la eficiente hidrólisis de la misma (Mingardon et al. 2011; Maki et al. 2009; Mejia-Castillo et al. 2002). La expresión de las celulasas puede ser regulada a nivel transcripcional (Baharuddin et al. 2010; Martínez-Anaya et al. 2008), la glucosa reprime, mientras que la celulosa, la lactosa y la soforosa inducen una alta expresión de las celulasas. Las enzimas son inhibidas por celobiosa y celodextrinas (Maki et al. 2009; Palmquist y Hahn-Hägerdal, 2000; Lee, 1997), aunque la actividad celulolítica de *Rhodothermus marinus* y algunas cepas del

género *Bacillus* no es inhibida por glucosa y celobiosa (Ovando-Chacón y Wahszewski, 2005; Hreggvidsson et al. 1996; Ljungdahl y Eriksson, 1985). Por lo anteriormente expuesto, el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas y sus sistemas celulolíticos constituyen un factor importante para la implementación de los procesos industriales en los cuales las celulasas puedan estar implicadas. Al respecto una amplia lista de reportes sobre bacterias termófilas celulolíticas existe actualmente en la literatura (Zambare et al. 2011; Rastogi et al. 2010; Maki et al. 2009; Sheble y El-diwany, 2007; Lee et al. 2007; Mawadza et al. 2000; Hreggvidsson et al. 1996; Sissons et al. 1987). En este manuscrito se describe una metodología para aislar e identificar especies bacterianas termofílicas moderadas, provenientes del manantial geotermal ubicado en Las Trincheras, Estado Carabobo, Venezuela, capaces de degradar celulosa y las condiciones para maximizar la actividad de las celulasas.

## 2. Materiales y Métodos.

### 2.1 Colecta de muestras.

Muestras de agua provenientes del manantial geotermal de Las Trincheras, Edo. Carabobo, se colectaron de una piscina a 65 °C, posteriormente se trasladaron al laboratorio en recipientes esterilizados y térmicamente aislados donde se determinó el pH (7.4) con un equipo Radiometer PHM61.

### 2.2 Medios de cultivo y Crecimiento bacteriano.

Volúmenes de 50 mL de agua termal se centrifugaron a 20.000xg por 30 minutos en una centrifuga Super Speed (Servall). El sedimento bacteriano, colectado por raspado del fondo de los tubos con un asa de platino, se transfirió a placas de agar nutritivo

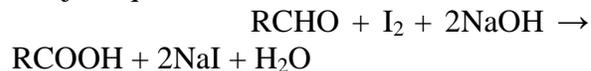
HIMEDIA (agar N) y agar suplementado con celulosa microcristalina (Avicel) 1% p/v, (Sigma), (agar CM). Las placas se incubaron a 55 °C, en aerobiosis, y la aparición de colonias se monitoreó por 24-48 h. Las colonias aisladas en agar CM se transfirieron a placas de agar N, se crecieron a 55 °C, seleccionándose colonias con diferentes morfologías, las cuales se identificaron mediante galerías API (bioMerieux), API50CHB y API20, y el programa computarizado API Lab Plus. Seguidamente, las colonias aisladas se resuspendieron en un medio mínimo mineral (conteniendo CuSO<sub>4</sub> 0.1mg; FeSO<sub>4</sub> 1.0 mg; MgSO<sub>4</sub> 0.2 mg; ZnSO<sub>4</sub> 0.5 mg; NaCl 0.5 mg; NH<sub>4</sub>Cl 1.0 mg; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1 mg y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 mg, por litro de tampón fosfato 60 mM, pH 7.0) suplementado con celulosa microcristalina 1% p/v (MMCM) e incubadas a 55 °C, en agitación constante y aerobiosis. Cada 24 h los cultivos se centrifugaron, 20,000xg, y los sedimentos, constituidos por celulosa microcristalina y bacterias, se resuspendieron en medio mínimo mineral (sin Avicel), continuándose la incubación hasta 84 h; a diferentes tiempos de incubación se retiraron alícuotas, diluyéndose éstas por factores de 10, para determinar la carga microbiana (UFC/mL) en placas de agar N.

### 2.3 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano.

Alícuotas de 1 mL de los cultivos previamente crecidos en medio MMCM se adicionaron a fiolas, conteniendo cada una 100 mL del mismo medio, incubándose por 24 h, con agitación, en aerobiosis, a diferentes temperaturas (50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 °C). La carga bacteriana se determinó de acuerdo a lo establecido en la sección 2.2 (Viviano, 2003).

### 2.4 Determinación de la actividad celulolítica in vitro en función del tiempo de cultivo.

La actividad de celulasas se determinó al retirar alícuotas, de 5 mL (equivalentes a 50 mg de celulosa), de un cultivo en MMCM, crecido a 60 °C y aerobiosis, a intervalos de 24 h hasta 96 h de cultivo (24, 48, 72 y 96 h). Las alícuotas se centrifugaron a 20.000xg para obtener los sobrenadantes libres de bacterias (SLB) y celulosa microcristalina (Sissons *et al.* 1982), los que constituyeron la fuente de enzimas a ser ensayada, tal como se describió previamente en la sección B. La actividad, expresada como mmoles de grupos reductores generados, se evaluó al incubar 5 mL de SLB con 12.5 mL de celulosa microcristalina 1%, por 1h, a 60 °C y pH 7.0, deteniéndose la reacción por la adición de 1mL de HCl 1 N. Finalmente, mediante valoración yodimétrica, con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.05 N y almidón como indicador del punto final de la titulación (Viviano, 2003; Ruysen y Lauwers, 1978), se determinaron los meq consumidos durante la incubación (Skoog *et al.* 2004). Paralelamente, un sistema blanco (sin SLB) también fue ensayado. Los mmoles de grupos reductores se calcularon asumiendo que por cada grupo reductor generado dos electrones son transferidos, de acuerdo a la estequiometría de la reacción abajo esquematizada:



Por lo tanto, el cociente de los meq gastados en la titulación sobre 2 (número de electrones transferidos en la oxidación del grupo aldehído a ácido carboxílico) representa el número de mmoles de grupos reductores generados durante la reacción enzimática.

### 2.5 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad celulolítica in vitro.

Volúmenes (5 mL) de SLB, provenientes de cultivos precrecidos por 24 h en medio MMCM (100 mL), a 60 °C, se incubaron en el intervalo de temperatura comprendido entre 50 y 90 °C durante 1 h; y similarmente, para determinar el efecto del pH, el sustrato se ajustó a diferentes valores de pH, utilizando tampón ácido acético/acetato 50 mM en el intervalo 4-6 y tris/HCl 50 mM para 6.5-9.0 (Perry y Dempsey, 1974); efectuándose las incubaciones a 60 °C durante 1 h, tal como se estableció en la sección D.

### 2.6 Identificación de los productos de degradación de la celulosa por ataque bacteriano.

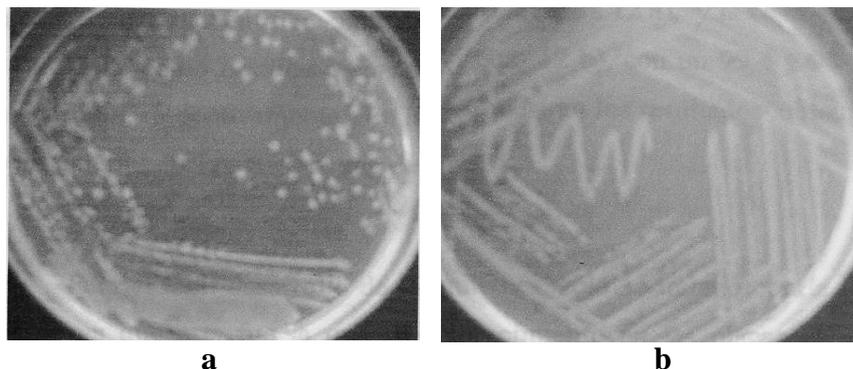
Alícuotas (20mL) de SLB obtenidos de cultivos bacterianos (MMCM) de 24 h de crecimiento, a 60 °C y pH 7 se concentraron, por evaporación a 60 °C, hasta un volumen final de 0.5 mL. El extracto se sometió a cromatografía en capa fina, usando como soporte placas Kiesel F254, 20x20cm, 0.2 mm de espesor, y una mezcla de acetona/cloroformo/agua (85:10:5) como fase móvil (Heinbach, 1983). Paralelamente, se procesó un volumen igual de medio MMCM, sin inóculo bacteriano e incubado

bajo las condiciones señaladas. Ambos extractos se aplicaron a secciones de la placa (5x10 cm), conjuntamente con patrones al 1% p/v de glucosa, celobiosa, maltosa, sacarosa, xilosa y carboximetilcelulosa. En todos los casos 2 µL de cada solución se analizó. Después de la corrida cromatográfica, a temperatura ambiente, la placa se reveló con  $\alpha$ -naftol y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se secó en estufa hasta la aparición de manchas con diferentes tonalidades de color marrón/violeta. (Rendina, 1974)

## 3. Resultados

### 3.1 Aislamiento, crecimiento e identificación de cepas bacterianas.

El crecimiento de la población bacteriana total en placas de agar CM evidenció la presencia mayoritaria de dos morfotipos cuyas características se detallan en la Figura 1 y Tabla 1. La identificación de estas colonias, mediante galerías API (50 CHB y 20 E) y el sistema computarizado API Lab Plus, indicó la presencia de *Geobacillus stearothermophilus* (cepa 4cm) y *Brevibacillus brevis* (cepa 3cm), con índices de identificación de 99.9 y 99.4% respectivamente.



**Figura 1.** Colonias bacterianas celulolíticas crecidas en agar nutritivo.

**a-** *Geobacillus stearothermophilus*, cepa 4cm

**b-** *Brevibacillus brevis*, cepa 3cm

Las cepas 4cm y 3cm, con actividad celulolítica y aisladas de placas de agar CM, se transfirieron a placas de agar N, y se incubaron a 55 ° C, en aerobiosis por 24-48 h.

**Tabla 1.** Características de las cepas bacterianas.

Cepa	Tinción Gram	Morfología de colonias	Identificación
3cm	Bacilos largos Sin esporas Gram positivos	Borde irregular Blanquecinas Opacas Planas	<i>Brevibacillus brevis</i>
4cm	Bacilos cortos Con esporas Gram positivos	Bordes lisos Blanquecinas Brillantes Elevadas	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Debido a su preponderancia, abundante crecimiento y mayor actividad celulolítica, los experimentos que se describirán a continuación corresponden a la cepa 4cm. En la Figura 2 se detalla el crecimiento de la cepa 4cm en medio MMCM, a 55 °C, pH 7, el cual ocurrió después de una fase de latencia de 12 h, alcanzando la población bacteriana valores superiores a  $64 \times 10^6$  UFC/mL a las 60 h, y a 48 h el crecimiento disminuyó a  $16 \times 10^6$  UFC/mL.

### 3.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano.

Seguidamente, para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, cultivos de 24 h de crecimiento, como se señaló en el apartado C, se incubaron a diferentes temperaturas; los resultados (Figura 3) evidenciaron un crecimiento máximo de  $2.43 \times 10^5$  UFC/mL a 60 °C, a 50 y 75 °C valores de  $1.5 \times 10^5$  y  $1.35 \times 10^5$  UFC/mL se obtuvieron respectivamente, y a 80 °C el crecimiento alcanzó  $1.06 \times 10^4$  UFC/mL.

### 3.3 Determinación de la actividad celulolítica total *in vitro*.

I- La actividad total de celulasas se determinó, en los sobrenadantes libres de bacterias (SLB), a diferentes tiempos de cultivo (24, 48, 72 y 96 h) a 60 °C. La Figura 4 muestra un incremento progresivo de la actividad enzimática durante los intervalos de 24 h, alcanzando valores de 0.05 y 0.09 mmoles de grupos reductores

generados a las 24 y 96 h respectivamente. La actividad alcanzada durante el tiempo total de cultivo se expresó como la sumatoria de los valores obtenidos en cada periodo de 24h, constatándose un incremento de la actividad respecto al tiempo, obteniéndose valores de 0.05 mmoles a las 24 h y 0.28 mmoles a las 96 h de cultivo. Es de hacer notar que aunque el crecimiento máximo del cultivo ocurrió a las 60 h seguido por un descenso en la carga bacteriana (Figura 2), la producción de enzimas incrementó a las 72 y 96 h de incubación (Figura 4).

II- El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática total a 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80 °C se detalla en la Figura 5. El máximo de actividad, 0.04 mmoles (100%), se alcanzó a 60 °C; a 55 y 65 °C valores de 0.026 (65%) y 0.0125 mmoles (31%) fueron obtenidos respectivamente y en el resto de las temperaturas ensayadas la actividad no superó el valor de 0.0025 mmoles (6.2%). Es notorio que la temperatura a la cual se alcanzó la actividad enzimática máxima *in vitro* coincidió con la temperatura (60 °C) de mayor crecimiento (ver Figura 2).

III- EL efecto del pH sobre la actividad celulolítica *in vitro* se muestra en la Figura 6. La actividad enzimática alcanzó valores máximos a pH 7 (0.036 mmoles, 100%), obteniéndose registros superiores a los 0.011 mmoles (30.6%) en el intervalo de pH comprendido entre 5.5 y 8.5.

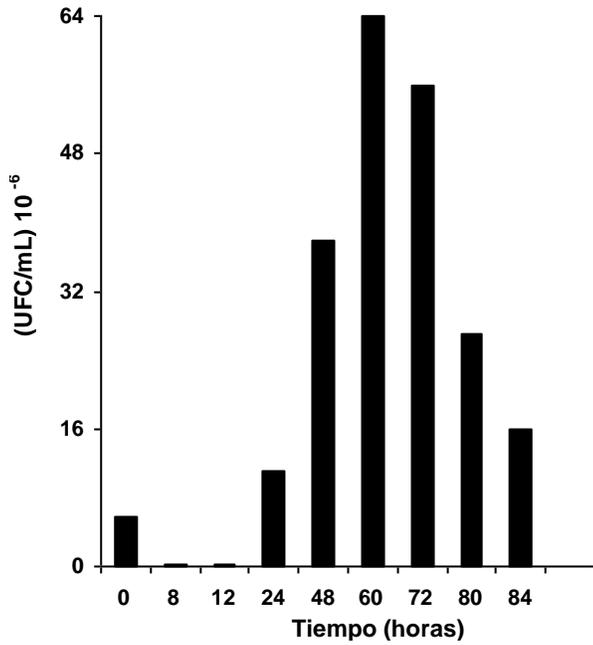


Figura 2. Crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa 4cm, en MMCM.

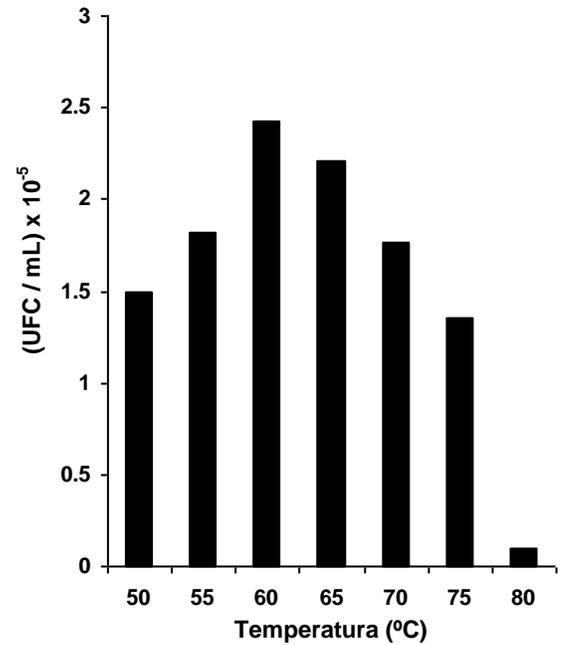


Figura 3. Crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa 4cm, en función de la temperatura.

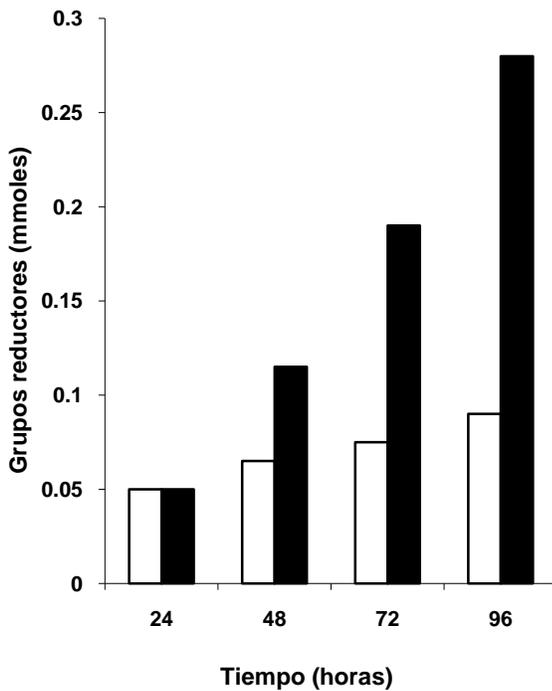


Figura 4. Actividad celulolítica *in vitro* de SLB en función del tiempo de cultivo.

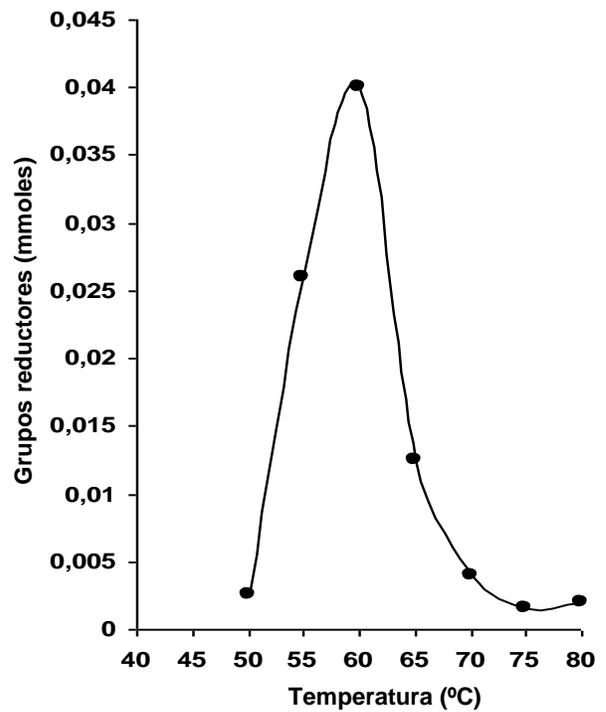
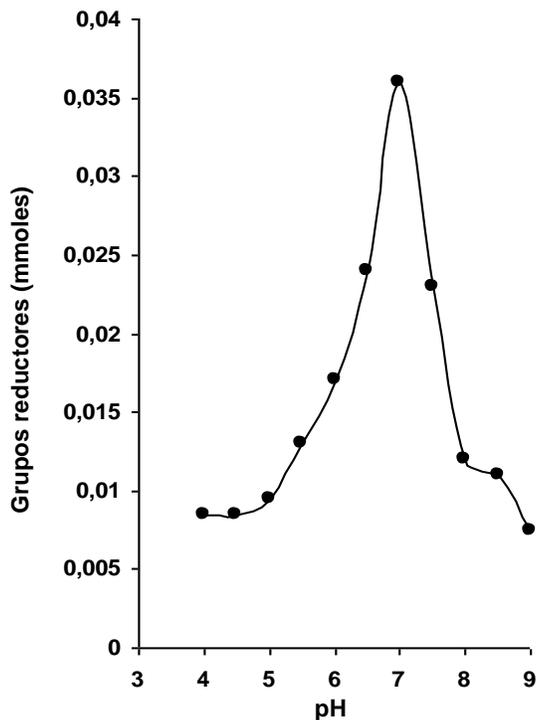


Figura 5. Actividad celulolítica *in vitro* de SLB en función de la temperatura



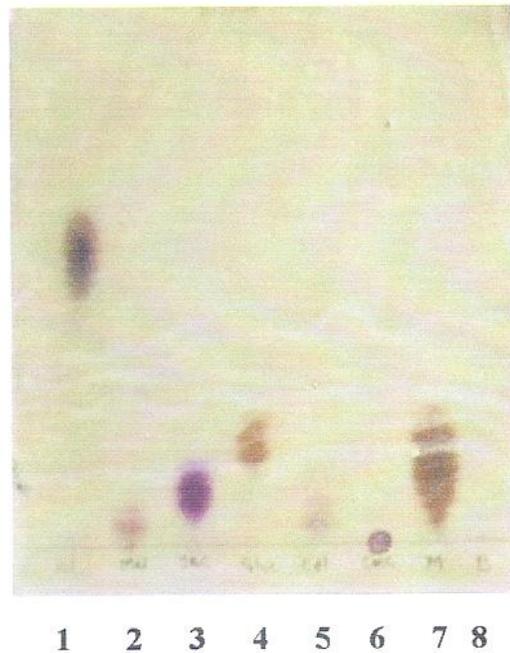
**Figura 6.** Actividad celulolítica *in vitro* de SLB en función del pH

### 3.4 Determinación de los productos de hidrólisis.

La identificación de los productos de hidrólisis de la celulosa microcristalina, por cromatografía en capa fina, se muestra en la Figura 7, detectándose señales, que por su migración y coloración parda, corresponden a glucosa y celobiosa. Además, otras señales no identificadas pero de naturaleza glucídica, también fueron evidentes. Por otra parte, el medio de cultivo MMCM incubado sin inóculo bacteriano, no presentó señales.

## 4. Discusión

Luego de incrementar la biomasa bacteriana, presente en muestras de agua termal, la población total obtenida crecida en agar CM, mostró predominantemente 2 morfotipos bacterianos. Estas colonias, denominadas 4cm y 3cm, crecidas en agar N fueron posteriormente identificadas, mediante las



**Figura 7.** Cromatografía en capa fina de los productos de degradación de celulosa microcristalina por acción bacteriana.

galerías API 50CHB y API 20, como *Geobacillus stearothermophilus* y *Brevibacillus brevis*, respectivamente (Figura 1 y Tabla 1). Previamente a los experimentos que se discutirán, la actividad celulolítica determinada *in vitro* únicamente incrementaba hasta las 24 h de cultivo, tal como ha sido reportado por Acharya y Chaudhar, 2011, permaneciendo constante o disminuyendo a tiempos mayores (datos no mostrados), sugiriendo inhibición por productos finales, contrariamente a lo señalado para el género *Bacillus* por Ljungdahl y Eriksson,(1985). Por tal motivo se decidió retirar, por centrifugación, el medio de cultivo cada 24 h, y el sedimento obtenido (bacterias y celulosa microcristalina) se resuspendió en medio mínimo mineral (sin celulosa), incubándose hasta por 96 h, es decir 4 lapsos de 24 h; bajo tales condiciones se logró eliminar el efecto inhibitor/supresor de la actividad

celulolítica ejercida por los productos finales de la degradación de la celulosa, glucosa y celobiosa, tal como ha sido reportado en trabajos previos (Maki *et al.* 2009; Martínez-Anaya *et al.* 2008; Palmquist y Hahn-Hägerdal, 2000; Lee, 1997). La cepa 4cm, un bacilo Gram positivo, creció en MMCM, a 55 °C, con agitación y en aerobiosis, con crecimiento máximo a las 60 h de cultivo ( $> 64 \times 10^6$  UFC/mL), para posteriormente reducir la carga bacteriana a  $16 \times 10^6$  UFC/mL a las 84 h (FiguraFigura 2). Varios géneros bacterianos celulolíticos aerobios, además del género *Bacillus* han sido reportados, entre los mejor estudiados están *Cellulosoma*, *Pseudomona* y *Streptomyces* (Béguin y Aubert, 1994), *Geobacillus* (Baharuddin *et al.* 2010; Rastogi *et al.* 2010), *Anoxybacillus* (Liang *et al.* 2010) y *Brevibacillus* (Liang *et al.* 2009). Al evaluar el comportamiento del cultivo respecto a la temperatura, se observó un máximo crecimiento a 60 °C, aunque también creció, con menor intensidad en el intervalo de 50-75 °C, perdiendo su viabilidad a 80 °C, ubicando a la cepa 4cm como un termófilo moderado (FiguraFigura 3). La actividad enzimática, en los lapsos de 24 h, a 60 °C, incrementó desde 0.05 mmoles a las 24 h de cultivo hasta 0.09 mmoles a las 96 h (Figura 4), lo cual indica que la producción de enzimas aumenta con el tiempo, aún con la disminución de la carga bacteriana a 72 y 96 h de cultivo. Los valores de actividad señalados podrían estar sobre-estimados en un 10% debido a que no se determinaron los valores de grupos reductores a tiempo cero. No obstante, tales valores pueden obtenerse de las Figuras 5 y 6 (valores mínimos de cada gráfica). El incremento en la actividad enzimática durante la fase de crecimiento exponencial (hasta 60 h), podría explicarse debido a aumentos de la población bacteriana y/o de la transcripción de los genes codificantes del sistema celulolítico (Martínez-Anaya *et al.* 2008), mientras que a

tiempos tardíos de cultivo (con disminución de la carga bacteriana), podría reflejar lisis de las bacterias, con la subsiguiente liberación al medio de cultivo de la fracción intracelular de celulasas, particularmente la  $\beta$  glucosidasa (Maki *et al.* 2009). Con estos datos fue posible calcular la actividad total, acumulativa, de celulasas, la cual se representó como la sumatoria de las actividades enzimáticas en los cuatro lapsos de 24 h de cultivo, obteniéndose valores de 0.05 y 0.28 mmoles a las 24 y 96 h de cultivo respectivamente (Figura 4); la recta de regresión lineal obtenida con las actividades enzimáticas acumulativas ( $Y = -0.00325 + 0.003187 X$ ,  $r = 0.9973$ ), permitió obtener la tasa de hidrólisis de la celulosa efectuada por el sistema enzimático (5 mL de SLB), calculándose ésta en  $\sim 0.0032$  mmol  $\times$  h<sup>-1</sup> (Figura 4). La preparación cruda enzimática mostró actividad máxima (0,04 mmoles, 100%) a 60 °C, como ha sido demostrado en otros sistemas bacterianos termófilos (Acharya *et al.* 2011; Mingardon *et al.* 2011; Zambare *et al.* 2011) reduciendo drásticamente su actividad a 0,0025 (6.25%) y 0.0125 mmoles (31.3%) a 50 y 65 °C, respectivamente, es decir el sistema enzimático trabaja en un intervalo de temperaturas relativamente estrecho, 55-60 °C (Figura 5). El pH óptimo fue de 7 generándose 0.036 mmoles de grupos reductores y en el intervalo de valores de pH comprendido entre 6 y 7.5, la actividad mostró valores de al menos 0.017 mmoles, 47% del valor máximo obtenido (Figura 6). Sistemas celulolíticos mostrando actividad máxima a pH cercanos a la neutralidad han sido previamente descritos en bacterias termófilas (Sheble y El-dewany, 2007). Entre los productos de hidrólisis, caracterizados por cromatografía en capa fina (Figura 7), se identificaron glucosa y celobiosa, situación reportada por otros laboratorios (Sheble y El-diwany, 2007; Hreggvidsson *et al.* 1996). Estos resultados

indican que la actividad celulolítica detectada en los SLB, representan la acción sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$  glucosidasas, tal como ha sido indicado por otros autores (Cuervo *et al.* 2009; Sheble y El-diwany, 2007; Atlas y Bartha, 2005; Terry-Brown *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2002; Mejia-Castillo *et al.* 2002). Además, el sistema enzimático pareciera trabajar extracelularmente (Lynd *et al.* 2002; Hernández-Santoyo *et al.* 1999) como un sistema no agregativo, condición reportada para otras cepas bacterianas (Cuervo *et al.* 2009; Martínez-Anaya *et al.* 2008), aunque en este trabajo no se evaluó su posible actividad a nivel intracelular.

La tasa de hidrólisis calculada permite concluir que bajo las condiciones experimentales indicadas, y considerando que la masa molecular de un residuo de glucosa interno en la celulosa es de 162 g/mol, es posible degradar 49.77 mg ( $0.3072 \text{ mmoles} = 96 \text{ h} \times 0.0032 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$ ) de celulosa microcristalina, por cada 5 mL de SLB proveniente de cultivos de 96 h, a 60°C, a pH 7, con agitación y en aerobiosis. La velocidad de hidrólisis calculada parece justificar el comportamiento del cultivo respecto al tiempo de incubación, pues a las 60 h, tiempo al cual se obtuvo el crecimiento máximo, una alícuota de 5 ml de SLB, podría haber hidrolizado el 62.2% (31.1 mg, equivalentes a 0.192 mmoles) del sustrato inicialmente presente (50 mg = 0.3086 mmoles); mientras que a las 72 y 84 h la degradación podría alcanzar el 74.6% (37.32 mg = 0.2304 mmoles) y 87.1% (43.55 mg = 0.2688 mmoles) respectivamente; consecuentemente, por insuficiencia de sustrato carbonado en el medio de cultivo, la carga bacteriana disminuye al alcanzarse la fase de muerte (Figura 2). Finalmente, estos estudios contribuyen a conocer la flora bacteriana y las actividades enzimáticas asociadas, con real potencial industrial, en uno de los manantiales hidrotermales

reconocido como uno de los más calientes del planeta, ubicado en Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela (Ojeda, 1995).

## 5. Reconocimientos.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, Proyecto 97010 y por la Unidad de Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Agradecemos al Centro Termal Las Trincheras al permitir la recolección de las muestras en sus instalaciones, al Prof. Carlos Martínez y Lic. Noja Izzeddin por sus acertadas sugerencias.

## 6. Referencias

- Acharya, S., Chaudhary, A. 2011. Effect of nutritional and environmental factors on cellulase activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. *J Sci Ind Res.* 70 February 142-148.
- Baharuddin, A.S., Abbad Razak, M.M., Hock, L.S., Hmad, M.N., Abd-Aziz, S., Rahman, N.A.A., Md Shah, U.K., Hassan, M.A. Sakai, K., Shirai, Y. 2010. *Am. J Appl. Sci.* 7(1):56-62.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 2005. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental.* 4ª edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. pp. 398-400.
- Béguin, P., Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13(1):25-58.
- Bubenick, D.V., Record, F.A., Kindya, R.J. 1983. Acid rain, an overview of the problem. *Env. Progr.* 2(1):15-32.
- Carrete, R. 2005. Tras la huella de la celulosa en Finlandia. La otra cara de la moneda. *Revista Ecología Política.* Julio (29):37-43.

- Cruz, N., Castellanos, D., Argüello, H. 2009. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 3(2):237-249.
- Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotechnología.* 13(3):11-25.
- Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10(2):141-146.
- Heinbach, S. 1983. Evaluación de carbohidratos en fluidos biológicos por cromatografía líquida (de capa fina, TLC y de alta presión). Universidad de Carabobo, Valencia. pp. 123-125.
- Hernández-Santoyo, A., García-Hernández, E., Rodríguez-Romero, H. 1999. Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 43(3-4):137-142.
- Hreggvidsson, G.O., Kaiste, E., Holst, O., Eggertsson, G., Paldottir, A., Kristjánsson, J.K. 1996. An extremely thermo stable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marines*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8):3047-3049.
- Kumar, S., Singh, S.D., Mishra, I.M., Adhikari, D.K. 2009. Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Technol.* 32(4):517-526.
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. of Biotechnol.* 56(1):1-24.
- Lee, Y., Kim, B., Lee, B., Jo, K., Lee, N., Chung, C., Lee, Y., Lee, J. 2007. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technol.* 98(2):288-297.
- Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K., Bozzola, J. 2009. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp strain JXL. *J. Ind. Biothechnol.* 36(7):961-970.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J.W. 2010. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium *Anoxybacillus* sp 527. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(6):1841-1852.
- Ljungdahl, L.G., Eriksson, K.E. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Adv. Microb. Ecol.* 8:237-299.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):506-577.
- Maki, M.L., Broere, M., Leung, K.T., Qin, W. 2011. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2(2):146-154.
- Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. 2009. The prospects cellulose-producing bacteria for the conversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* 5(5):500-516.
- Martínez-Anaya, C., Belcazar-López, E., Dantan-González, E., Folch-Mallol, J.L. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50(3-4):119-131.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of fungal attack of lignin. *Inter. Microbiol.* 8(3):195-204.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiasson, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. of Biotechnol.* 83(3):177-187.
- Mejía-Castillo, T., Mújica-Lengua, F., González-Robles, A., Ortega-López, J. 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología: *Avance y Perspectiva.* 21(Sept-Oct):267-271.

- Mingardon, F., Bagert, J.D., Maisonnier, C., Trudeau, D.J., Arnold, F.H. 2011. Comparison of family 9 cellulases from mesophilic and thermophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4):1436-1442.
- Ojeda, R. 1995. Aguas termales Las Trincheras. Gráficas Hidalgo C.A. Valencia. Venezuela.
- Oliveira, L.A., Porto, L.F.A., Tambourgi, E.B. 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technol.* 97(6):862-867.
- Ovando-Chacón, S.L., Wahszewski, K.N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia.* 21(42):111-120.
- Palmquist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* 74(1):25-33.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5(2):53-63.
- Perry, D.D., Dempsey, B. 1974. Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall. New York. USA. pp. 135-143.
- Ranson, I., Rivas, C. 1999. Biocatalizador para remover azufre orgánico en hidrocarburos. *Visión Tecnológica.* 7(1):15-22.
- Rendina, G. 1974. Técnicas Aplicadas de Bioquímica. 1<sup>ra</sup> edición. Interamericana, S.A. de C.V. México, DF. México. pp. 113.
- Rasgotogi, G., Bhalla, A., Akash, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., Sani, R.K. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technol.* 101(22):8798-8806.
- Ruyssen, R., Lauwers, A. 1978. Assay methods for pancreatine. In *Pharmaceutical Enzymes. Properties and assay methods.* Story Scientia. Ghent, Belgium. pp. 72-84.
- Sánchez-Gómez, T.M. 2009. Caracterización microbiológica del proceso de compostaje a partir de residuos azucareros. *Agronomía Trop.* 59(3):309-316.
- Sheble, A.S., El-diwany, A.I. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Aust. J. Basic and Appl. Sci.* 1(4):473-478.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2004. Química Analítica. 7<sup>a</sup> edición. Mc Graw Hill-Interamericana Editores, S.A de C.V. México DF. México. pp. 466-468, 773.
- Sissons, S.H., Sharrock, K.R., Daniel, R.M., Morgan, H.W. 1987. Isolation of cellulolytic anaerobic extreme thermophiles from New Zealand thermal sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(4):832-838.
- Terry-Brown, C.J., Bermúdez, R.C., Rodríguez-Pérez, S., Fernández-Bozan, M. 2004. Selección de un inóculo para la degradación anaerobia de la pulpa de café. *Tecnología Química.* 24(2):64-71.
- Yin, L.J., Huang, P.S., Lin, H.H. 2010. Isolation of cellulase producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp YJ5. *J. Agri. Food. Chem.* 58(17):9833-9837.
- Viviano, F.C. 2003. Actividad celulolítica de cepas bacterianas aisladas de las aguas termales de Las Trincheras en el estado Carabobo. Trabajo Especial de Grado. Licenciatura en Química. Departamento de Química. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela. 1-75p.
- Zambare, V., Zambare, A., Muthukumarappan, K., Christopher, L.P. 2011. Biochemical characterization of thermophilic lignocellulose degrading enzymes and their potential for biomasa bioprocessing. *Inter. J. Energ. Environ.* 2(1):99-112.