

# Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá

## Isolation and identification of potential amylolytic and cellulolytic microorganisms from soil of Bogota wetlands

Etna Milena Sánchez Castelblanco\*; Juan Pablo Heredia Martín \*\*;  
Sonia Marcela Buitrago Morales\*\*\*; Juan Pablo Medina Rodríguez\*\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278

### RESUMEN

Las amilasas y celulasas de origen microbiano se han utilizado desde hace más de tres décadas en la industria. El aislamiento de microorganismos nativos con capacidad amilolítica y celulolítica es el punto de partida para aprovechar la biodiversidad microbiana en la producción de amilasas y celulasas con características específicas que permitan obtener nuevos productos y optimizar procesos industriales donde estas sean aplicables. El objetivo de este trabajo fue aislar, a partir de suelo de cinco humedales en Bogotá, cepas microbianas productoras de enzimas amilolíticas y celulolíticas. Se realizó la medición de halos de hidrólisis en agar almidón y agar carboximetilcelulosa. Se evaluó la actividad enzimática por medio de la producción de azúcares reductores, determinados mediante la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se seleccionaron cuatro aislamientos amilolíticos diferentes, todos identificados como *Bacillus amyloliquefaciens*, con actividades entre  $480 \pm 35$  y  $752 \pm 33$  U/mL a  $60^\circ\text{C}$ . Cinco aislamientos celulolíticos diferentes fueron seleccionados, dos identificados como *Bacillus amyloliquefaciens*, dos como *Yersinia massiliensis* y uno como *Stenotrophomonas nitritireducens*, con actividades enzimáticas entre  $13.82 \pm 2.5$  y  $19.11 \pm 2.3$  U/mL a  $50^\circ\text{C}$ . Estos resultados demuestran que dentro de la biodiversidad de los suelos de humedales de Bogotá existen microorganismos productores de amilasas y celulasas que podrían ser aplicadas en procesos industriales.

**Palabras clave:** actividad amilolítica, actividad celulolítica, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Yersinia massiliensis*.

### ABSTRACT

The amylases and cellulases obtained from microorganisms have been used since more than three decades in industry. The isolation of native microbial strains with amylolytic and cellulolytic ability is the starting point to make the best of microbial biodiversity and support the production of amylases and cellulases with novel characteristics to obtain new products and optimize industrial processes where these enzymes can be applied. The objective of this work was to isolate microbial strains with the capacity to produce amylolytic and cellulolytic enzymes from the soil of five wetlands in Bogotá. Hydrolysis halos measurements in starch agar and carboxymethylcellulose agar were performed. The enzymatic activity was determined through the production of reducing sugars which were determined by 3,5-dinitrosalicylic acid method. Four different amylolytic isolations were selected and all of them were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The amylolytic activity was between  $480 \pm 35$  and  $752 \pm 33$  U/mL at  $60^\circ\text{C}$ . Five different cellulolytic strains were selected and two of them were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, two as *Yersinia massiliensis* and one

\* <https://orcid.org/0000-0002-3549-0164>. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. etnamilena@misena.edu.co.

\*\* <https://orcid.org/0000-0002-5273-4108>. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. jpheredia@misena.edu.co.

\*\*\* <https://orcid.org/0000-0003-0652-9231>. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. soniabuitrago@misena.edu.co.

\*\*\*\* <https://orcid.org/0000-0002-0129-9169>. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. jpmedinar@misena.edu.co.

as *Stenotrophomonas nitritireducens*. Their cellulolytic activities were from  $13.82 \pm 2.51$  to  $19.11 \pm 2.3$  U/mL at 50°C. These results demonstrate that as a part of the Bogota wetlands soil biodiversity there are microorganisms producing amylases and cellulases which might be applied in industrial processes.

**Key words:** amylolytic activity, cellulolytic activity, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas nitritireducens*, *Yersinia massiliensis*.

**Recibido:** agosto 10 de 2019 **Aprobado:** mayo 16 de 2020

## INTRODUCCIÓN

Las amilasas y celulasas son unas de las enzimas más utilizadas en la industria biotecnológica debido a que permiten la bioconversión de diferentes sustratos ricos en almidón y celulosa. Es así como desde hace varias décadas la industria textil, de alimentos, papel, detergentes y recientemente la industria de bioetanol han venido utilizando estos biocatalizadores en sus procesos productivos (Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche, & Pandey, 2010; Gurung, Ray, Bose, & Rai, 2013; Singh, Kumar, Mittal, & Mehta, 2016). En la actualidad, los microorganismos son ampliamente utilizados para la producción de enzimas debido a que muchos de ellos pueden aislarse de diversas fuentes como el compost, aguas residuales (Sánchez, y otros, 2005), residuos agroindustriales (Hernández, Pérez, & Piñeros-Castro, 2018) y sobre todo a partir recursos naturales como el suelo (Bahadure, Agnihotri, & Akarte, 2010; Canales, Chávez-Hidalgo, & Zavaleta, 2016).

Las amilasas y celulasas microbianas son más estables que las obtenidas a partir de plantas o animales (Gurung *et al.*, 2013) y han remplazado tecnologías químicas en la industria alimentaria, textil, del papel y de las fermentaciones debido a su bajo costo, alta productividad, estabilidad química, bajos niveles de contaminación, amplia disponibilidad y ubicuidad (Mishra, Ahluwalia, & Joshi, 2014) y puede ser fácilmente evaluada su actividad por diversas técnicas de laboratorio. La demanda de productos biológicos en el mercado y el incremento en la utilización de enzimas con estas características ha hecho que las amilasas y celulasas de origen microbianos adquieran gran importancia en la industria ya que facilitan procesos catalíticos en tratamientos de la industria textil, de alimentos, papel, entre otras (Singh & Rani, 2014). Es por esto que en el presente estudio se recuperaron bacterias productoras amilasas y celulasas a partir de muestras naturales como el suelo de cinco humedales localizados en Bogotá, con el fin de obtener extractos de enzimáticos con características deseables y aplicables en procesos productivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Para este estudio, se seleccionaron cinco humedales ubicados al norte de Bogotá: Torca, Guaymaral, Córdo-

ba, Conejera y Florida, se tomaron muestras en las zonas de manejo y preservación ambiental de estos humedales, en áreas de 1 m<sup>2</sup> con humedad y material vegetal en descomposición. Se trazó un zig-zag y de los tres vértices se tomó una submuestra de suelo a una profundidad de 20 cm (Cerón & Ramirez, 2011), se homogenizaron las submuestras y se tomaron 100 g de la mezcla en bolsas plásticas de cierre hermético. Las muestras se rotularon y se transportaron a 4°C.

### Aislamiento

Se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se sembraron en agar almidón (AA) al 1% p/v para aislar los microorganismos amilolíticos (Abd-elhalem, El-Sawy, Gamal, & Abou-Taleb, 2015) y en agar carboximetilcelulosa (CMC) al 1% p/v para aislar los microorganismos celulolíticos, las cajas se incubaron a 30°C durante 5 días. A las colonias crecidas en agar CMC, se les adicionó rojo congo al 1% p/v y NaCl 0.1 M, dejándolo por un período de cuatro horas para evidenciar halos de hidrólisis (Teather & Wood, 1982). Para los microorganismos amilolíticos, se adicionó lugol sobre las colonias y se observó la presencia de halos de hidrólisis (Chand, Aruna, Maqsood, & Rao, 2005). Cada cepa aislada fue codificada con el tipo de actividad enzimática (C para celulolíticos y A para amilolíticos) y el humedal de procedencia: Torca numerales 1 a 4, Córdoba 5 a 7, 11 y 12, Guaymaral 8 a 10, Conejera 13 a 17 y Florida 18 a 24.

### Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática

Las cepas que presentaron halo de hidrólisis, fueron sembradas por punción en AA y en agar CMC y se llevaron a incubación a 37°C por 48 horas, se preseleccionaron y caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente los morfotipos con halos de un diámetro mayor a 5 mm. A las cepas amilolíticas y celulolíticas preseleccionadas se les calculó el radio de hidrólisis (RH) como la relación entre el tamaño de la colonia y el halo de hidrólisis, para ello se dividió el tamaño del halo entre el tamaño de la colonia.

### Obtención de extractos enzimáticos

Las cepas preseleccionadas se sembraron en caldo nutritivo y se llevaron a incubadora con agitación orbital a 35°C, 150 rpm por 12 horas, a partir de estos cultivos se realizaron inóculos en 5 mL de solución salina al 0.85% p/v ajustando la concentración bacteriana al tubo 1 de la escala de MacFarland. Se realizaron fermentaciones

por triplicado de cada una de las cepas preseleccionadas de la siguiente manera: para cepas celulolíticas el inóculo inicial de 5 mL se sembró en 45 mL de caldo Mandels pH 7 (CM) (Mandels & Roche, 1976) y para cepas amilolíticas el inóculo inicial de 5 mL se sembró en 45 mL de caldo almidón al 1% p/v pH 7 (CA) - 1% almidón hidrosoluble (Acros organics®), peptona 0.25% (Oxoid), extracto de levadura 0.25% (Oxoid), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01% y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01% -. Los cultivos se incubaron en agitador orbital a 35°C a 150 rpm durante 60 horas. Para verificar crecimiento microbiano y pureza, se realizó recuento en placa y tinción de Gram. Cada 12 horas se tomaron muestras y se centrifugaron a 4500 rpm por 20 minutos a 7°C para las fermentaciones en CA y 3000 rpm por 30 minutos a 7°C para las fermentaciones en CM. El sobrenadante se reservó para evaluar tanto la actividad enzimática como el consumo del sustrato; el almidón residual presente durante la fermentación se determinó por la técnica de yoduro de potasio midiendo las absorbancias a 640 nm del complejo coloreado de yoduro-yodato-almidón presente en cada uno de los sobrenadantes obtenidos (Téllez, Alvarez, & Roa, 2010; Jarvis & Walker, 1993) y usando como blanco de reactivos solución de yoduro de potasio diluida 1:4 en agua destilada. El consumo de celulosa se evaluó de forma indirecta por la técnica del ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS), midiendo los azúcares reductores residuales generados a partir de la hidrólisis de la CMC presente en el medio (Miller, 1959), las mediciones de absorbancia se realizaron a 540 nm y se empleó como blanco agua destilada más reactivo DNS, en ambas determinaciones se usó un espectrofotómetro UV-VIS 1800 Shimadzu®.

#### Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática

Se realizó la reacción enzimática amilolítica mezclando 1 mL del sobrenadante más 1 mL de solución de almidón al 1% p/v - buffer fosfato 0.1 M pH 5.5 en baño termostatado a 60°C durante 30 minutos. Se detuvo la reacción enzimática en baño de hielo durante 5 minutos y la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 4600 rpm. La reacción enzimática celulolítica se realizó mezclando 1 mL del sobrenadante más 1 mL de solución de CMC al 1% p/v - buffer citrato 0.1 M pH 5 en baño termostatado a 50°C durante 60 minutos, después de detener la reacción en baño de hielo durante 10 minutos, se centrifugó la mezcla a 4600 rpm por 10 minutos. Para evaluar la actividad enzimática se cuantificaron los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática usando la técnica del DNS. Para reportar los resultados de las actividades amilolíticas y celulolíticas se tomaron los datos de la media experimental de la concentración de azúcares reductores (mg/mL) y se calculó la actividad de los extractos enzimáticos obtenidos por medio de la siguiente ecuación (Suesca, 2012):

$$\frac{U}{mL} = \frac{([Gm]-[Gb]) \cdot 10^6}{MMa \cdot tR} \cdot Fd$$

Dónde: (Gm): Concentración de azúcar de la muestra en mg/mL; (Gb): Concentración de glucosa blanco en mg/mL; MMA: Masa molecular de glucosa (180 g/mol); tR: Tiempo de reacción enzimática en minutos; Fd: Factor de dilución de la muestra.

Donde una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un micro mol de glucosa por mL por minuto bajo las condiciones de prueba (Rodríguez & Piñeros, 2007; Chand *et al.*, 2005). Utilizando Minitab® 18 versión 18.1 (2017), se realizó la prueba ANOVA de 1 factor para comprobar la diferencia significativa de la actividad enzimática entre cada cepa evaluada, tomando 3 muestras por cada grupo y con  $\alpha = 0.05$ . Para comprobar las diferencias significativas entre los resultados de las actividades enzimáticas de cepas diferentes, en las cuales se obtuvieron resultados de U/mL similares, se realizó una prueba de hipótesis con la distribución t de Student comparando las medias experimentales.

#### Identificación y conservación de microorganismos

Los microorganismos productores de amilasas y celulasas con mayor actividad enzimática, fueron caracterizados microscópicamente y molecularmente. Para la caracterización molecular se amplificó por PCR la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S y se purificaron los fragmentos de la PCR, estos se secuenciaron con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S. El análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, se realizó mediante la comparación con bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las cepas seleccionadas fueron criopreservadas en glicerol al 20% v/v a -80°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Actividad enzimática cualitativa

De las muestras analizadas de los cinco humedales, se aislaron en total 55 cepas bacterianas, 25 amilolíticas y 30 celulolíticas, presentadas en la tabla 1. De acuerdo con los resultados de la evaluación semicuantitativa, se preseleccionaron 34 cepas en total, 21 amilolíticas y 13 celulolíticas.

En la tabla 2 se relaciona el diámetro del halo de aclaramiento producido por cada una de los aislamientos bacterianos amilolíticos preseleccionados, así como su radio de hidrólisis. Los 21 morfotipos amilolíticos preseleccionados presentaron halos de aclaramiento entre 5 y 12 mm de diámetro, tamaños menores a los reportados en bacterias aisladas de suelo provenientes de cultivos de

Tabla 1. Número de cepas amilolíticas y celulolíticas aisladas.

Humedales	Cepas amilolíticas	Cepas celulolíticas	Total
Torca	8	4	12
Guaymaral	3	1	4
Córdoba	5	1	6
La Conejera	4	7	11
La Florida	5	17	22
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>55</b>

trébol donde se encontraron microorganismos capaces de generar halos entre 7 a 30 mm de diámetro, sin embargo, al comparar los datos del radio de hidrólisis del almidón, que presenta la relación entre el tamaño del halo y la colonia, dichas bacterias presentaron radios de halo de hidrólisis entre 1.03 y 2.5 (Abd-elhalem *et al.*, 2015), radios inferiores a los presentados por las cepas preseleccionadas en este estudio, los cuales estuvieron entre 0.24 y 7.

La identificación de las cepas celulolíticas preseleccionadas, así como el tamaño del halo y el radio de hidrólisis, se presentan en la tabla 3. Las 13 cepas celulolíticas preseleccionadas presentaron halos de hidrólisis de 6 a 32 mm de diámetro, con radios de hidrólisis de 0.3 a 6.5, menores a los reportados por Huang, Sheng y Zhang (2012) en aislamientos de bacterias celulolíticas provenientes del intestino de la larva *Holotrichia parallela*.

Comparando los resultados obtenidos en la evaluación semicuantitativa de los microorganismos preseleccionados se evidencia que, aunque los aislamientos celulolíticos generaron tamaños de halos más grandes (32 mm)

que los aislamientos amilolíticos (12 mm), estos últimos presentaron mejores radios de hidrólisis (Tabla 3). Por tal razón para la selección de microorganismos con potencial enzimático se debe hallar el radio de hidrólisis y utilizar este como criterio de selección y no el tamaño del halo, ya que se pueden encontrar tamaños de halo grandes pero la relación respecto al tamaño de la colonia puede ser menor. Esto debido a que cepas como la C20B y C24D1 fenotípicamente presentaron colonias pequeñas pero actividad enzimática alta, mientras que la cepa C24C2 presentó colonias grandes con actividad enzimática menor respecto a las cepas C24A y C17C.

#### Resultados de la actividad enzimática cuantitativa

Se seleccionaron los microorganismos que presentaron los mejores resultados de actividad enzimática. De las 21 cepas amilolíticas preseleccionadas se seleccionaron 4 que presentaron unidades enzimáticas entre  $480 \pm 35$  y  $752 \pm 33$  U/mL, mientras que de las 13 cepas celulolíticas se seleccionaron 5 que presentaron actividades enzimáticas entre  $13.82 \pm 2.55$  y  $19.11 \pm 2.3$  U/mL. Según los resultados del ANOVA, con  $p = 0.02$  para amilolíticas,  $p = 4 \times 10^{-5}$  para celulolíticas, se encontró que con un nivel

Tabla 2. Tamaño del halo de hidrólisis y radio de hidrólisis de cepas amilolíticas.

CEPAS	Diámetro del halo (mm)	Radio de Hidrólisis (RH)
A1B, A1A, A5B, A5C, A9A, A9C, A16C, A18A, A22A	5 - 6	0.24 - 1.67
A1C, A11A, A16A	7 - 8	0.39 - 7.00
A11E, A8B, A16B, A24A, A2E	9 - 10	0.75 - 2.25
A2A, A2D, A3A, A16D	11 - 12	0.35 - 1.0

Tabla 3. Tamaño del halo de hidrólisis y radio de hidrólisis de cepas celulolíticas.

CEPAS	Diámetro del halo (mm)	Radio de Hidrólisis (RH)
C11E, C18A, C20A, C23A	6 - 7	0.50 - 2.33
C20B, C24D1	11-12	1.83 - 2.75
C17A	15-16	0.38
C9B, C16C, C16B	23-24	1.05 - 1.53
C17C	25-26	6.5
C24A	27-28	4.5
C24C2	31-32	1.27

**Tabla 4.** Tiempo en el que se obtuvo la mejor actividad amilolítica.

CEPA	Tiempo, h	$\bar{X}$ Actividad Amilolítica 60°C (U/mL)	RH
A5B	48	514 ± 46	1.60
A11A	48	480 ± 35	7.00
A16C	48	752 ± 33	0.63
A22A	48	749 ± 45	0.46

de confianza del 90% hubo diferencia significativa en los resultados de actividad enzimática entre las cepas amilolíticas, así como entre las celulolíticas seleccionadas.

Durante la obtención del extracto enzimático, las cuatro cepas amilolíticas seleccionadas presentaron consumo total del sustrato entre las 12 y 24 horas; a partir de las 24 horas el almidón residual presente en las fermentaciones no fue detectable por un método espectrofotométrico con un límite de detección de 0.01mg/mL.

Los extractos enzimáticos con mayor actividad amilolítica, se obtuvieron a las 48 horas de fermentación, en la tabla 4 se muestran estos resultados para cada una de las cepas seleccionadas, también se relaciona el radio de hidrólisis presentado por los microorganismos durante la evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática.

Según los datos presentados en la tabla 4, A16C y A22A presentaron la mejor actividad amilolítica. La comparación de las medias experimentales de los resultados de la actividad enzimática indica que no hay diferencia entre estas dos cepas. El mismo resultado se obtuvo al comparar las medias experimentales entre las cepas A5B y A11A, cepas con la menor actividad registrada.

Los extractos enzimáticos crudos obtenidos en caldo almidón 1% p/v, a pH 7 y 30°C, a partir de las cuatro cepas amilolíticas seleccionadas en este estudio presentaron una actividad enzimática entre 480±35 y 752±33 (U/mL) a 50°C y un pH de 5. Estos resultados estuvieron por encima de la media al ser comparados con otras investigaciones que han estudiado la producción de amilasas a partir de diferentes especies de *Bacillus spp.* Es así como a partir de *Bacillus subtilis* B119 aislado de diferentes áreas de Savar, Dahka se obtuvieron amilasas con una actividad entre 5.97 y 7.37 (U/mL) en procesos de fermentación que utilizaron variables similares a las utilizadas en este estudio, 48 horas de fermentación a 35°C, pH inicial de 7, 150 rpm y 1% de inóculo (Dash, Rahman, & Sarker, 2015). En otro estudio en el que *Bacillus vallismortis* TD16 aislado de sedimentos salinos fue probado para la producción de amilasas en diferentes condiciones de cultivo, la actividad enzimática más alta fue de 45 (U/mL) (Suganthi, Mageswar, Karthikeyan,

& Muthukaliannan, 2015). Actividades amilolíticas superiores a las anteriormente citadas fueron reportadas para *Bacillus amyloliquefaciens*, aislado de rizósfera de plantas de trébol, con una actividad amilolítica de 72.5 U/mL (Abd-elhalem *et al.*, 2015) y para *Bacillus cereus*, aislado de muestras de vermicompostaje en India, de 216+/-2.6 (U/mL) (Sivakumar, Shankar, Vijayabaskar, Muthukumar, & Nagendrakannan, 2012).

Aunque los extractos enzimáticos obtenidos a partir de las cepas bacterianas A5B, A11A, A16C, A22A presentaron la máxima actividad amilolítica a las 48 horas de cultivo, tiempo superior al reportado para otras amilasas, las actividades enzimáticas fueron 245 a 360 veces mejor que otras enzimas obtenidas en menor tiempo de fermentación. Así por ejemplo, a las 38 horas de fermentación a 37°C en un medio almidón 1% p/v usando *Lactobacillus plantarum* se obtuvo 2.1 (U/mL) como la máxima actividad amilolítica (Kanpiengjai, Lumyong, Nguyen, Haltrich, & Khanongnuch, 2015).

En la tabla 5 se presentan los promedios de la actividad enzimática (U/mL) de las muestras correspondientes a cada una de las cepas celulolíticas seleccionadas, así como el promedio de los azúcares reductores residuales (consumo indirecto de la celulosa) obtenidos durante las 60 horas de la fermentación.

El tiempo de fermentación en el que las cepas celulolíticas evaluadas presentaron mayor actividad enzimática fue a las 48 horas. En la tabla 6 se relacionan estos resultados, así como el consumo de celulosa de los microorganismos, expresado en mg/mL de azúcares reductores residuales producidos como resultado de la hidrólisis de la CMC presente en el medio de cultivo.

Aunque la cepa que presentó mayor actividad celulolítica fue C18A, la comparación por medio de la prueba de hipótesis de las medias experimentales de la actividad enzimática entre la cepa C17C y C18A, permite evidenciar que los dos aislamientos no tienen diferencias estadísticas entre su actividad enzimática; el mismo resultado se obtuvo al comparar las medias experimentales de las actividades entre las cepas C23A y C24A, C17C y C24C2, C24C2 y C18A.

**Tabla 5.** Azúcares reductores (mg/mL) liberados por la hidrólisis de la celulosa y actividad celulolítica (U/mL) de los extractos enzimáticos.

Tiempo (horas)	Cepas Bacterianas									
	C17C		C18A		C23A		C24A		C24C2	
	mg/mL	U/mL	mg/mL	U/mL	mg/mL	U/mL	mg/mL	U/mL	mg/mL	U/mL
0	0.0	5.64 ±0.56	0.016 ±0.13	7.96 ±0.39	0.022 ±0.15	6.22 ±0.64	0.0	7.35 ±1.36	0.0	5.98 ±0.47
12	0.0	9.37 ±0.33	0.085 ±0.20	8.69 ±1.78	0.0	8.907 ±1.00	0.018 ±0.16	13.07 ±3.59	0.103 ±0.14	10.41 ±2.25
24	0.144 ±0.16	18.85 ±1.53	0.186 ±0.22	10.50 ±0.48	0.096 ±0.15	10.78 ±0.79	0.099 ±0.16	10.33 ±1.10	0.146 ±0.14	10.68 ±0.85
36	0.118 ±0.15	11.91 ±2.72	0.171 ±0.21	11.15 ±0.93	0.085 ±0.14	9.395 ±1.41	0.094 ±0.16	7.87 ±0.31	0.146 ±0.17	12.99 ±2.52
48	0.226 ±0.17	18.49 ±1.81	0.303 ±0.22	19.11 ±2.25	0.206 ±0.15	13.82 ±2.55	0.202 ±0.16	13.93 ±1.21	0.228 ±0.15	18.87 ±0.32
60	0.173 ±0.16	14.00 ±1.59	0.262 ±0.21	14.77 ±1.10	0.162 ±0.14	11.34 ±0.93	0.155 ±0.15	13.26 ±0.52	0.185 ±0.13	15.50 ±1.20

**Tabla 6.** Azúcares reductores presentes en el medio a las 48 horas de fermentación.

CEPA	Azuceres Reductores Residuales mg/mL	$\bar{X}$ Actividad Celulolítica 50°C (U/mL)	RH
C17C	0.2261±0.17	18.49±1.8	0.4
C18A	0.3034±0.22	19.11±2.3	2.3
C23A	0.2058±0.15	13.82±2.5	1.5
C24A	0.2021±0.16	13.93±1.2	4.5
C24C2	0.2284±0.5	18.87±0.32	1.3

Los extractos celulolíticos crudos obtenidos a partir de las aislamientos bacterianos seleccionados en este estudio (Tabla 6) presentaron actividades entre 50 y 425 mayores a las de otras celulasas bacterianas reportadas por otros autores. Es así como, celulasas producidas a partir de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, aislados de residuos de *Cola accuminata*, presentaron actividades enzimáticas entre  $0.383 \pm 0.015$  y  $0.300 \pm 0.010$  U/mL, a pH de 5.5 por 30 minutos a 37°C (Arotupin, Fabunmi, & Gabriel-Aj, 2015). Así mismo, se han reportado celulasas obtenidas a partir de *Bacillus* sp. aislados a partir de muestras de suelo con actividad celulolítica entre 0.045 y 0.075 U/mL, y *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad xilanasas por encima de 10.5 U/mL (Amore, y otros, 2015). Por otro lado, a partir de *Streptomyces griseorubens* JSD-1 aislado de muestras de suelo, se han reportado actividades celulolíticas tanto similares como superiores a las producidas por las cepas aisladas en este estudio. *S. griseorubens* JSD-1 produjo celulasas con actividad de  $16.83 \pm 0.79$  U/mL a pH 5, 30°C por 24 horas y 180 rpm; mientras que a pH 7.5 obtuvo endoglucanasas de  $39.25 \pm 1.12$  U/mL (Zhang, y otros, 2015).

### Resultados de la identificación de los microorganismos

Las cepas bacterianas amilolíticas A5B, A11A, A16C y A22A, fueron identificadas microscópicamente como

bacilos Gram positivos esporulados. Mediante caracterización molecular en la secuenciación del gen ribosomal 16S y su comparación en la base de datos RefSeq del NCBI se encontró, con un porcentaje de identidad del 99% y un porcentaje de cobertura del 100%, que las cuatro cepas correspondían a *Bacillus amyloliquefaciens*.

Las cepas celulolíticas C24A y C18A, también bacilos Gram positivos esporulados, fueron identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens* con un porcentaje de identidad del 99% y un porcentaje de cobertura del 100%, luego de la secuenciación del gen ribosomal 16S y su comparación en la base de datos. Por otro lado, los morfotipos C17C y C24C2, bacilos Gram negativos, fueron identificados molecularmente como *Yersinia massiliensis* con un porcentaje de identidad y cobertura del 99% para C17C y del 99% y 100% respectivamente, para C24C2. Según los resultados de identificación molecular, la cepa C23A, bacilo Gram negativo, corresponde a *Stenotrophomonas nitritireducens* con un porcentaje de identidad de 99% y un porcentaje de cobertura del 100%.

Todas las cepas amilolíticas seleccionadas corresponden a la misma especie bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens*, sin embargo, entre estas se presentan diferencias significativas entre títulos de actividad enzimática al comparar

los resultados de las medias experimentales de los extractos obtenidos a partir de A5B y A11A con los de A16C y A22A. Esta diferencia entre actividades amilolíticas de las cepas bacterianas aisladas podría ser aprovechada realizando cultivos mixtos que no presenten problemas de antagonismo y que puedan producir enzimas con diferentes características aplicables en diversos procesos. El uso de estas cepas a nivel industrial es promisorio, debido al uso generalizado de  $\alpha$  amilasas provenientes de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, gracias a la capacidad que tienen estas bacterias para producir amilasas termoestables, característica que ha permitido su amplio uso en la producción de enzimas comerciales (Singh, Sharma, & Soni, 2011; Gurung et al., 2013).

Al comparar las medias experimentales de los resultados de actividad enzimática de las cepas C17C, C18A y C24C2 se encuentra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre estas, es decir, que cualquiera de estos microorganismos podría ser utilizado indistintamente en la producción de celulasas, obteniendo actividades similares. Sin embargo, conviene más la utilización de la cepa C18A en procesos de obtención de enzimas debido a que esta pertenece a *Bacillus amyloliquefaciens* que no ha sido reportado como patógeno, a diferencia de las cepas C17C y C24C2 identificadas como *Yersinia massiliensis*, enterobacteria con potencial de patogenia para el hombre (Souza & Falcao, 2012; McNally, Thomson, Reuter, & Wren, 2016).

La actividad enzimática de proteínas secretadas por especies del género *Stenotrophomonas* ha sido evaluada. *Stenotrophomonas maltophilia* fue aislada por Dantur, Enrique, Welin, & Castagnaro (2015) a partir del intestino de *Diatraea saccharalis*, presentando una actividad endoglucanasa inferior a 0.22 U/mL y por Pawar, Dar, & Rajput (2016) a partir del intestino de *Achatina fulica* reportando una actividad endoglucanasa no detectable. Por el contrario, *Stenotrophomonas nitritireducens* C23A fue uno de los microorganismos seleccionados en este estudio por su título de  $18.49 \pm 1.8$  para celulasas.

En los cinco humedales muestreados, se logró el aislamiento de 55 cepas bacterianas amilolíticas y celulolíticas de las cuales se seleccionaron en este estudio 9 morfotipos. Actualmente, no se encuentran publicaciones específicas relacionados con la recuperación de microorganismos con capacidad para hidrolizar almidón y celulosa a partir de suelos de humedales. Este estudio es el primero en reportar la presencia de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Yersinia massiliensis* y *Stenotrophomonas nitritireducens* en los suelos de los humedales Cordoba, Guaymaral, La Conejera y La Florida con capacidad para

producir amilasas y celulasas, demostrando que se puede aprovechar la biodiversidad de estos ecosistemas propios de Bogotá como una nueva fuente importante de bacterias productoras de enzimas con propiedades específicas que podrían suplir diversas necesidades de la industria textil, alimentaria y de las fermentaciones. Aunque otros estudios de bioprospección se han realizado en los humedales de Bogotá estos se han enfocado en el aislamiento de microorganismos con diferentes propiedades. Así por ejemplo, Mora y Valencia (2006) aislaron microorganismos lipolíticos en el humedal Jaboque e identificaron *Bacillus* sp., y *Pseudomonas* sp, género en el que anteriormente se clasificaban algunas especies de *Stenotrophomonas* (Patil, Midha, Kumar, & Patil, 2016). Así mismo, en el humedal la Conejera se encontraron 10 cepas de actinomicetos nativos a partir de muestras de sedimentos y agua con potencial de detoxificación de mercurio (Rueda, Aikawa, Prada, & Franco-Correa, 2009). Las anteriores referencias junto con los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que los ecosistemas de humedales de Bogotá presentan carga microbiana con potencial uso en la producción de enzimas y otras aplicaciones biotecnológicas; reforzándose así la posibilidad de continuar y fortalecer estudios de bioprospección en estos nichos ecológicos.

Las cepas seleccionadas presentaron actividades amilolíticas y celulolíticas superiores a las reportadas en las investigaciones citadas previamente (Mora & Valencia 2006; Rueda et al., 2009; Singh et al., 2011; Sivakumar et al., 2012; Souza & Falcao, 2012; Gurung et al., 2013; Amore et al., 2015; Arotupin et al., 2015; Dantur et al., 2015; Dash et al., 2015; Kanpiengjai et al., 2015; Suganthi et al., 2015; Zhang et al., 2015; McNally et al., 2016; Patil et al., 2016; Pawar et al., 2016. Aunque a nivel comercial existen celulasas con aplicaciones industriales con títulos más bajos (0.17 – 10 Fpasa/mL) a los reportados en este estudio, también se encuentran otras con actividades más altas como por ejemplo de 40, 90 y superiores a 110 (Actividad celulosa total) Fpasa/mL (Singhania et al. 2010). Así mismo, amilasas comerciales provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens* (Ye, y otros, 2013) presentan títulos mayores a los de los extractos enzimáticos producidos por las bacterias seleccionadas en este trabajo. Cabe resaltar que en este estudio se tuvo en cuenta la actividad enzimática como parámetro inicial de selección de microorganismos productores de celulasas y amilasas, debido a que usualmente a mayor actividad enzimática menor dosis de la enzima será necesaria para el proceso de hidrólisis en el cual se aplicara (Novozymes, 2010). Sin embargo, a escala industrial además de buenos títulos se busca que estos sean estables a diferentes condiciones de pH y temperatura (Sharma & Satyanarayana, 2013), por eso es necesario

proseguir con investigaciones que permitan evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos, producidos a partir de las cepas seleccionadas, a diferentes condiciones de pH y temperatura.

## CONCLUSIONES

Las cepas amilolíticas y celulolíticas aisladas e identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Stenotrophomonas nitritireducens* y *Yersinia massiliensis* en este estudio, son productoras de enzimas con títulos aproximadamente de 1 a 107 veces superiores a los reportados en estudios previos, mostrándolas como una nueva alternativa para la producción de amilasas y celulasas bacterianas con potencial de aplicación en procesos industriales. Por tal razón, es necesario que se realicen tanto estudios de producción de amilasas y celulasas a partir de las bacterias seleccionadas utilizando diferentes sustratos de bajo costo así como la posterior purificación y caracterización de las enzimas producidas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el financiamiento de SENNOVA, dentro del grupo de investigación de procesos industriales NEURONA del centro de Gestión industrial, SENA regional Distrito Capital.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abd-elhalem, B., El-Sawy, M., Gamal, R., & Abou-Taleb, K. (2015). Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193–202.
- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., & Marcolongo, L. (2015). Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 573–581.
- Arotupin, D., Fabunmi, T., & Gabriel-Aj, R. (2015). Enzyme Activity of Microorganisms Associated with Fermented Husk and Testa of *Cola acuminata*. *Research Journal of Microbiology*, 10(10), 466–475. doi:10.3923/jm.2015.466.475.
- Bahadure, R., Agnihotri, U., & Akarte, S. (2010). Assay of population density of amylase producing bacteria from different soil samples contaminated with flowing effluents. *International Journal of Parasitology Research*, 2, 9–13.
- Canales, P., Chávez-Hidalgo, E., & Zavaleta, A. (2016). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 150-157.
- Cerón, L., & Ramirez, E. (2011). Actividad microbiana en suelos y sedimentos en el sistema córdoba juan amarillo, Bogotá D.C. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 349-361.
- Chand, P., Aruna, A., Maqsood, A., & Rao, L. (2005). Novel mutation method for increased cellulase production. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 318–323.
- Dantur, K., Enrique, R., Welin, B., & Castagnaro, A. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5(15). doi: 10.1186/s13568-015-0101-z.
- Dash, B., Rahman, M., & Sarker, P. (2015). Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *Bio-Med Research International*, 1-9. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2015/859805.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 1-18. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121.
- Hernández, J., Pérez, E., & Piñeros-Castro, Y. (2018). Identificación y evaluación de actividad celulolítica en aislamientos nativos de *Trichoderma* spp obtenidos de biomasa de palma de aceite. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 59-67.
- Huang, S., Sheng, P., & Zhang, H. (2012). Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 2563–2577. doi:http://www.mdpi.com/1422-0067/13/3/2563/htm.
- Jarvis, C., & Walker, J. (1993). Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(1), 53–57.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T., Haltrich, D., & Khanongnuch, C. (2015). Characterization of a maltose-forming  $\alpha$ -amylase from an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 1-8. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.010.
- Mandels, M. A., & Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and bioengineering symposium*, 6, 21-33.
- McNally, A., Thomson, N., Reuter, S., & Wren, B. (2016). Add, stir and reduce: *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 177–190.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. doi:https://doi.org/10.1021/ac60147a030.

- Mishra, T., Ahluwalia, S., & Joshi, M. (2014). Isolation and medium optimization for amylase producing bacterial strain isolated from potato field of Bhatinda, Punjab, India. *European Journal of Experimental Biology*, 3, 588–594.
- Mora, L., & Valencia, H. (2006). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad lipolítica provenientes de sedimentos del Humedal El Jaboque (Bogotá, Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 11, 108-109.
- Novozymes. (2010). <https://www.novozymes.com/es>. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/46027/2/2822323.2014%20Anexo.pdf>.
- Patil, P., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. (2016). Genome Sequence of Type Strains of Genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00309
- Pawar, K., Dar, M., & Rajput, B. (2016). Enrichment and identification of cellulolytic bacteria from the gastrointestinal tract of Giant African Snail, *Achatina fulica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1971–1980.
- Rodríguez, I., & Piñeros, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*, 14(2), 35–42.
- Rueda, C., Aikawa, M., Prada, L., & Franco-Correa, M. (2009). Evaluación de la presencia del gen *merA* implicado en la detoxificación de mercurio a partir de actinomicetos nativos del humedal de La Conejera. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 105–113.
- Sánchez, C., Mejía, C., Figueroa, C., Esquivia, M., Agudelo, L., & Zapata, N. (2005). Estudio de cepas nativas amilolíticas. *Vitae*, 12(2), 21–28.
- Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201–211.
- Singh, P., & Rani, A. (2014). Isolation and Partial Characterization of Amylase Producing *Bacillus* sp. from soil. *International Journal of PharmTech Research*, 6(7), 2064–2069.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(174). doi:<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
- Singh, S., Sharma, V., & Soni, M. (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 486–496.
- Singhania, R., Sukumaran, R., Patel, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549.
- Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., Muthukumar, J., & Nagendrakannan, E. (2012). Amylase Production Using *Bacillus cereus* Isolated from a Vermicompost Site. *International Journal of Microbiology Research*, 3(2), 117–123.
- Souza, R., & Falcao, J. (2012). Pathogenic Potential of the *Yersinia massiliensis* Species. *Advances in Yersinia Research*, 954, 223-228.
- Suesca, A. (2012). *Universidad Nacional de Colombia: Repositorio institucional UN*. Obtenido de Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10652>.
- Suganthi, C., Mageswar, A., Karthikeyan, S., & Muthukaliannan, K. (2015). Insight on biochemical characteristics of thermotolerant amylase isolated from extremophile bacteria *Bacillus vallismortis* TD6 (HQ992818). *Microbiology*, 84(2), 210–218.
- Teather, R., & Wood, P. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 43(4), 777–780.
- Téllez, A., Alvarez, G., & Roa, A. (2010). Diseño y puesta en marcha de un “sistema semicontinuo en dos etapas: hidrólisis - fermentación” para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Colombiana de Química*, 26(2), 1-10.
- Ye, F., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhao, W., & Zhang, W. (2013). Modification of stevioside using transglucosylation activity of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase to reduce its bitter aftertaste. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 524–530.
- Zhang, D., Luo, Y., Chu, S., Zhi, Y., Wang, B., & Zhou, P. (2015). Enhancement of Cellulase and Xylanase Production Using pH-Shift and Dissolved Oxygen Control Strategy with *Streptomyces griseorubens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 338–352.