

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN
LA DESCOMPOSICIÓN DEL TAMO DE TRIGO Y EVALUACION DE SU
CAPACIDAD FERMENTATIVA DE RESIDUOS FIBROSOS**

**JIM DENNIS BENAVIDES MELO
SANDRA XIMENA ZAMUDIO PORTILLA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO**

2002

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN
LA DESCOMPOSICIÓN DEL TAMO DE TRIGO Y EVALUACION DE SU
CAPACIDAD FERMENTATIVA DE RESIDUOS FIBROSOS**

JIM DENNIS BENAVIDES MELO

SANDRA XIMENA ZAMUDIO PORTILLA

Proyecto de Tesis presentado como requisito parcial

para optar al título de

BIÓLOGO CON ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA

Asesor : BENJAMIN SAÑUDO SOTELO. I.A.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

SAN JUAN DE PASTO

2002

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

	Pág.
1.ANTECEDENTES	4
2.MARCO TEORICO	6
DESCOMPOSICION DE RESIDUOS FIBROSOS	6
2.1.1COMPOSICION QUÍMICA DE LA PAJA DE TRIGO	8
MICROFLORA AEROBIA MESOFILICA	8
MICROFLORA ANAERÓBICA MESOFILICA	10
DESCOMPOSICION TERMOFILICA	13
DEGRADACION DE LA CELULOSA	14
DEGRADACION DE HEMICELULOSA Y DE PECTINA	15
DEGRADACION DE LIGNINA	18
3. METODOLOGÍA	22
ZONA DE MUESTREO	22
SELECCIÓN DEL TAMO DE TRIGO	22
ANALISIS MICROBIOLÓGICO	23
AISLAMIENTO	23

DETERMINACION DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO	25	
PURIFICACION	25	
IDENTIFICACION PARCIAL	26	
FERMENTACION		26
DESCARTE PRELIMINAR	26	
MICROORGANISMOS DEGRADADORES Y FERMENTADORES DEL		
SUSTRATO	27	
IDENTIFICACION	27	
FERMENTACION	27	
ANALISIS FISICO-QUIMICO		28
PH		28
ACIDEZ TOTAL		28
DETERMINACION DE ALCOHOLES SUPERIORES		29
FURFURAL		29
GLUCOSA		30
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
DETERMINACION DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO		31
IDENTIFICACION PARC		40
DESCARTE PRELIMINAR		40

CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>Zymomonas</i>.	41
CARACTERISTICAS GENERALES DE <i>A. niger</i>	42
ANALISIS FISICO-QUIMICO	43
5. CONCLUSIONES	
6. RECOMENDACIONES	
BIBLIOGRAFIA	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Comparación de los promedios de colonias de bacterias por gramo de tamo de trigo inicialmente descompuesto en cuatro medios de cultivo. Prueba de Tukey.	32
TABLA 2. Comparación de los promedios de colonias de bacterias por gramo de tamo de trigo parcialmente descompuesto en cuatro medios de cultivo. Prueba de Tukey.	33
TABLA 3. Análisis de varianza para el número de colonias de bacterias por gramo de tamo de trigo totalmente descompuesto en cuatro medios de cultivo.	34
TABLA 4. Análisis de varianza para el número de colonias de hongos por gramo de tamo de trigo inicialmente descompuesto en cuatro medios de cultivo.	36
TABLA 5. Análisis de varianza para el número de colonias de hongos por gramo de tamo de trigo parcialmente descompuesto en cuatro medios de cultivo.	37

TABLA 6. Comparación de los promedios de colonias de hongos por gramo de tamo de trigo totalmente descompuesto en cuatro medios de cultivo. Prueba de Tukey.	38
TABLA 7. PRODUCCIÓN DE GLUCOSA $\mu\text{g}/\text{dl}$ (10 DIAS)	44
TABLA 8. PRODUCCIÓN DE GLUCOSA $\mu\text{g}/\text{dl}$ (20 DIAS)	45
TABLA 9. PRODUCCIÓN DE GLUCOSA $\mu\text{g}/\text{dl}$ (30 DIAS)	46
TABLA 10. PRODUCCIÓN DE ACIDOS mg/l de ácido acético (10 DIAS)	49
TABLA 11. PRODUCCIÓN DE ACIDOS mg/l de ácido acético (20 DIAS)	50
TABLA 12. PRODUCCIÓN DE ACIDOS mg/l de ácido acético (30 DIAS)	51
TABLA 13. PRODUCCIÓN DE FURFURAL mg/l (10 DIAS)	54
TABLA 14. PRODUCCIÓN DE FURFURAL mg/l (20 DIAS)	55
TABLA 15. PRODUCCIÓN DE FURFURAL mg/l (30 DIAS)	56

LISTA DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. Análisis físico-químico de los fermentos de A. níger.	58
CUADRO 2. Análisis físico-químico de los fermentos de Zymomona sp. 1.	59
CUADRO 3. Análisis físico-químico de los fermentos de Zymomona sp. 2.	60

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
GRAFICA 1. Producción de glucosa	61
GRAFICA 2. Producción de acidos	62
GRAFICA 3. pH	63
GRAFICA 4. Producción de furfural	64

LISTA DE FOTOS

	Pág.
Foto 1. Aislamiento de microorganismos (diluciones).	65
Foto 2. Purificación de microorganismos en medios inclinados.	65
Siembra de <i>Zymomonas</i> en tubos con agar nutriente.	66
Foto 3. Fermentación (selección preliminar de microorganismos).	67
Foto 4. Fermentación.	67
Foto 5. Cultivo de <i>Zymomonas</i> sp 1 en agar nutriente.	68
Foto 6. Cultivo de <i>Zymomonas</i> sp2 en agar nutriente.	68
Foto 7. Microfotografía 1. <i>Zymomonas</i> sp1.	69
Foto 8. Microfotografía 2. <i>Zymomonas</i> sp2.	69
Foto 9. Cultivo de <i>Aspergillus</i> Níger en el medio de PDA.	70

Foto 10. Microfotografia 3. Aspergillus níger. 71

Foto 11. Microfotografia 4. Aspergillus Níger. 71

Dedicatoria:

Agradezco a Dios por el don de la vida, a mis padres, por su incondicional apoyo, a mis abuelitos, que con su presencia espiritual permanente, le dan fortaleza a mi existencia, a mis hermanos, familiares y amigos por su constante preocupación para mi superación, y en especial, la ofrezco, a la luz de mis ojos, María José y Juan Pablo, mis hijos...

Sandra Ximena.

RESUMEN

La producción industrial de materiales agrícolas de importancia económica genera una considerable cantidad de subproductos que no son aprovechados, sin embargo pueden ser utilizados como una fuente de carbono alternativa, motivando procesos fermentativos que permitan su uso.

Para el proceso de fermentación se utilizaron cuatro medios de cultivo nitrogenados, de los cuales el medio con sulfato de amonio permitió un mejor aislamiento de los microorganismos celulolíticos. Se identificaron dos bacterias del género *Zymomonas* y un hongo: *Aspergillus niger*.

Para determinar los compuestos que se forman de la degradación de celulosa se realizó el análisis físico-químico en diferentes lapsos de tiempo, tomando los siguientes parámetros: pH, acidez total, furfural, grado alcohólico, alcoholes superiores y glucosa.

ABSTRACT

The industrial production of agricultural materials with economical importance generates a considerable amount of by products and residues which aren't traditionally profited, these can be used as an alternative carbon source motivating fermentative process.

In order to the fermentative process, four nitrogenated culture means were used, where the mean with ammonium sulfate permitted the best cellulolytic microorganism isolation . They were identified two bacteriums from *Zymomonas* genus and fungus called *Aspergillus niger*.

To determinate the compounds obtained from the degradation of the cellulose it was made a physical – chemical analysis in different fermentation times with the following parameters: pH, Total acidity, phurfural, alcolic grade, superior alcohols and glucose.

INTRODUCCION

La producción industrial de materiales agrícolas de importancia económica genera una considerable cantidad de subproductos y residuos que tradicionalmente no son aprovechados, pero constituyen fuentes potenciales de materias primas, que con la aplicación de métodos microbiológicos pueden ser transformados a productos útiles en la alimentación humana y animal, así como también aprovecharse en la obtención de materiales de interés industrial, biológico y farmacéutico.

Entre los sustratos orgánicos que pueden ser utilizados figuran el bagazo de caña de azúcar, la caña de maíz, la pulpa de café, las pajas de cereales, etc. La cantidad y tipo de componentes (celulosa, lignina y proteína, entre otros) que poseen, los muestran como atractivos para llevar a cabo estudios que tengan la finalidad de obtener productos con un valor agregado mayor (Deacon, 1988).

El interés por la utilización de los residuos agrícolas como una fuente de carbono alternativa, ha motivado el desarrollo de procesos fermentativos que permitan su uso. De esta manera, la búsqueda de microorganismos capaces de degradar estos materiales para obtener azúcares solubles, puede entrar en competencia con los sustratos tradicionales que generalmente tienen un alto costo en el mercado.

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar microorganismos asociados con el tamo de trigo en descomposición, estableciendo su capacidad fermentativa de materiales fibrosos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el mejor medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos con capacidad celulolítica.

Identificar los géneros de bacterias y hongos con capacidad celulolítica presentes en la descomposición del tamo de trigo.

Determinar los compuestos que se formaron en la fermentación inducida con cada microorganismo identificado mediante análisis químicos cualitativos y cuantitativos.

1. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios en la degradación de materiales fibrosos:

Lucio, G e Izurieta, B (1984) determinaron experimentalmente las condiciones óptimas para la obtención de la celulasa del hongo *Trichoderma viride* QM 9123 y su utilización para degradar papel periódico.

Vicuña R. (1988) investigó los hongos conocidos genéricamente como cafés, así como ciertas bacterias, que degradan solo parcialmente la lignina. En este estudio se observó que *Streptomyces viridosporus* presenta una gran actividad al actuar sobre sustancias modelo de la lignina.

Yañez R, X. Llevó a cabo el estudio de fermentación de residuos de palma africana a partir de *Trichoderma longibrachiatum* DSM 768, para enriquecer proteínicamente el residuo para su posible uso en la alimentación animal.

El CIB (Centro de Investigaciones Biológicas en Brasil) (1994 - 1997) ha llevado a cabo varios estudios sobre el uso de cultivos (SSF) o enzimas de *Pleurotus* para la deslignificación de la paja de trigo, como un pretratamiento para la fabricación de pasta de papel.

Ponce M. et al. (1997) realizaron como proyecto la degradación de residuos lignocelulósicos que comprendió la identificación de las glucanasas producidas por *Cellulomonas flavigena* creciendo en diferentes fuentes de carbono. Trabajaron en la inmovilización de celulasas y xilanasas para incrementar los rendimientos de sacarificación y obtención de una cepa recombinante productora de xilanasas. Con los extractos enzimáticos con actividad de glucanasa (celulasas y xilasas) obtenidos de los mutantes de *Cellulomonas flavigena*, se puede llevar a cabo la sacarificación de diferentes residuos agrícolas para obtener azúcares solubles que sirvan de fuente de carbono para fermentaciones tales como producción de ácidos orgánicos, producción de gomas para la industria alimentaria, etc. Por otra parte los mismos extractos enzimáticos son utilizados en la industria de la pulpa y el papel en el preblanqueamiento de la misma, con una previa inactivación de las celulasas; en el acondicionamiento de granos y cereales para alimentación de aves y cerdos o para panificación, etc.

Ordoñez, V.H. en el año 2000 se refiere específicamente a las enzimas celulasas / hemicelulasas del hongo *Trichoderma longibrachiatum* (anteriormente *reesei*); además hace una presentación de las aplicaciones actuales más importantes de estos complejos enzimáticos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DESCOMPOSICION DE RESIDUOS FIBROSOS

Los compuestos orgánicos del carbono que se depositan en el suelo son degradados por actividad microbiana. En los sistemas naturales de vegetación como los bosques la cantidad de materia orgánica en el suelo es relativamente constante año tras año, lo cual trae como resultado que haya un equilibrio anual de las hojas, la materia orgánica formada y la capacidad de los microorganismos para degradar esos tejidos (Pelczar, R.1982). La gran diversidad de materiales vegetales que se incorporan al suelo, proporcionan a la microflora una gran variedad de sustancias heterogéneas tanto física como químicamente (Alexander, 1980).

Los polímeros estructurales de las paredes celulares de los vegetales que forman la mayor parte de los residuos terrestres son probablemente las moléculas orgánicas más abundantes en la biosfera. Predominan dos clases de polímeros estructurales: los polisacáridos, dotados de una estructura regular y la lignina, con polifenoles dispuestos al azar. Una pequeña cantidad de la proteína estructural rica en hidroxiprolina también se encuentra presente en las paredes primarias. Los polisacáridos forman la estructura principal de la pared y constan de

monómeros hexosa y/o pentosa unidos por enlaces glucosídicos (Deacon, 1988).

Las moléculas se clasifican en tres grupos: celulosa, el elemento fibrilar predominante, así como la hemicelulosa y las pectinas. La celulosa comprende aproximadamente del 40 al 50% de la pared celular de una planta madura y, por lo tanto, es el polímero más importante disponible para los hongos en una amplia gama de ambientes. La celulosa consta de un monómero, la glucosa, unido por un solo tipo de enlace, el β (1-4). Esta molécula está formada por cadenas lineales de hasta 3000 unidades de glucosa; estas cadenas se disponen ya sea al azar en la pared celular de la planta, constituyendo la llamada celulosa amorfa, o se pueden encontrar bien agrupadas en microfibrillas, constituyendo la llamada celulosa cristalina (Deacon, 1988).

Conforme la planta envejece, el contenido de constituyentes solubles en agua, proteínas y minerales desciende y el porcentaje de la abundancia de la celulosa, hemicelulosas y lignina se eleva. En base al peso, el grueso de la planta está constituido por celulosa, hemicelulosas y lignina (Alexander, 1980).

El desenmarañamiento de los mecanismos de hidrólisis enzimática de la celulosa es un desafío para bioquímicos, genetistas y microbiólogos y a aquellos quienes deseen explotar el potencial de la celulosa como fuente de líquido combustible y surtido de alimento químico (Coughlan, y Ljungdahl, 1988).

La microflora que descompone la celulosa es muy diversa, comprende especies aerobias mesófilas, aerobias termófilas, anaerobias mesófilas, y anaerobias termófilas; todas ellas utilizan celulosa como fuente de energía. Además de las bacterias, pueden atacar la celulosa algunos mohos y protozoos (Pelczar, 1982).

2.1.1 COMPOSICION QUIMICA DE LA PAJA DE TRIGO (EN % DE PESO SECO)

Componente	Paja de Trigo
Celulosa	34
Hemicelulosa	25
Lignina	13
Silice, Grasas, Ceras, Cenizas	28
TOTAL	100

Fuente: Quintero, R., 1981

2.2 MICROFLORA AEROBIA MESOFILICA:

Según Alexander (1980), los microorganismos celulolíticos son comunes en suelos de cultivo y forestales, en abono y en tejidos vegetales en descomposición.

La heterogeneidad fisiológica de la microflora responsable permite que la transformación tome lugar en hábitats con o sin O₂, con pH ácido o alcalino, a bajos o altos niveles de humedad y en temperaturas justo sobre el punto de congelación hasta el rango termofílico. Entre las especies que utilizan celulosa están bacterias mesofílicas aerobias y anaerobias, hongos filamentosos, basidiomicetos, bacterias termofílicas y actinomicetos. Aunque muchos de estos microorganismos han sido estudiados en cultivo puro, la acción en la naturaleza es claramente el resultado de una comunidad complicada. En el mejor de los casos, es difícil comparar cultivos puros con las numerosas poblaciones activas *in vivo*, ya que en el último caso hay una intensa competencia microbiológica por nutrientes y una serie de cambios en la composición de la flora con el tiempo.

Casi todas las bacterias que atacan la celulosa se han aislado de los géneros *Cellfalcicula*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga* (Jawet. et.al, 1973), además de *Cytophaga* y *Sporocitophaga*, otras myxobacterias clasificadas como especies de *Angiococcus* y *Polyangium* también se desarrollan en la celulosa. (Alexander, 1980). Así mismo, *Erwinia*, *Bacillus*, *Microbispora* y *Thermoactinomyces* degradan materiales fibrosos (Grant, y Long, 1989). Entre las bacterias celulolíticas aerobias también están *Microbispora bispora*, y *Thermonospora sp.* (Coughlan, y Ljungdahl, 1988).

Una notable bacteria celulolítica aerobia es *Cytophaga*, conteniendo especies importantes en la descomposición aeróbica de celulosa. Los miembros del género *Sporocitophaga* también utilizan la celulosa, estos difieren de las especies de

Cytophaga en su capacidad para formar microquistes. Algunas especies ocasionales de *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Bacillus* utilizan celulosa, pero este atributo fisiológico no es común en la mayoría de las especies de este género. El género *Bacillus* contiene bacilos aerobios Gram positivos formadores de esporas mientras que los otros géneros incluyen aerobios Gram negativos. Los actinomicetos que crecen en celulosa han recibido poca atención a pesar de su presencia durante la destrucción de materiales celulolíticos. Además de *Streptomyces*, algunas especies de *Micromonospora*, *Streptosporangium* y *Nocardia* son celulolíticas (Alexander, 1980).

2.3 MICROFLORA ANAEROBIA MESOFÍLICA:

Algunos microorganismos son capaces de descomponer la celulosa en ausencia total de oxígeno molecular y el polisacárido desaparece bajo anaerobiosis suministrado de forma purificada o en forma de materiales vegetales. La producción de grandes cantidades de etanol y ácidos orgánicos tales como el acético, fórmico, láctico y butírico es característico de la ruptura anaeróbica de la molécula de celulosa. Cuando un suelo se torna anaeróbico, la descomposición se lleva a cabo a través de la acción de bacterias que no requieren O₂. Los hongos o los actinomicetos no son de importancia en medios anaeróbicos.

A diferencia de la transformación en el aire, la conversión anaeróbica no es afectada en forma perceptible por la adición de nitrógeno inorgánico. Puesto que la descomposición anaeróbica proporciona poca energía, las bacterias deben

degradar grandes cantidades de sustrato para asimilar una pequeña cantidad de carbono. En consecuencia, existe una demanda proporcionalmente pequeña de nitrógeno para su asimilación dentro de las células microbianas, menor a la cantidad usualmente presente en residuos vegetales (Alexander, 1980).

Se conocen algunos tipos de microorganismos descomponedores anaerobios de celulosa: mesófilos y termófilos formadores de esporas, bacilos no formadores de esporas y cocos, y varios actinomicetos y hongos que crecen anaeróbicamente. En el mejor de los casos, la celulolisis sin O₂ es lenta sin tomar en cuenta el grupo de que se trate. La presencia de un sustrato fermentable a la exclusión de aire estimula a esta flora. A diferencia de las bacterias aerobias, estos organismos no son muy sensibles a la acidez y han sido encontrados en suelos con pH 4.3 (Alexander, 1980).

Las bacterias que descomponen celulosa pueden incluirse en los siguientes grupos: bacilos y cocos mesófilos esporógenos, gérmenes mesófilos y termófilos esporíferos y Streptomicetos. La mayoría de las bacterias de este carácter encontradas en la naturaleza son anaerobias esporógenas del género *Clostridium* (Pelczar, 1982). También *Rumminococcus* y las cepas bacteroides aisladas del rumen (Grant, y Long, 1989). Ejemplos de bacterias celulolíticas anaerobias son *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succionogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. (Coughlan, y Ljungdahl, 1988).

Los fermentadores anaerobios de celulosa más comunes en la naturaleza parecen ser los miembros del género *Clostridium*. Estas bacterias se encuentran en suelos, estiércol, fango de ríos y aguas negras. Los celulolíticos anaerobios que no forman esporas pueden existir en el suelo o en los sedimentos de las aguas negras, pero no son abundantes (Grant, y Long, 1989).

Las especies fúngicas celulóticas abarcan un gran número de hongos imperfectos activos en la putrefacción de la madera y los basidiomicetos, además las quitridas, tales como *Rhizophlyctis rosea*, y oomycetos, principalmente especies de *Pythium*, aparecen sobre los depósitos de celulosa en el suelo y en el agua. En raras ocasiones se ha confirmado la capacidad celulótica de los Zygomycetos, siendo una excepción la *Mortierella ramanniana*. La capacidad de hidrolizar la celulosa parcialmente degradada puede ser una característica difundida entre los hongos del suelo. De 300 especies aisladas de un tragal alemán, 47 ostentaban actividad celulolítica detectada por carboximetil celulosa soluble incluyendo especies de *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Truncatella*, *Gliocladium*, *Paaecilomyces*, *Chaetomium*, *Rhizoctonia*, *Myrothecium*, *Humicola*, *Aureobasidium*, *Penicillium* y *Verticillium* (Grant, y Long, 1989).

También *Lulworthia spp.*, *Halosphaeria hamata* y *Zalerion varium*, se encuentran en hojas y tallos en proceso de descomposición en hábitats estuarinos; los hongos de esporas tetraradiadas, como *Tetracladium*, *Lemonniera* y *Alatospora*, degradan hojas sumergidas en los arroyos. (Deacon, 1988). También hongos como *Merulius* y *Fomes* tienen la capacidad de desarrollarse lentamente en la celulosa en

ausencia de O₂. Los hongos con más fuerza celulolítica están representados por especies de los géneros: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Memnoniella*, *Phoma*, *Thielavia* y *Trichoderma*. (Alexander, 1980). Entre el mejor sistema caracterizado de la celulosa están aquellos de la pudrición blanca por el hongo *Phanaerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*) y aquellos de la pudrición blanda de los hongos, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma reesei*. El hongo *Neocallimastix frontalis*, estrictamente anaeróbico y encontrado en el rumen de bovinos, produce un sistema de celulasa extracelular que cataliza la extensiva hidrólisis de celulosa cristalina (Coughlan, y Ljungdahl, 1988).

2.4 DESCOMPOSICION TERMOFILICA:

En este caso la descomposición de la celulosa tomará lugar a altas temperaturas. A pesar de la alta distribución de las termófilas, es evidente que su papel en la descomposición de la celulosa en la naturaleza es mínimo.

Algunas especies anaerobias son capaces de disolver celulosa a temperaturas de 60 a 65°C. Estos microorganismos se encuentran muy difundidos en la naturaleza, en el suelo, el fango de ríos y el contenido intestinal de animales (Pelczar, 1982).

Los organismos aerobios y anaerobios pueden intervenir en las transformaciones termofílicas. A causa de las altas temperaturas asociadas la celulolisis es

particularmente fuerte. Un termófilo común es *Clostridium thermocellum*, un anaerobio formador de esporas que produce ácido acético, etanol, CO₂, H₂ y requiere bajos potenciales de oxido reducción para su proliferación. La temperatura óptima para la degradación de la celulosa por clostridios termofílicos es de 55 °C a 65 °C, con poca actividad debajo de 50 °C y sin crecimiento por arriba de los 68 °C. El pH óptimo esta alrededor del valor neutro (Alexander, 1980).

2.5 DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA:

Según Grant y Long (1989), la celulosa cristalina nativa es transformada en una molécula estructuralmente debilitada por lo que se denomina fragmento C1 de la celulosa, los productos de esta acción preliminar son posteriormente acortados en cuanto a la longitud de la cadena por los componentes Cx del complejo de la celulasa, para dar origen al disacárido celobiosa del que se libera la glucosa por la acción de las glucosidasas β 1-4. El componente C1 ha sido identificado como un endo- β 1-4 glucanasa, y se ha demostrado que el complejo Cx posee enzimas muy similares, que pueden contener 10 o más endo- y exo- glucanasas.

La enzima relacionada con el primer paso de la degradación de la celulosa actúa hidrolizando los enlaces covalentes de los puentes glucosídicos, a fin de exponer a las exo y endoglucanasas del complejo Cx los grupos reductores y no reductores

de las moléculas desacopladas de celulosa. A diferencia de otras endoglucanasas, dichas enzimas rompen los puentes de hidrógeno entre cadenas polisacáridas adyacentes, con el efecto subsiguiente de la hidrólisis penetrante de los cristales de celulosa. Las otras enzimas, incapaces por si mismas de organizar la celulosa cristalina, actúan sobre los oligómeros y acortan las cadenas de β 1-4 glucano a partir de las moléculas dispersas de celulosa, mejorando probablemente el acceso de la enzima C1 a los polisacáridos intactos en los cristales desorganizados (Grant, y Long, 1989).

No está claro si el esquema de secuencias (propuesto para ciertos hongos, tales como *Thichoderma*) es extrapolable a otras especies, particularmente las bacterias, cuyas celulasas están integradas a la pared, y a los basidiomicetos de la putrefacción blanca, donde dichas enzimas pueden encontrarse principalmente en el mucílago extracelular alrededor de las hifas. La degradación anaerobia de la celulosa en el rumen probablemente implique un sinergismo interespecífico entre las bacterias presentes. Los basidiomicetos de la putrefacción marrón no parecen poseer celulasas que degraden la celulosa nativa, aunque originan un debilitamiento difuso de las paredes y la eliminación del polímero al mismo ritmo que lo hacen otros hongos que si la utilizan (Alexander, 1980).

2.6 DEGRADACIÓN DE HEMICELULOSA Y DE PECTINA:

Cuando un residuo vegetal se agrega al suelo, su fracción de hemicelulosa desaparece inicialmente a una tasa rápida, pero la degradación subsiguiente parece ser más lenta. Varios hongos, bacterias y actinomicetos en cultivo puro pueden descomponer las hemicelulosas, usándolas frecuentemente como única fuente de carbono y energía. La capacidad de degradar estos carbohidratos se presenta en los principales grupos de hongos: *Hyphomycetes*, *Zygomycetes*, *Pyrenomycetes* e *Hymenomycetes*. Muchos géneros de hongos tienen la capacidad de usar uno o varios de estos polisacáridos y la velocidad de degradarlos puede ser lenta o extremadamente rápida. Aunque no se ha investigado extensivamente, las especies de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Cytophaga*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga*, *Xanthomonas*, son capaces de utilizar hemicelulosas como fuente de carbono. Las especies de *Streptomyces*, y sin duda otros géneros de actinomicetos, tienen capacidades fisiológicas similares (Alexander, 1980).

Muchas enzimas diferentes están relacionadas con la degradación de la hemicelulosa. Como regla general pueden estar involucrados tres tipos de catalizadores: a./ endoenzimas, que rompen al azar los enlaces entre las partes constitutivas del polímero; b./ exoenzimas, que extraen un solo dímero o monómero del extremo de la cadena del polisacárido, y c./ enzimas conocidas en conjunto como glicosidasas (Alexander, 1980).

La glicosidasa hidroliza los oligómeros o los disacáridos producidos de la hemicelulosa por las enzimas que fraccionan el polisacárido y que producen el azúcar simple o ácido urónico; este último es metabolizado dentro de la célula para producir energía. El polisacárido original es una molécula grande, de manera que una cierta cantidad de hemicelulosa tiene pocas terminaciones accesibles para el ataque. En consecuencia las endoenzimas son las principales responsables del fraccionamiento inicial. Sin embargo, una vez que las terminaciones se hacen numerosas por la acción de las endoenzimas -que con frecuencia no actúan (o lo hacen lentamente) sobre di o trisacáridos- aumenta la importancia de las exoenzimas a causa de que los polímeros complejos son a menudo ramificados (Alexander, 1980).

La degradación es frecuentemente obstaculizada debido a la incapacidad de muchas de las hemicelulosas de romper la ramificación, de manera que los productos de bajo peso molecular son aún un tanto complejos. En este caso, la rama en el producto es generalmente destruida por otra enzima. Alternativamente, la rama puede ser destruida enzimáticamente antes de que las endo o exoenzimas comiencen a actuar. Como en el caso de la celulosa, la formación microbiana de tales catalizadores está controlada por represión catabólica, de manera que si la tasa de hidrólisis extracelular del polímero excede la tasa a la cual son asimilados los productos por la célula, los azúcares simples que se acumulan detendrán la síntesis de más enzima (Alexander, 1980).

Al igual que las enzimas que fraccionan polisacáridos, las glicosidasas son específicas para sus sustratos y son nombradas de acuerdo a ellos. Así, la

xilosidasa actúa sobre los oligómeros de xilosa produciendo xilosa, y la manosidasa genera manosa de los oligosacáridos que contienen este azúcar. Después de esto, el último paso en la transformación de los polisacáridos en azúcares hidrosolubles es cuando la célula incorpora el monómero y lo usa para propósitos biosintéticos. Aunque las enzimas son específicas para sus sustratos, un solo organismo puede hacer uso de muchas hemicelulosas. Esto está acompañado por la excreción de un conjunto de enzimas. Por ejemplo *Fusarium oxysporum*, que crece en los componentes de tejidos de tomate, sintetiza arabanasa, xilanasa, galactanasa y glucosidasas (Alexander, 1980).

2.7 DEGRACION DE LA LIGNINA:

Los hongos que degradan la lignina a menudo parecen colonizar mucho tiempo después que los demás. Por lo general son basidiomycotina de crecimiento lento (Alexander, 1980). La lignina es el tercer constituyente más abundante de los tejidos vegetales. Esta es una molécula bastante compleja que requiere de toda una batería de enzimas para degradarse por completo, por lo que son relativamente pocos los hongos que la utilizan (Deacon, 1988). La lignina hace parte de las celulosas compuestas, es decir que son combinaciones de celulosa con otras sustancias, está constituida por pentosanas y compuestos aromáticos, con grupos fenólicos y metóxilos (con oxígeno y un solo carbono) (Coughlan, y Ljungdahl, 1988). .

Aparentemente la lignina es descompuesta de forma primordial por los basidiomicetos menos estudiados tales como los miembros de los géneros *Mycena*, *Collybia*, *Marasmius* y *Clavaria*, como también algunos ascomicetos, en concreto, las especies de *Hypoxylon* y *Xylaria* (Grant, y Long, 1989).

Hasta el momento no han podido ser identificadas inequívocamente ninguna de las enzimas implicadas, ni tampoco sus productos. Muchos de los estudios fisiológicos y genéticos han utilizado *Phanerochaete chrysosporium*. Los expertos sugieren que es necesario el contacto íntimo entre las hifas y la lignina. Los cambios en la composición química ocurren con la ruptura inicial *in situ* de los anillos aromáticos en el polímero y la liberación limitada de fenoles. Las monooxigenasas y posiblemente las fenoloxidasas, producen demetilación como paso inicial, pudiendo posteriormente hidroxilizar las unidades fenólicas en la superficie del polímero que son luego susceptibles a la escisión oxidativa del anillo por las dioxigenasas.

De este proceso resultan residuos alifáticos ricos en carboxilo cuyos enlaces éter sufren ataque por un mecanismo desconocido, produciéndose moléculas más cortas capaces de penetrar en las células fúngicas, donde se completa la oxidación (Grant, y Long, 1989).

Hasta el momento no han podido ser identificadas inequívocamente ninguna de las enzimas implicadas, ni tampoco sus productos. Muchos de los estudios fisiológicos y genéticos han utilizado *Phanaerochaeta chrysosporium*. Los expertos

sugieren que es necesario el contacto íntimo entre las hifas y la lignina. Los cambios en la composición química ocurren con la ruptura inicial *in situ* de los anillos aromáticos en el polímero y la liberación limitada de fenoles. Las mono-oxigenasas y posiblemente las fenoloxidasas, producen delimitación como paso inicial, pudiendo posteriormente hidroxilizar las unidades fenólicas en la superficie del polímero que son luego susceptibles a la escisión oxidativa del anillo por las dioxigenasas. De este proceso resultan residuos alifáticos ricos en carboxilo cuyos enlaces éter sufren ataque por un mecanismo desconocido, produciéndose moléculas más cortas capaces de penetrar en las células fúngicas, donde se complementa la oxidación (Grant y Long, 1989).

Algunas alteraciones químicas ocurren durante la descomposición de la lignina. Ya que los grupos metóxilo son abundantes en la molécula es de esperarse que se metabolicen conforme la lignina es degradada. Debido a su composición expuesta los grupos metóxilo están aún más propensos al rompimiento enzimático y son oxidados con mayor facilidad que el resto de la molécula (Alexander, 1980).

Además de los usos ya indicados anteriormente para la celulosa, existe un gran interés en el empleo de estas enzimas para la degradación previa de la celulosa y su posterior uso en procesos de fermentación productores de alcohol (Crueguer y Crueguer, 1989 y Gaseca y Hubble, 1990).

Un proceso de fermentación que utiliza bagazo, desarrollado en la Universidad de Louisiana, emplea un cultivo mixto de una bacteria celulolítica, *Cellulomonas*, y

una levadura, obteniéndose una proteína microbiana de alta calidad y no tóxica. Este proceso requiere de un tratamiento previo similar al de la hidrólisis enzimática. Por el momento el tratamiento con hidróxido de sodio de baja concentración y por largos periodos es el que da los mejores resultados (Quintero, 1981).

La producción de alcohol por *Z. mobilis* a partir de residuos agrícolas, requiere igualmente una hidrólisis previa antes de la fermentación. Se emplean cocultivos de *Z. mobilis* y de organismos celulolíticos, y *Z. mobilis* con enzimas celulolíticas (Arce, 1993).

Los problemas que en este momento limitan estas aplicaciones provienen de la disposición estructural de la celulosa, en su estado nativo. Generalmente, la preparación enzimática más efectiva es la obtenida a partir del hongo *Trichoderma reesei*. La preparación catalítica representa una mezcla de actividades celulásicas y celobiásicas. También está en el proceso la lignina, pero no es afectada por la preparación de celulasa comercial. Desafortunadamente, la actividad celobiásica en los preparados comerciales es baja y es inhibida por los productos de la hidrólisis (glucosa). Para evitar este problema, se puede añadir un suplemento de celobiasa de otras fuentes. Antes de efectuarse la degradación enzimática puede ser de utilidad llevar a cabo una serie de pretratamientos que permitan convertir la celulosa en formas más accesibles. Entre estos tratamientos se incluye el molido, y la extracción de lignina con soluciones de alcoholes superiores en caliente. Otras metodologías que también se han empleado con efectos positivos son el hinchado

químico con álcali, y la ruptura con vapor a presión y después se libera la lignina rápidamente de este tratamiento, con lo que se provoca la ruptura de las fibras. Este proceso ya se ha llevado a cabo a escala industrial, posiblemente más por razones económicas que por razones técnicas (Gaseca, y Hubble, 1990).

3. METODOLOGÍA

3.1. ZONA DE MUESTREO

La zona escogida fue el municipio de Tangua (Nariño), porque se encuentra entre las regiones trigueras más importantes a nivel departamental. El Municipio de Tangua se ubica a 28 Km al suroccidente de la capital. Su altura es de 2400 m.s.n.m., su temperatura media anual es de 14 °C, su pluviosidad media anual es de 1170 ml, el área municipal es de 239 Km² (Dueñas, 1993).

3.2. SELECCIÓN DEL TAMO DE TRIGO

Se tomaron 3 submuestras en un día de aproximadamente 100 g de tamo de trigo, en dos puntos diferentes teniendo en cuenta su descomposición de forma inicial, parcial y total, (Grant y Long, 1988). El material se transportó en bolsas de polietileno, desde el municipio de Tangua hasta el laboratorio de la Universidad de Nariño para su posterior análisis microbiológico.

3.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.3.1. AISLAMIENTO

Para aislar los microorganismos, se utilizó la metodología que se utiliza en laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño, donde se tomó de cada muestra en diferente estado de descomposición una cantidad de 10 g en 90 ml de solución peptonada al 0.1% contenidos en un erlenmeyer y se dejó por 1 hora en incubación a 25 °C. Posteriormente se hicieron diluciones en tubos con solución peptonada estéril al 0.1 %; desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶.

La siembra en cajas petri se hizo en superficie; tomando 1 ml de cada dilución y vertiéndola en cajas con los siguientes medios de cultivo con las proporciones que se utilizan en el laboratorio de la Universidad de Nariño:

Para el aislamiento de bacterias y hongos:

.

1.	Agar	20 g
	Tamo de trigo en polvo	20 g
	Urea	1 g
	Agua destilada	1 L

2.	Agar	20 g
	Tamo de trigo en polvo	20 g
	Fosfato de amonio	1 g
	Agua destilada	1 L
3.	Agar	20 g
	Tamo de trigo en polvo	20 g
	Peptona	1 g
	Agua destilada	1 L
4.	Agar	20 g
	Tamo de trigo en polvo	20 g
	Sulfato de amonio	1 g
	Agua destilada	1 L

Se utilizó cuatro fuentes de nitrógeno diferentes (sulfato de amonio, peptona, urea, fosfato de amonio), porque la celulosa es un polisacárido que no posee nitrógeno, por lo tanto los microorganismos la necesitan para sus actividades metabólicas.

Para el aislamiento de hongos se realizó el mismo procedimiento anterior, pero antes de verter el medio se hizo una acidificación con H_2SO_4 0.5 N y 1 ml por cada 100 ml de medio de cultivo después de esterilizar y cuando el medio tuvo

una temperatura de 50 °C aproximadamente.

Posteriormente se llevaron a incubación las cajas petri con los diferentes medios de cultivo, a una temperatura de 37 °C para bacterias y de 28 – 30 °C para hongos, por un periodo de 48 horas.

3.3.2 DETERMINACION DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO

Se realizó el conteo de los microorganismos en cada medio de cultivo, para obtener el promedio de colonias bacteriales y de hongos por gramo de tamo de trigo inicial, parcial y totalmente descompuesto. En el caso de las bacterias se tuvo en cuenta únicamente aquellas cajas petri que presentaron de 30 a 300 colonias bacteriales a diferencia de los hongos, que se contó la totalidad de los mismos por cada caja petri.

Mediante un análisis estadístico se determinó el mejor medio de cultivo, comparando los promedios de colonias de bacterias y de hongos por gramo de tamo de trigo inicial, parcial y totalmente descompuesto de los cuatro medios de cultivo evaluados: sulfato de amonio, peptona, fosfato de amonio y urea, el diseño utilizado fue irrestrictamente al azar con un factor y un error.

3.3.3 PURIFICACION

La purificación se llevó a cabo en tubos con el mejor medio estéril e inclinado. Para bacterias se utilizó Agar Nutritivo y para hongos APG + Acido.

3.3.4 IDENTIFICACIÓN PARCIAL

Los microorganismos aislados fueron identificados parcialmente mediante las pruebas rutinarias que se siguen en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño. (Tinciones de Gram, morfología y color de las colonias).

La identificación de los hongos se realizó con ayuda de las claves taxonómicas propuestas por Sañudo, 2001.

3.4. FERMENTACIÓN

3.4.1 DESCARTE PRELIMINAR

Se estandarizó el mejor medio de cultivo de los cuatro evaluados, es decir aquel que permitió el mayor número de colonias de bacterias y hongos.

Cada microorganismo parcialmente identificado se inoculó en tres recipientes,

cada uno con 100 ml de medio de cultivo estéril en forma líquida, un vial invertido y 1 ml de bromocresol púrpura al 0.3 %. La concentración de las bacterias en el medio fue de 10^7 bacterias por ml y la de los hongos fue de 10^6 esporas por ml. La concentración se determinó mediante conteo en la cámara de Newbawer .

Al mes de inducida la fermentación se observó la presencia de CO₂ al interior del vial, y el cambio de color en el medio, que pasa de ser púrpura a amarillo. El cambio de color se debe a que en la producción de ácidos orgánicos, esto se desionizan permitiendo la producción de hidrogeniones que acidifican el medio. Esto indica que el microorganismo inoculado puede degradar y posteriormente fermentar el sustrato.

3.4.2 MICROORGANISMOS DEGRADADORES Y FERMENTADORES DEL SUSTRATO

3.4.2.1 Identificación

Para la identificación de las bacterias se tuvo en cuenta la morfología, el color de las colonias y las tinciones de Gram, y finalmente se procedió a realizar las siguientes pruebas bioquímicas: glucosa, oxidasa, catalasa, indol y lisina (Holt, 1989).

En cuanto a los hongos se utilizó las claves propuestas por Sañudo, 2001.

3.4.2.2 Fermentación

Resaltamos que la celulosa puede transformarse a azúcares simples pasa de ser un polisacárido a un monosacárido o azúcar reductor para asimilarse en la célula y ser usado biosintéticamente.

Una vez reconocidos los microorganismos que pueden llegar a ser buenos degradadores y fermentadores de residuos fibrosos (paja de trigo), se realizó una nueva fermentación por triplicado, pero esta vez en recipientes con 400 ml de medio de cultivo estéril para la determinación de los azúcares reductores (glucosa), acidez total, pH, furfural, grado alcohólico y alcoholes superiores, empleando métodos de química analítica cuantitativa desde los 0, 10, 20 y 30 días de fermentación. Se tomaron muestras del fermento en cada tiempo, y se realizaron tinciones de Gram para determinar la presencia de contaminantes.

3.5 ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO:

El análisis físico - químico para las muestras de los fermentos se realizó con la asesoría del laboratorio de bromatología del Instituto Departamental de Salud de Nariño. Se determinaron los siguientes parámetros: acidez total, pH, furfural, grado alcohólico, y alcoholes superiores. El análisis de glucosa se realizó con la ayuda del Hospital Departamental y los métodos empleados para la determinación

de cada parámetro fueron:

3.5.1 pH: Potenciometría.

3.5.2. Acidez Total:

La acidez total se define como la totalidad de los ácidos tanto fijos como volátiles que contiene el fermento, expresada en mg por litro de alcohol anhidro, en ácido acético.

Se tomó 50 ml de muestra con pipeta volumétrica en un erlenmeyer, se adicionó 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con solución de hidróxido de sodio 0.01 N hasta obtener una coloración rosa.

Para su cálculo se toma la Acidez total, expresada en ácido acético en mg/l de alcohol anhidro: $V \cdot N \cdot 60 \cdot 1000 / V_a \cdot 100 / ^\circ \text{Alcohólico}$.

Donde: V = volumen de hidróxido de sodio gastado en la titulación.

N = Normalidad de la soda.

V_a = Volumen de la muestra.

°Alcohol = grado alcoholímetro de la muestra.

3.5.3 Determinación de metanol, acetaldehído, acetato de etilo y alcoholes superiores

(n - propanol, isobutanol, 2-metil-1-1 butanol, 3-metil-1-butanol), por cromatografía de gases.

Se trata de la separación, identificación y cuantificación de congéneres por cromatografía de gases (Sepharosa CL-GB, Pharmacia (GB) y LKB Instruments).

3.5.4 Furfural:

Se determina que el furfural es un precursor de la glucosa en la cadena metabólica de degradación de materiales fibrosos.

Su principio se basa en la destilación por arrastre de vapor y posterior medida espectrofotométrica de su absorción a 277 nm.

Para su procedimiento se necesitó destilar el fermento y así mismo leer la absorbancia del destilado en el espectrofotómetro a 277 nm, comparando con las lecturas efectuadas a las diluciones de referencia.

3.5.5 Glucosa:

Para medir esta sustancia se utilizó el sistema clínico Synchron CX4CE/CX5CE/CX7 este calibrador se lo utiliza para determinar la cantidad de glucosa en fluidos, utilizando una membrana de permeabilidad y una posterior espectrofotometría de luz, es un sistema espectrofotométrico computarizado. Para este proceso las muestras de fermento se filtraron después de la centrifugación de las cuales se lo llevaron en botellas al laboratorio del Hospital Departamental y de esta forma se introduce como mínimo 2 ml de las muestras del fermento en microtubos de calibración, determinando la cantidad de glucosa en mg/dl.

Los parámetros físico - químicos se interpretaron estadísticamente siguiendo el diseño irrestrictamente al azar con un factor y un error a los 10, 20 y 30 días de fermentación para cada uno de los microorganismos aislados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO:

El análisis estadístico del número de colonias de bacterias y hongos por gramo de tamo de trigo inicial, parcial y totalmente descompuesto se observan en las siguientes tablas:

TABLA 1.

**COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE COLONIAS
DE BACTERIAS POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO
INICIALMENTE DESCOMPUESTO EN CUATRO MEDIOS
DE CULTIVO. PRUEBA DE TUKEY**

	SULFATO DE AMONIO	UREA	PEPTONA	FOSFATO DE AMONIO
	720.29x10 ⁵	277.6x10 ⁵	272.71x10 ⁵	226.7x10 ⁵
226.7x10 ⁵	493.59x10 ⁵ NS	50.9x10 ⁵ NS	46.01x10 ⁵ NS	
272.71x10 ⁵	447.58x10 ⁵ NS	4.89x10 ⁵ NS		
277.6x10 ⁵	442.69x10 ⁵ NS			
720.29x10 ⁵				

TUKEY 5 % = 563.38x10⁵

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

TABLA 2.

**COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE COLONIAS
DE BACTERIAS POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO
PARCIALMENTE DESCOMPUESTO EN CUATRO MEDIOS
DE CULTIVO. PRUEBA DE TUKEY**

	SULFATO DE AMONIO	PEPTONA	FOSFATO DE AMONIO	UREA
	226.77x10 ⁵	187.79x10 ⁵	175.02x10 ⁵	133.8x10 ⁵
133.8x10 ⁵	92.97x10 ⁵ NS	53.99x10 ⁵ NS	41.22x10 ⁵ NS	
175.02x10 ⁵	51.75x10 ⁵ NS	12.77x10 ⁵ NS		
187.79x10 ⁵	38.98x10 ⁵ NS			
226.77x10 ⁵				

TUKEY 5 % = 318.56

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

TABLA 3.

**ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE COLONIAS DE BACTERIAS
POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO TOTALMENTE DESCOMPUESTO EN
CUATRO MEDIOS DE CULTIVO.**

FV	GL	SC	CM	FC	Ft	
TRATAMIENTOS	3	57,636.80	19,212.27	0.3144	1%	5%
ERROR	20	1,222,081.41	61,104.07		4.91	3.10

FV: Factor variable

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados de medios

Fc: Razón calculada

Ft: Razón tabulada

En las tablas 1, 2, 3 se observan los promedios de las poblaciones bacteriales por gramo de tamo de trigo inicial, parcial y totalmente descompuesto, encontrando que el medio que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno presenta el mayor número de colonias respecto a los medios, mostrando resultados cuantitativos con peptona, urea y fosfato amonio, pero sin diferencias significativas entre sí, lo cual indica que las diferentes fuentes de nitrógeno pueden ser utilizados por las bacterias, sea directamente como el amonio o después de su degradación como la peptona y la urea.

TABLA 4.

**ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE COLONIAS DE
HONGOS POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO INICIALMENTE
DESCOMPUESTO EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO.**

FV	GL	SC	CM	FC	Ft	
TRATAMIENTOS	3	113188563.1	37729521.03	2.60	1%	5%
ERROR	20	1968658254	98432912.7		4,94	3,10

FV: Factor variable

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados de medios

Fc: Razón calculada

Ft: Razón tabulada

TABLA 5.

**ANALISIS DE VARIANZA PARA EL NUMERO DE COLONIAS DE
HONGOS POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO PARCIALMENTE
DESCOMPUESTO EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO.**

FV	GL	SC	CM	FC	Ft	
TRATAMIENTOS	3	191166643x10 ¹⁰	6388881000	1.94	1%	5%
ERROR	20	6.5708535x10 ¹⁰	3285426750		4,94	3,10

FV: Factor variable

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados de medios

Fc: Razón calculada

Ft: Razón tabulada

TABLA 6.

**COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE COLONIAS
DE HONGOS POR GRAMO DE TAMO DE TRIGO
TOTALMENTE DESCOMPUESTO EN CUATRO MEDIOS
DE CULTIVO. PRUEBA DE TUKEY**

	SULFATO DE AMONIO	PEPTONA	FOSFATO DE AMONIO	UREA
	47051.03	36217.81	23264.75	9943.6
9943.6	37107.43 NS	26274.41 NS	13321.15 NS	
23264.75	23786.28 NS	12953.06 NS		
36217.81	10833.22 NS			
47051.03				

TUKEY 5 % = 76752.9896

X= Diferencia significativa

NS= Diferencia no significativa

Analizando las tablas 4,5 y 6 encontramos que la mayor cantidad de hongos por

gramo de tamo de trigo inicial, parcial y totalmente descompuesto, se encontró en el medio que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, pero sin diferencias significativas con respecto a los otros medios nitrogenados, lo que indica también la capacidad de dichos microorganismos de emplear cualquier fuente nitrogenada sea orgánica e inorgánica.

Aunque las diferencias entre el número de bacterias y hongos en los diferentes medios de cultivo no fueron significativas, el mayor número de colonias se observó en el medio que contiene sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Véase tablas 1 a 6). Es por esta razón que los microorganismos fueron aislados de este medio.

4.2 IDENTIFICACION PARCIAL

A partir del medio con sulfato de amonio se aislaron y purificaron 34 colonias de bacterias y 23 diferentes hongos; de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas.

4.3 DESCARTE PRELIMINAR

Con los microorganismos aislados y purificados se realizó una fermentación para seleccionar las bacterias y hongos capaces de degradar y fermentar el mejor medio de cultivo en estado líquido, teniendo en cuenta la producción de CO₂ y el cambio color del medio (prueba con bromocresol púrpura). Se lograron identificar dos bacterias correspondientes al género *Zymomonas* y un hongo *Aspergillus niger*.

4.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Zymomonas*

Características macroscópicas:

Descripción de las colonias:

- Borde entero
- Color crema
- Superficie lisa

Características microscópicas:

- Se agrupan en bacilos
- Gram negativos
- Tamaño: 2 a 6 micras de largo y de 1 a 4 micras de ancho.
- Poseen flagelos peritricos.

Pruebas bioquímicas:

Glucosa: Anaerobios facultativos.

Oxidasa: Negativo

Indol: Negativo

Lisina: Negativo

Catalasa: Negativo

4.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES *Aspergillus niger*:

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase Hyphomycetes

Genero: *Aspergillus*

sp. *niger*

Este hongo presenta conidióforos cortos, erectos y simples, generalmente no septados, que terminan en una hinchazón, donde se disponen fiálides, llevando cadenas de conidias hialinas a café, globosas y unicelulares.

4.6 ANALISIS FISICO - QUIMICO:

Los parámetros físico-químico se tomaron en diferentes lapsos de tiempo, como se muestra en las tablas siguientes:

TABLA 7.

PRODUCCIÓN DE GLUCOSA mg/dl. (10 DIAS).

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	23,5	0,46	0,35
0,35	23.15 X	0.11 NS	
0,46	23.04 X		
23,5			

TUKEY 5 % = 18,93

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa.

TABLA 8.

PRODUCCIÓN DE GLUCOSA mg/dl. (20 DIAS).

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	25,08	1,89	0,43
0,43	24.65 X	1.46 NS	
1,89	23.19 X		
25,08			

TUKEY 5 % = 21,09

X: Diferencia significativa.

NS: Diferencia no significativa

TABLA 9.

PRODUCCIÓN DE GLUCOSA mg/dl. (30 DIAS).

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	35.31	2.04	0.52
0.52	34.79 S	1.52 S	
2.04	33.27 S		
35.31			

TUKEY 5 % = 0.28

X: Diferencia significativa.

NS: Diferencia no significativa.

En la tabla 7 se observa que existe diferencia en la producción de glucosa a partir

de celulosa entre las bacterias y el hongo. Siendo éste último el que más cantidad de glucosa logra desdoblar del tamo de trigo. Entre las bacterias, *Zymomona sp. 1* logró producir mayor cantidad pero no presenta diferencia significativa con *Zymomona sp. 2*. Ello indica que el hongo tiene mayor enzimas degradativas más eficientes , tanto endo como exoenzimas, en cambio que las bacterias producen enzimas más específicas que únicamente pueden atacar ciertos enlaces de la cadena compleja por poseer menor carga enzimática, lo que lleva a que la producción de glucosa sea baja.

En la tabla 8, el hongo *Aspergillus niger*, sigue presentando una diferencia significativa con respecto a las bacterias *Zymomona sp. 1* y *Zymomona sp. 2* con 25,08 mg/l.

Transcurridos 30 días del proceso de fermentación, el hongo mantiene la diferencia respecto a las bacterias.

La cantidad de glucosa en el caso de *Aspergillus niger* durante el desarrollo de la fermentación aumenta desde la primera muestra, observándose en ésta última una cantidad de 35,31 mg/dl (Véase cuadro 1). La cual resulta ser significativamente alta respecto a las bacterias. En las muestras del fermento de *Zymomona sp. 1* y *Zymomona sp. 2*, ésta disminuye en los primeros días de fermentación respecto a la muestra inicial de 1.143 mg/dl a 0.46 mg/dl y 0.35 mg/dl respectivamente (Véase cuadro 2 y 3), ya que las bacterias utilizan inicialmente los azúcares simples para su crecimiento, además consumen

rápida producción de glucosa para la producción de ácidos, posteriormente se observa un incremento bajo hasta el último día de fermentación, confirmando que las bacterias secretan enzimas para desdoblar la celulosa, pero no en cantidad y calidad necesarias para producir cambios significativos. Presentes estos resultados por medio de gráficas implicadas en el texto.

Como en la gráfica 1 se puede observar más claramente la producción de glucosa por los diferentes microorganismos.

TABLA 10.

ACIDEZ TOTAL mg/l de ácido acético (10 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>Zymomona sp.</i>	<i>Zymomona sp.</i>	<i>A. níger</i>
	2	1	
	289	178	107,33
107,33	181.67 X	70.67 X	
178	111 X		
289			

TUKEY 5 % = 33,13

X: Diferencia significativa.

NS: Diferencia no significativa.

TABLA 11.

ACIDEZ TOTAL mg/l de ácido acético (20 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>Zymomona sp. 2</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>A. níger</i>
	305	180	168,66
168,66	136.34 NS	11.34 NS	
180	125 NS		
305			

TUKEY 5 % = 221.41

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa.

TABLA 12.

ACIDEZ TOTAL mg/l de ácido acético (30 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>Zymomona sp. 2</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>A. níger</i>
	367	203.66	178.66
178.66	188.34 X	25 X	
203.66	163.34 X		
367			

TUKEY 5%= 3.58

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa.

En la tabla 10 se observa una diferencia significativa en la acidez total entre los tres microorganismos, siendo *Zymomona sp. 2* quién produjo más cantidad de

ácidos con 289 mg/l, seguida de *Zymomona sp.1* con 178 mg/l y por último *Aspergillus niger* con 107,33 mg/l de ácido acético. Esto lleva a plantear la posibilidad de que las bacterias llevan la vía de degradación de la celulosa hasta estados intermedios y de allí la mayor producción de ácidos orgánicos.

La tabla 11 indica que en este caso, no se encuentran diferencias significativas entre microorganismos respecto a la producción de ácidos a los 20 días de iniciado el proceso de fermentación. Aunque la mayor cantidad la presenta *Zymomona sp. 2* con 305 mg/l de ácido acético.

A los 30 días de fermentación se observa que las diferencias en la acidez total vuelven a ser significativas, encontrándose la mayor cantidad en *Zymomona sp. 2* con 367 mg/l de ácido acético (Véase cuadros 1, 2 y 3).

Respecto a lo anterior, *Aspergillus niger* posiblemente utiliza la ruta de Embden Meyerhoff para oxidar glucosa produciendo ácido pirúvico tomando el ciclo de Krebs y las *Zymomonas* poseen un metabolismo fermentativo que es microaerófilico a naturaleza anaeróbica. Estas podrían emplear el ciclo de Entner - Doudoroff como vía para catabolizar glucosa hasta la formación de ácido pirúvico, este último en medio aeróbico se oxida produciendo ácido acético, observándose durante el proceso fermentativo realizado en *Zymomona sp. 1* y *Zymomona sp. 2* un aumento en la acidez total. También es posible que la glucosa producida por especies de *Zymomonas* sea degradada rápidamente con formación de ácidos orgánicos.

Al comparar el pH y la acidez total producidos durante el proceso de fermentación de los microorganismos aislados, se presentó un incremento del ácido, por lo tanto una disminución gradual de pH, obteniendo en la muestra final de *A. niger* una acidez total de 178.76 mg/L , *Zymomona sp.1* 207.66 mg/l y *Zymomona sp.2* 367 mg /l en ácido acético (Véase gráficas 2 y 3). De acuerdo a lo anterior la mayor eficiencia en la producción de ácidos la efectuó *Zymomona sp 2*.

TABLA 13.

PRODUCCIÓN DE FURFURAL mg/l (10 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	0,553	0,416	0,33
0,33	0.223 X	0.086 NS	
0,416	0.137 X		
0,553		TUKEY 5 %= 0,094	

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

TABLA 14.

PRODUCCIÓN DE FURFURAL mg/l (20 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	0,45	0,44	0,3
0,3	0.15 X	0.14 X	
0,44	0.01 NS		
0,45		TUKEY 5 %= 0,069	

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

TABLA 15.

PRODUCCION DE FURFURAL mg/l (30 DIAS)

PRUEBA DE TUKEY.

	<i>A. níger</i>	<i>Zymomona sp. 1</i>	<i>Zymomona sp. 2</i>
	0,54	0,446	0,35
0,35	0.19 X	0.09 X	
0,446	0.09 X		
0,54			

TUKEY 5 % = 0,06

X: Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

Las tablas 13, 14 y 15 muestran que durante el proceso de fermentación a los 10, 20 y 30 días *A. níger* un incremento la cantidad inicial de furfural debido a que es un subproducto de la fermentación (Véase cuadro 1). En *Zymomona sp 1* la

cantidad inicial de furfural disminuye periódicamente utilizándose probablemente como fuente adicional de carbono (Véase cuadro 2). Durante los primeros 20 días del proceso se detectó en el fermento de *Zymomona sp 2* una disminución del furfural. Y posteriormente un aumento de esta sustancia por las razones presentadas anteriormente (Véase cuadro 3). La gráfica ayuda a observar más claramente la producción de furfural.

ALCOHOLES SUPERIORES:

El grado alcohólico y la determinación de los alcoholes superiores no se pudieron determinar en la cromatografía de gases.

**CUADRO 1. ANALISIS FISICO - QUÍMICO DE LOS FERMENTOS
DE *Aspergillus niger*.**

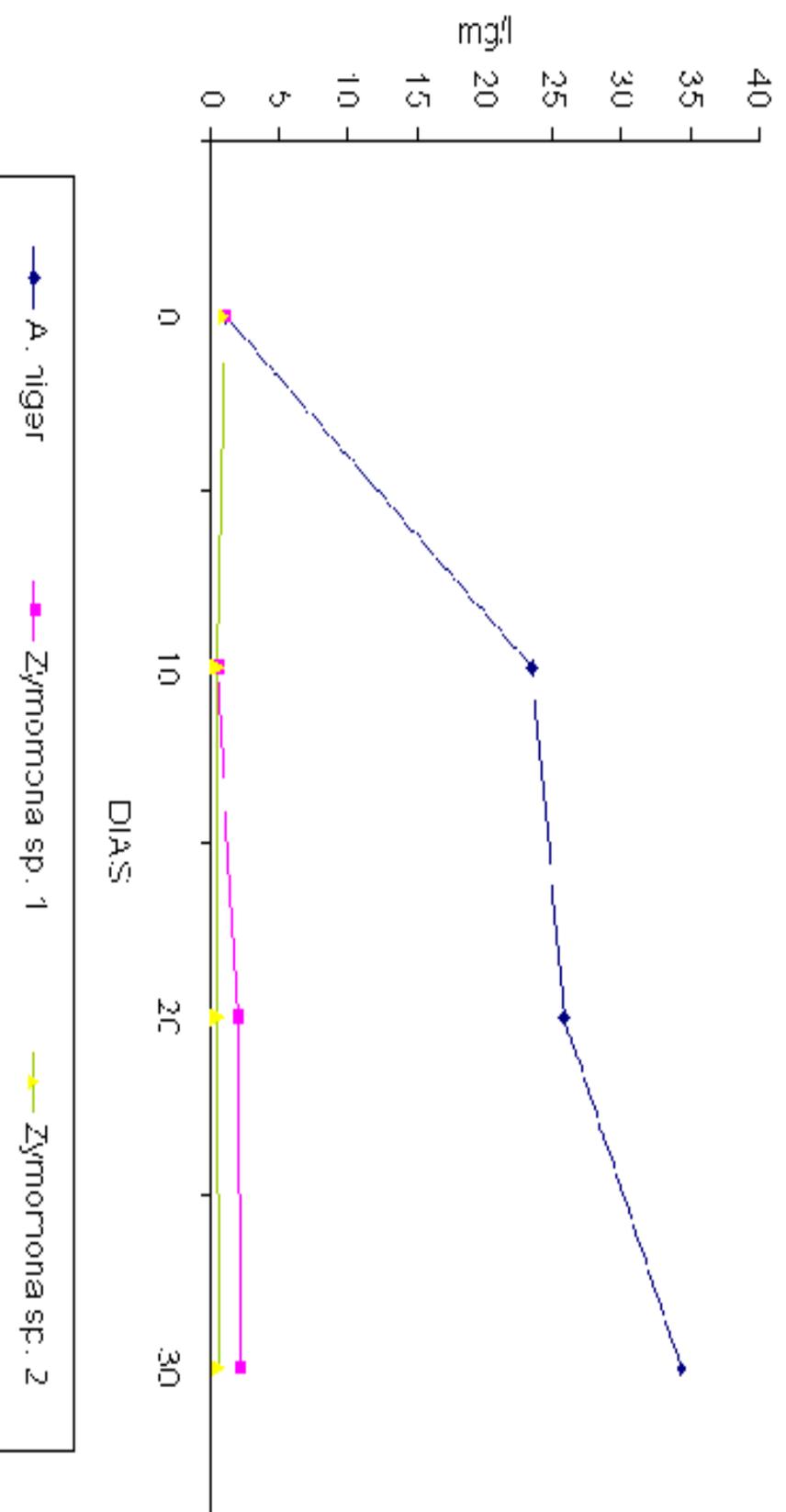
PARAMETRO	DIA 0	DIA 10	DIA 20	DIA 30
GLUCOSA mg/dl	1.143	23.5	25.08	34.3
ACIDEZ TOTAL mg/l	103	107.33	168.66	178.66
pH	6.07	5.96	5.91	5.86
FURFURAL mg/l	0.67	0.416	0.44	0.54

**CUADRO 2. ANALISIS FISICO - QUÍMICO DE LOS FERMENTOS
DE Zymomona sp. 1**

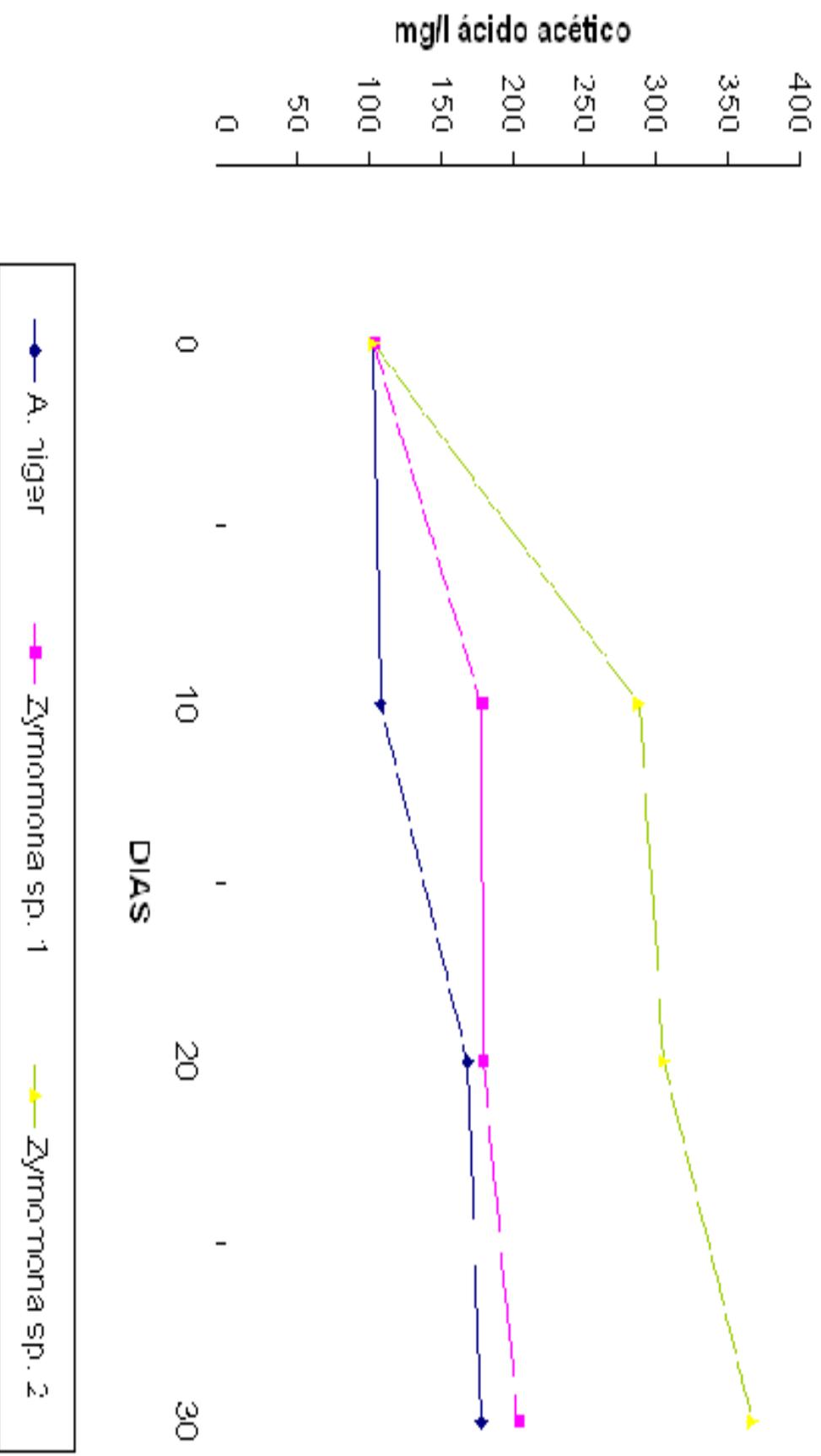
PARAMETRO	DIA 0	DIA 10	DIA 20	DIA 30
GLUCOSA mg/dl	1.143	0.46	1.89	2.04
ACIDEZ TOTAL mg/l	103	178	180	203.66
pH	6.07	5.81	5.72	5.7
FURFURAL mg/l	0.67	0.553	0.45	0.446

CUADRO 3. ANALISIS FISICO - QUÍMICO DE LOS FERMENTOS DE <i>Zymomona sp. 2</i>				
PARAMETRO	DIA 0	DIA 10	DIA 20	DIA 30
GLUCOSA mg/dl	1.143	0.35	0.43	0.52
ACIDEZ TOTAL mg/l	103	289	305	367
pH	6.07	5.02	4.93	4.9
FURFURAL mg/l	0.67	0.33	0.3	0.35

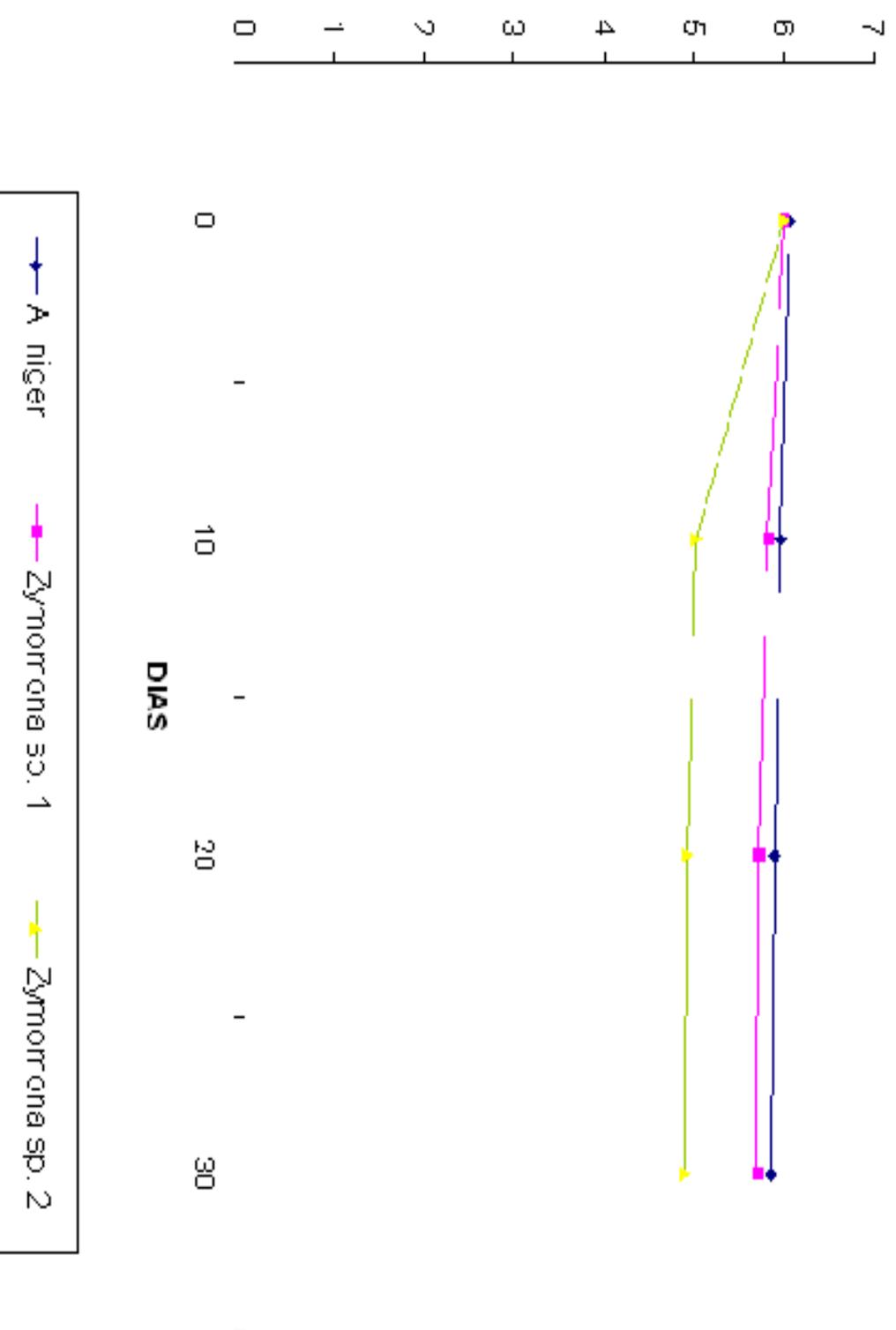
Gráfica 1
PRODUCCION DE GLUCOSA



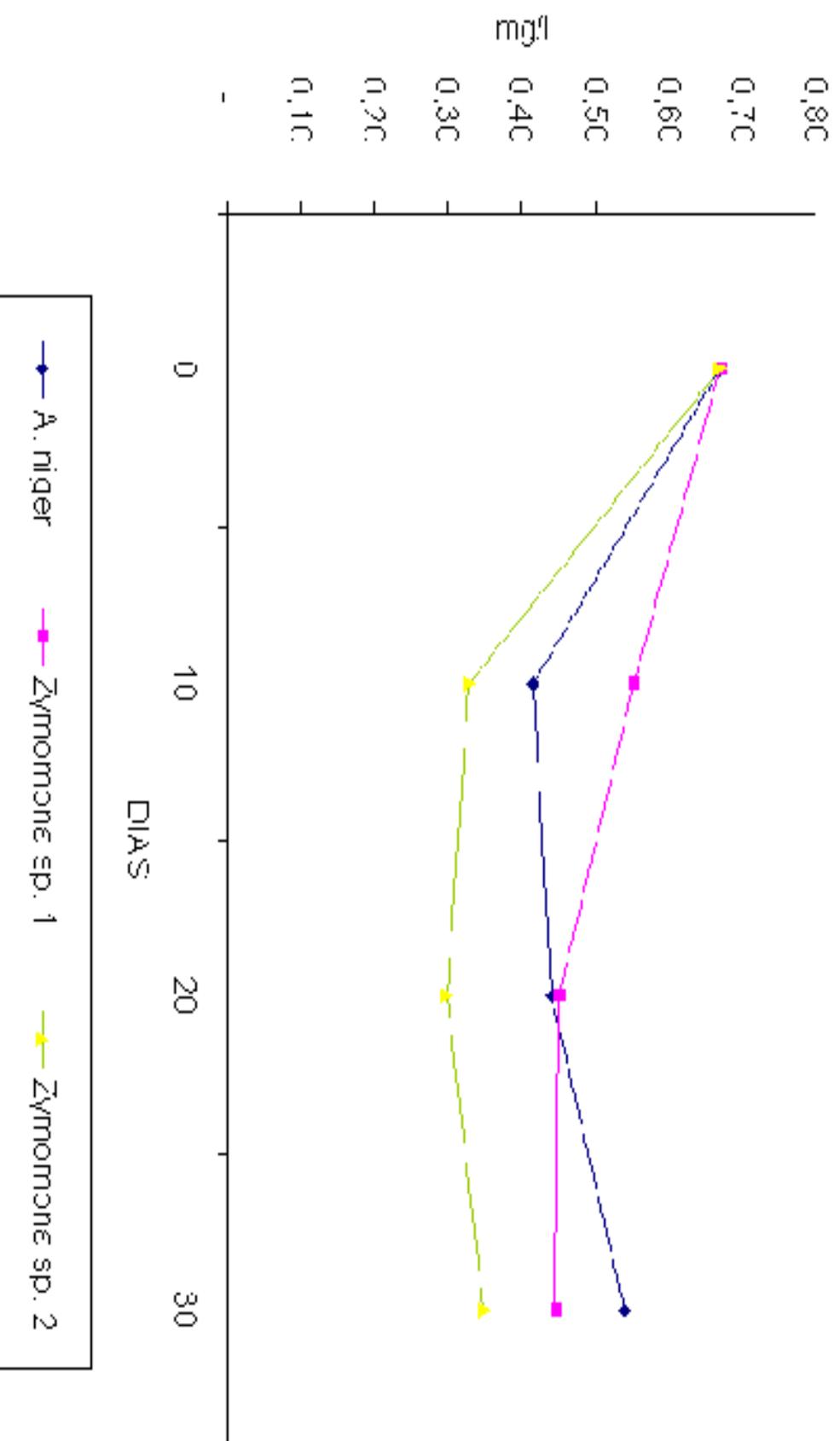
Gráfica 2.
ACIDEZ TOTAL



Gráfica 3.
pH



Gráfica. 4
FURFURAL



ANEXOS DE FOTOS



FOTO 1. Aislamiento de microorganismos (diluciones)



FOTO 2. purificación de microorganismos en medios inclinados



Foto2.
de

Siembra

Zymomonas en tubos con agar nutriente.



Foto 3. Fermentación (selección preliminar de microorganismos).



Foto 4. Fermentación.



Foto 5. Cultivo de Zymomona sp 1 en agar nutriente.



Foto 6. Cultivo de Zymomona sp2 en agar nutriente.

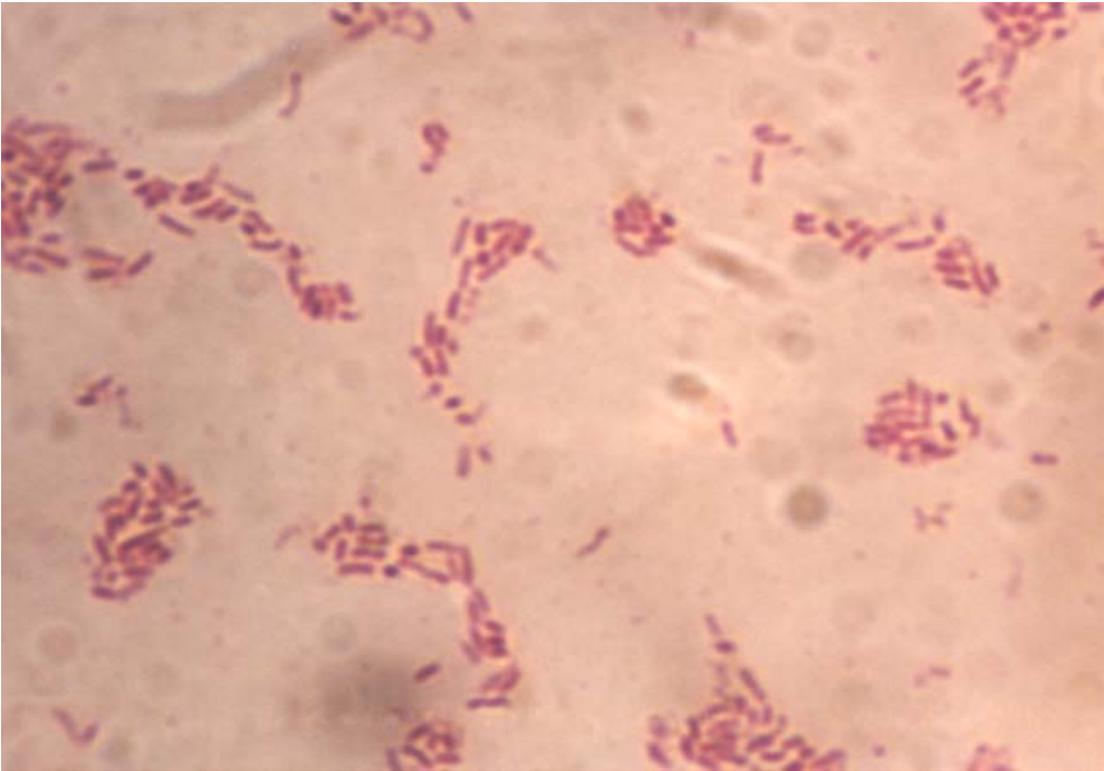


Foto 7. Microfotografia 1. Zymomonas sp1.

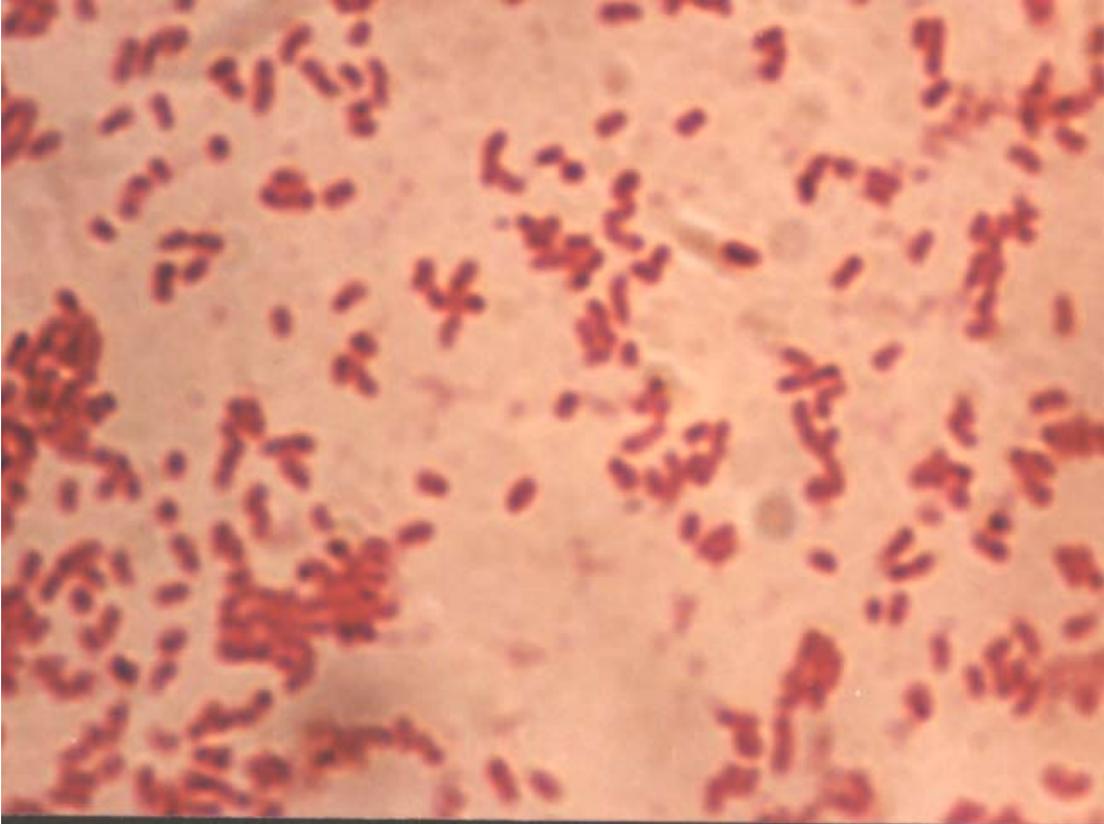


Foto 8. Microfotografia 2. Zymomonas sp2.

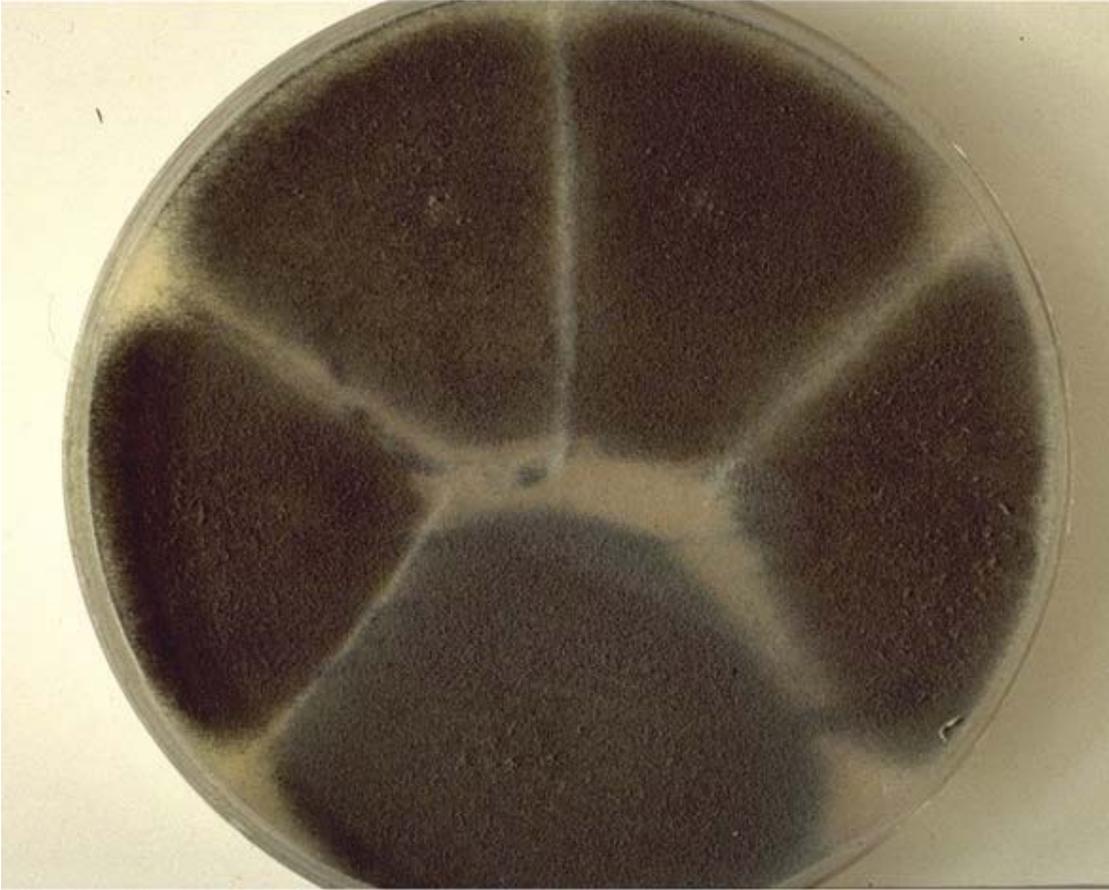


Foto 9. cultivo de *Aspergillus niger* en el medio de PDA.

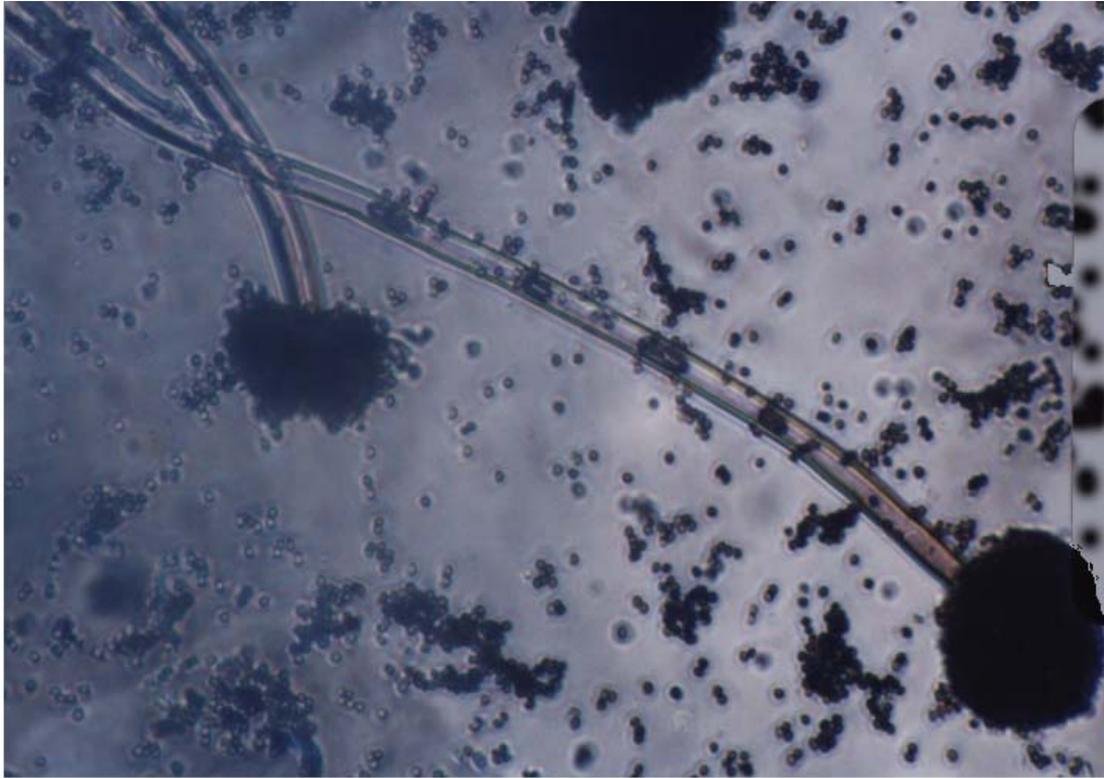


Foto 10 Microfotografia 3. *Aspergillus niger*.



Foto 11 Microfotografia 4. *Aspergillus niger* .

BIBLIOGRAFIA

ARCE, M, Et al. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México 1993.

QUINTERO, J. Bacteriología para el aprovechamiento de los residuos orgánicos. AGT Editar . S.A. México 1981.

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. Departamento de Biología Molecular. CIB. [Http // www.hcs.ohio-state. edu/pod/pod. html](http://www.hcs.ohio-state.edu/pod/pod.html). Brasil 1994 - 1997.

COUGHLAN, M. Y LJUNGDAHL, L. Comparative Biochemistry of fungal and bacterial Cellulolytic Enzyme Systems Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Academic Press Limited. USA. 1988.

CRUEGUER, W. y CRUEGUER, A. Manual de Microbiología Industrial. Tercera Edición. Barcelona, 1989. Edit. Acribia.

DEACON, J.W. Introducción a la micología moderna. Primera Edición. Editorial Limusa. México 1988.

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA. CINESTAV-IPN.
e-MAIL: [www mail. cinestav.mx](http://www.mail.cinestav.mx). México D.F. 1998

DUEÑAS, J.V. Nariño 93 años. Sinopsis Histórica, Geográfica, Económica y Social. 1993.

GEOVANNA LUCIO R. y BOLIVAR IZURIETA A. Politécnica. Vol. IX No. 1. Quito Ecuador. 1984.

GRANT, W.D. y LONG, P.E. Microbiología Ambiental. Edit. Acribia. Barcelona, 1989.

HENAO, S.J. Química orgánica. Editorial Bedout. 11 edición. Medellín 1980.

HOLT. J.G. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology, Ed Wwco. Volúmen 4. Baltimor. USA.1989.

JAWET, E.; HEWICK, J.L. y ALDELBERG, E. Manual de microbiología médica. Quinta Edición. Manual Moderna S.A. México, 1973.

NUÑEZ, M.J. CIT. Información Tecnológica. Vol. 1 N° 1. Edit. La Serena. Chile, 1990

ORDOÑEZ VICTOR H. Producción de enzimas microbianas y sus aplicaciones en la industria. Segundo congreso internacional de Microbiología Industrial, 10-12 de mayo de 2000. Santafé de Bogotá. D.C.

PALACIO LLAMES, Hernán. Fabricación del alcohol. Salvat Editores S.A. México 1956.

PELCZAR, REID y CHAN. Microbiología. Cuarta Edición. Segunda en español MC Graw-Hill. México, 1982.

SALLE, A.J. Bacteriología. Segunda Edición. Editorial Acribia. Barcelona, 1945.

SAÑUDO SOTELO, B, et al, Fundamentos de Micología Agrícola, editorial Universitaria, Universidad de Nariño, Pasto 2001. Colombia.

SPROAT KENT. Mutagénesis dirigida para la producción de enzimas. Segundo congreso internacional de Microbiología Industrial, 10-112 de mayo de 2000. Santafé de Bogotá D.C. Colombia.

5. CONCLUSIONES

Para el aislamiento de hongos y bacterias con capacidad celulolítica fue, la fuente de nitrógeno la cual puede ser variable en los medios de cultivos.

Se identificaron 3 microorganismos que podían degradar y posteriormente fermentar residuos fibrosos, dos bacterias correspondientes al género *Zymomona*, y un hongo *Aspergillus niger*.

El hongo *Aspergillus niger* produjo mayor cantidad de glucosa en el proceso de fermentación con respecto a las bacterias *Zymomona* sp. 1 y *Zymomona* sp. 2.

Durante el proceso de fermentación *Zymomona* sp. 2 es la bacteria que más cantidad de ácido produjo.

Tanto *A. Níger* como *Zymomonas* sp. 1 y sp. 2 pueden llevar la degradación de celulosa, hasta estados intermedios y de allí la mayor producción de ácidos, sin producción detectable de alcoholes superiores.

6. RECOMENDACIONES

Se puede utilizar un cultivo mixto, utilizando en primer lugar *Aspergillus niger* para desdoblar los compuestos fibrosos y posteriormente *Zymomonas sp.2* para la producción de ácidos.

Realizar la fermentación en condiciones de anaerobiosis con *Zymomonas* para la producción de etanol a partir de residuos fibrosos que contengan elevada concentración de celulosa y que se puedan utilizar como fuentes de producción de glucosa y degeneración de otros derivados, por reacciones naturales o inducidas.