



Contribución al desarrollo de una producción agropecuaria eficiente y sostenible en Ecuador con el uso de bioproductos microbianos autóctonos

Contribution to the development of an efficient and sustainable agricultural production in Ecuador with the use of native microbial bioproducts

Ángel Guzmán¹
pelijad@yahoo.com

Diego Zambrano¹

Ana Rondón²

¹Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Ecuador

²Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Cuba

Artículo recibido en octubre de 2016, arbitrado enero de 2017 y publicado en mayo de 2017

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento y la selección de microorganismos autóctonos (hongos y bacterias) degradadores de materia orgánica fibrosa. Se emplearon para el aislamiento medios de cultivos que contenían como fuente de carbono a la celulosa. Se seleccionaron las cepas que produjeron un halo de hidrólisis incoloro alrededor de la colonia en el medio Carboximetilcelulosa y en el medio almidón. La cepa bacteriana A.O-19 presentó la mayor actividad CMCasa con 12,33 mm mientras que la cepa B.M-1 demostró mayor actividad amilolítica con 9,33 mm de diámetro de halo de hidrólisis. En las cepas fúngicas la A.Q-8 presentó la mayor actividad CMCasa con 10,33 mm. Mientras que la cepa A.Q-7 presentó la mayor actividad amilolítica con 12,00 mm de diámetro de halo de hidrólisis.

Palabras clave: producción agropecuaria eficiente y sostenible; bioproductos; microbianos

ABSTRACT

In the present study, the isolation and selection of autochthonous microorganisms (fungi and bacteria) degrading fibrous organic matter was carried out. Culture media containing cellulose as the carbon source were used for the isolation. The strains that produced a colorless hydrolysis halo around the colony in the Carboxymethylcellulose medium and in the starch medium were selected. Bacterial strain A.O-19 showed the highest CMCCase activity with 12.33 mm while strain B.M-1 showed greater amylolytic activity with 9.33 mm hydrolysis halo diameter. In the fungal strains, A.Q-8 showed the highest CMCCase activity with 10.33 mm. While strain A.Q-7 showed the highest amylolytic activity with a diameter of 12.00 mm of hydrolysis halo.

Key words: efficient and sustainable agricultural production; bioproducts; microbial

INTRODUCCIÓN

El impacto ecológico producido por la agricultura convencional, está llevando a comprender sus grandes limitaciones para resolver el problema de la seguridad alimentaria, especialmente en los países en vía de desarrollo. Su aplicación no solo ha provocado la degradación de los recursos naturales (agua, suelo y vegetación), sino también es responsable de la pérdida paulatina del conocimiento o saber campesino en el manejo de los diversos sistemas de producción. Dentro de este modelo de agricultura convencional el recurso suelo es considerado simplemente como un soporte en el cual se incorporan los nutrientes para el desarrollo de las plantas y se aplican agroquímicos sin ninguna consideración medioambiental; no se logra entender que este recurso tiene vida y su dinámica está estrechamente relacionada con los ciclos de la naturaleza y es un recurso no renovable a corto plazo. (Linares y Monedero, 2004).

Precisamente uno de los procesos ecológicos que tiene lugar en el suelo agrícola es el ciclaje de nutrientes donde participa la microbiota del suelo descomponiendo la materia orgánica para liberar los elementos contenidos en ella. En estado natural este proceso se ve condicionado por factores ambientales y antropocéntricos en dependencia al modelo de agricultura implementado en el agrosistema, lo cual conduce al desarrollo y uso de tecnologías en procura de potenciar la actividad microbiana en el aprovechamiento de los desechos y residuos orgánicos generados tanto en la ciudad como en el sector rural.

La ansiada seguridad y soberanía alimentaria declarada en la constitución y leyes del Ecuador, nos conduce a generar alternativas prácticas que reduzcan la dependencia tecnológica foránea. En el campo de la microbiología vegetal resulta de vital importancia hacer uso de la diversidad biológica, que caracteriza a nuestro país, para potenciar los procesos ecológicos dentro de

los agrosistemas, como por ejemplo el ciclaje de nutrientes a través de la descomposición de la materia orgánica.

La disposición final de la gran cantidad de residuos orgánicos producidos en el mundo representa un problema que afecta al medio ambiente, en los actuales momentos se busca reducir la masa de estos tipos de residuos mediante la implementación de métodos biotecnológicos que contribuyan a disminuir su volumen y a favorecer su reutilización. (Diorio et al., 2003).

El suelo es el componente básico de los ecosistemas terrestres, algunos edafólogos lo definen como un teatro maravilloso de la vida, no solo por la diversidad que alberga sino porque funciona como reciclador de la materia orgánica y controlador, tanto de la dinámica de la circulación de nutrientes como de los flujos de energía. (Chamorro, 2001).

Al contar con microorganismos autóctonos, plenamente seleccionados e identificados capaces de realizar funciones específicas en la transformación de la materia orgánica se da la oportunidad de desarrollar biotecnologías propias para el manejo de los desechos y residuos orgánicos, a través de compostaje y convertirlos en abonos que contribuyan en la implementación de un modelo de agricultura eficiente y sostenible.

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4. Estas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas. Cuando a lo largo del haz de cadenas se rompen los puentes de hidrógeno se forman regiones denominadas amorfas, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático. (González, et al., 2002).

En los actuales momentos en el Ecuador existen presentaciones comerciales de

microorganismos, etiquetados como eficientes para la degradación y compostaje de la materia orgánica, cuyo lugar de origen corresponde con características edafoclimáticas muy diferentes a la nuestra, en muchas ocasiones no se les ha comprobado su acción e inocuidad para poder aplicarlas en nuestro medio.

Propiedades de las enzimas

Las enzimas presentan tres propiedades que son: contienen un sitio activo o catalítico la cual es una región que se pone en contacto con el sustrato; la especificidad que la capacidad de la enzima para poder reconocer el reactante (llamado sustrato) de la reacción que acelera, además determina que sustrato es el que se usa para la reacción enzimática y por último la afinidad que es la capacidad de la enzima para determinar cuánto sustrato utiliza para iniciar su función de acelerar la reacción bioquímica. (Grajales, 2005).

Factores de crecimiento

La célula microbiana está compuesta por una multitud de compuestos orgánicos que conjuntamente determinan su estructura y su actividad fisiológica; estos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas entre otros, ciertos organismos son incapaces de producir una o más sustancias esenciales, por lo tanto

para que puedan sobrevivir y desarrollarse, debe existir fuentes externas disponibles de estas sustancias, las cuales se toman del exterior y son llamados factores de crecimiento, que son compuestos orgánicos que en pequeñas concentraciones promueven el crecimiento. (Anaya, 2003).

Objetivos

Aislar cepas autóctonas de microorganismos degradadores de materia orgánica fibrosa en diferentes hábitats. Seleccionar las cepas de microorganismos más eficientes de acuerdo a características deseables.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se condujo en el laboratorio de biología molecular de la Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López.

Fases de la investigación aislamiento de cepas factor en estudio

Forma de captura (c). Hábitats (h).

Niveles.

C1= suelo. C2= trampa. H1= bosque.
H2= área convencional. H3= área orgánica.
H4= área residuos caña

Cuadro 1. Tratamientos.

N ^o	Código	Descripción	Hábitats
		Forma de captura	
1	C1H1	Suelo	Bosque
2	C1H2	Suelo	Área química
3	C1H3	Suelo	Área orgánica
4	C1H4	Suelo	Área caña azúcar.
5	C1H5	Suelo	Compost
6	C2H1	Trampa	Bosque
7	C2H2	Trampa	Área química
8	C2H3	Trampa	Área orgánica
9	C2H4	Trampa	Área caña azúcar.
10	C2H4	Trampa	Compost

Aislamiento de microorganismos. Los microorganismos (bacterias y hongos) celulolíticos y amilolíticos fueron aislados por diluciones seriadas (Stanier 1996), y se sembraron en placas en un medio cuya única

fente energética era la celulosa (ver cuadro 2), por triplicado. Posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C las cepas bacterianas y las fúngicas de 3 a 5 días a 30°C.

Cuadro 2. Composición del medio de selección.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	(g/L)
AGAR NUTRITIVO MODIFICADO. (bacterias)	Peptona	6
	Extracto de levadura	2
	Cloruro de sodio	5
	Celulosa	15
	Agar	15
	Ajustar pH	
	7.3+/-2	
MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	(g/L)
AGAR SABORAUD MODIFICADO (hongos)	PEPTONA	10
	Celulosa	15
	Agar	15
	Ajustar pH 5.6+/-2	

Capturadores (trampas). Se empleó el método evaluado por (Benavides Hermida, 2008), para lo cual se prepararon placas para colocarlas en el campo pero se modificó la composición de los medios de cultivo se utilizó el agar nutriente para bacterias y el agar sabouraud para hongos filamentosos enriquecidos con celulosa, las cajas se ubicaron a una profundidad de 10cm de profundidad en los mismos puntos de localización de donde se extrajo la muestra de suelo como fue del, área del bosque,

convencional, orgánica, caña de azúcar y de compost, transcurridas 24 horas las placas con agar nutriente para bacterias, se retiraron y se llevaron al laboratorio, mientras que para los hongos se lo realizó a las 72 horas. Las cepas de microorganismos (hongos y bacterias) que se crecieron en las placas petri se las aisló en cuanto a la forma y color de la colonia y se la sembró en tubos con agar nutritivo para bacterias y agar sabouraud para hongos.

Cuadro 3. Composición del medio de selección bacterias celulolíticas.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	(g/L)
Agar Carboximetilcelulosa.	Carboximetilcelulosa	10
	Extracto de levadura	2.5
	Peptona universal	2.5
	Sulfato de amonio	0.5
	Cloruro de calcio	0.5
	Fosfato monobásico de potasio	0.1
	Fosfato dibásico de potasio	0.1
	Agar	15
	Ajustar pH 7.0+/-2	

Selección de acuerdo a características deseables determinación de la capacidad biodegradativa de la celulosa

Se realizó una prueba cualitativa de la actividad celulolítica a partir de los microorganismos (hongos y bacterias) aislados, esta prueba se la realizó mediante la siembra en punción en agar Carboximetilcelulosa; (ver cuadro 3), las cajas petri fueron incubadas a 37°C, por 72 horas, después de esto se realizó una tinción adicionando rojo Congo al 1% como revelador, el colorante se dejó actuar por 15 min, se retiró el exceso y se adiciono una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2M, dejando reposar por quince minutos más, transcurrido este tiempo se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros. (Teather y Wood. 1982). Citado por (Gaitán, y Pérez, 2007).

Determinación de la capacidad biodegradativa del almidón

Siguiendo el método en placas se reemplazó la Carboximetilcelulosa por el almidón (ver cuadro 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la fase preliminar de esta investigación, se aislaron 130 cepas de hongos y 93 de bacterias a partir de muestras de suelo y mediante la colocación de cajas con medio selectivo en diferentes hábitats. En el (cuadro 4) se indica la frecuencia y el porcentaje de microorganismos (hongos y bacterias) desarrollados en cada uno de los hábitats.

A partir de muestras de suelo se lograron aislar 153 aislados por medio de diluciones seriadas y sembrados en placas. De acuerdo con (Arroyo, 2010). Mediante esta técnica se logra obtener un gran número de aislados debido a que se emplean medios enriquecidos y selectivos.

Cuadro 4. Frecuencia de microorganismos (hongos y bacterias) aislados según el hábitats.

Hábitats	Bacterias	Hongos	Frecuencia	Porcentaje %
Área orgánica	26	20	46	20,6
Área química	7	50	57	25,6
Bosque	12	16	28	12,6
Caña de azúcar	41	19	60	26,9
Compost	7	25	32	14,3
		Total	223	100,0

Según el análisis estadístico de la frecuencia en cuanto al hábitats en los suelos bajo agricultura orgánica se obtuvo el 20,6 %, agricultura química el 25,6%, en el bosque secundario el 12,6 %, en la caña de azúcar el 26,9 % y en el área de compost el 14,3 %.

(Vilches, 2002). Menciona que es indispensable considerar el tipo de muestra y

zona de muestreo debido que es una condición importante para lograr aislar cepas con altas posibilidades degradativas de residuos celulósicos. En este estudio se trabajó con muestras de suelo de diferentes hábitats. En el cuadro 5 se muestra la frecuencia y el porcentaje de las bacterias y hongos aislados según la forma de captura.

Cuadro 5. Frecuencia de microorganismos (hongos y bacterias) aislados según la forma de captura.

Forma de captura	Bacteria	Hongos	Frecuencia	Porcentaje %
Suelo	71	82	153	68,61
Trampa	22	48	70	31,39
		Total	223	100,0

Según el análisis estadístico de la frecuencia de la forma de captura el 68,61 % de microorganismos (hongos y bacterias) crecieron mediante muestras de suelo y solo un 31,39 % se aislaron de las trampas colocadas en el campo.

Selección de microorganismos de acuerdo a características deseable evaluación de la actividad enzimática.

Prueba cualitativa de la actividad celulolítica

A las 223 cepas puras de microorganismos (130 hongos y 93 bacterias)

se le determino la actividad enzimática, midiendo los halos de hidrólisis, una vez concluida la siembra en punción en agar CMC al 1% y transcurridas las 72 horas de incubación. De las 223 cepas puras de microorganismos únicamente 77 (30 bacterias y 47 hongos) obtuvieron resultados positivos mediante la formación zonas de aclaramiento. En el cuadro 4 se observa los aislados bacterianos seleccionados por la presencia del halo de degradación.

Cuadro 6. Análisis de conglomerado cepas bacterianas seleccionadas de acuerdo al halo de hidrólisis $P < 0,05$.

Grupo	Conglomerado Celulosa		Almidón	
	Halo (mm/hora)	E.E	Halo (mm/hora)	E.E
1	6,75 b	1,34	8,71 a	0,59
2	3,40 b	0,67	0,47 a	0,30

El valor de $p < 0,05$ ($p = 0,0343$) indica que, en una o más cepas bacterianas las medias de los halos presentan diferencias significativas. Debido a estas diferencias encontradas se realizó la prueba de Tukey. En la figura 1 se muestra el dendograma formado por la variable, cepa bacteriana, según el diámetro del halo de hidrólisis.- se revelan dos grupos en el dendograma para el análisis de conglomerados, los cuales se forman debido al grado de similitud existente entre las medias de los diámetros del halo. En el primer grupo se encuentran dos cepas A.O-19 y la B.M-1 con una media de 6,75 mm, mientras que en el

grupo dos hay 8 cepas y entre ellas se encuentran las cepas B.M-5, B.M-7, A.Q-3, R.C-2, R.C-4, R.C-6, R.C-13 y la R.C-18, con una media de 3,40 mm.

(Gaitán y Pérez, 2007); (Mikan y Castellanos, 2004).- obtuvieron resultados de degradación de celulosa por bacterias que no superaron los 4 y 3 mm de diámetro.- con esto se determina que la bacterias A.O-19 cuenta con buena capacidad para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa ya que superan los diámetros dados por las bacterias aisladas por estudios realizados anteriormente.

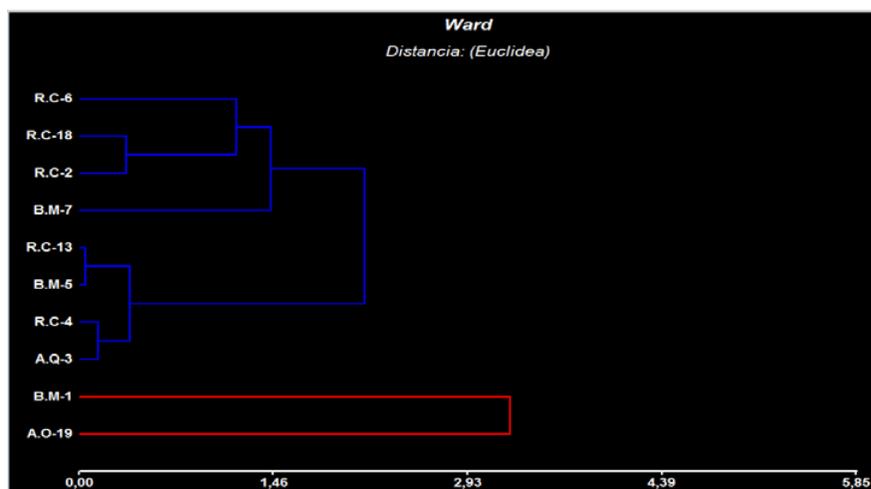


Figura 1. Dendrograma en función del halo de degradación de la celulosa y el almidón en bacterias.

Cuadro 7. Cepas bacterianas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación del almidón.

Cepa	Promedio Halo de Hidrólisis almidón (mm).
A.O-19	8,08
A.Q-3	0,00
B.M-1	9,33
B.M -5	0,00
B.M -7	3,78
R.C-2	0,00
R.C-4	0,00
R.C-6	0,00
R.C-13	0,00
R.C-18	0,00

En el cuadro 4 se observa el análisis realizado sobre la actividad enzimática, La actividad amilolítica mostró un valor de $p < 0,05$ ($p = < 0,0001$), lo cual evidencia que existen diferencias significativas en los diámetros de los halos producidos por las bacterias de las cepas A.O-19 y la B.M-1. Estas cepas presentaron mayor actividad enzimática con una media de 8,71mm con respecto a la B.M-7 que tiene una media de 0,47 mm. Sánchez *et al*, (2005) manifiesta que el principio de esta prueba se basa en la

incapacidad que presenta el lugol para pigmentar las zonas en las que el almidón ha sido hidrolizado por acción enzimática. Por esta razón se utilizó la prueba de lugol para la determinación de microorganismos que producen enzimas amilolíticas exocelulares, ya que este test permite el reconocimiento de las mismas por la formación de un halo no pigmentado y de diámetro variable este fenómeno se observa cuando se expone el cultivo a la acción del lugol durante un periodo aproximado de 1 a 3 min.

Cuadro 8. Cepas fúngicas seleccionadas de acuerdo al halo de hidrólisis P<0,05.

Conglomerado	Celulosa		Almidón		
	Grupo	Halo (mm/hora)	E.E.	Halo (mm/hora)	E.E.
1	1	11,17 a	0,26	6,75 a	0,52
	2	9,07 b	0,28	6,13 a	0,57

En la figura 2 se muestra en dendograma formado por la variable, cepa fúngica, según el diámetro del halo de hidrólisis.- se revelan dos grupos en el dendograma para el análisis de conglomerados. En el primer grupo se encuentran dos cepas A.O-19 y la B.M-1 con

una media de 6,75 mm, mientras que en el grupo dos hay 8 cepas y entre ellas se encuentran las cepas B.M-5, B.M-7, A.Q-3, R.C-2, R.C-4, R.C-6, R.C-13 y la R.C-18, con una media de 3,40 mm.

Cuadro 9. Cepas fúngicas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación del almidón.

Cepa	Promedio Halo de Hidrólisis almidón (mm).
A.O-1	10,3
A.O-2	11,3
A.O-3	9,00
A.O-4	8,67
A.O-5	9,00
A.O-6	11,0
A.Q-3	11,0
A.Q-7	12,0
A.Q-8	11,33
A.Q-27	10,0
R:C-3	8,67

En el cuadro 5.- se observa el análisis realizado sobre la actividad enzimática, amilolítica la cual mostró un valor de p<0,05 (p= <0,4265), lo cual evidencia que no existen diferencias significativas en los diámetros de los halos producidos por cepas fúngicas.- En el

primer grupo se encuentran dos cepas A.Q-8, A.Q-3, A.O-1, A.O-2, A.Q-7 Y A.O-6 con una media de 6,75 mm, mientras que en el grupo dos hay 8 cepas y entre ellas se encuentran las cepas A.O-3, A.O-4, A.O-5, A.Q-27 y la R.C-3, con una media de 6,13 mm.

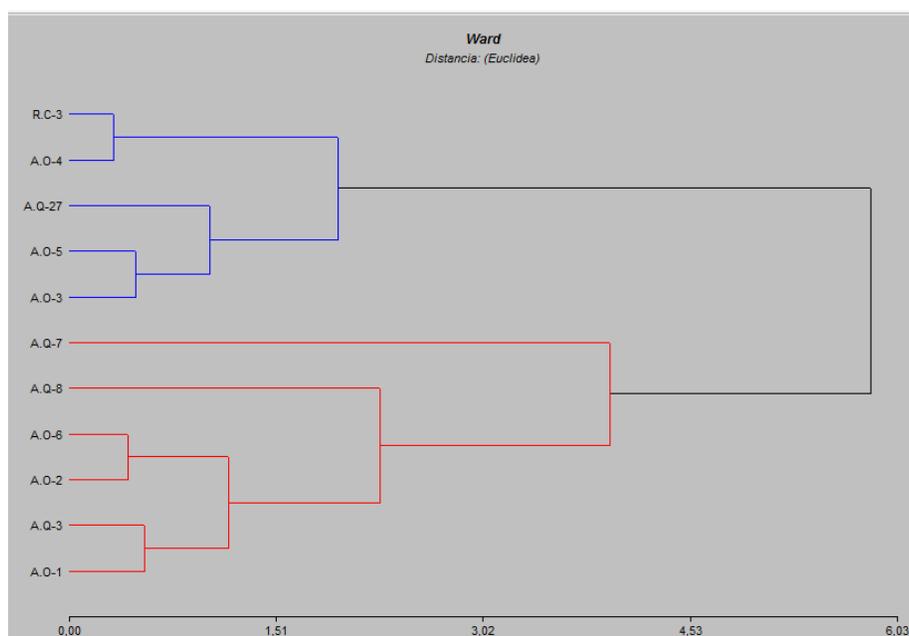


Figura 2. Dendrograma en función del halo de degradación de la celulosa y el almidón en hongos



Figura 3. Zonas de aclaramiento (hidrolisis enzimática)

CONCLUSIONES

Para finalizar se pudo determinar que aislar cepas autóctonas de microorganismos degradadores de materia orgánica fibrosa en diferentes hábitats, (bacterias y hongos) celulolíticos y amilolíticos por diluciones seriadas (Stanier 1996). Posteriormente, incubadas por 24 horas a 37°C las cepas bacterianas y las fúngicas de 3 a 5 días a 30°C. mostró un valor de $p < 0,05$ ($p = < 0,4265$), evidenció que no existen diferencias significativas en los diámetros de los halos producidos por cepas fúngicas.- En el primer grupo se encuentran dos cepas A.Q-8, A.Q-3, A.O-1, A.O-2, A.Q-7 Y A.O-6 con una media de 6,75 mm, mientras que en el grupo dos hay 8 cepas y entre ellas se encuentran las cepas A.O-3, A.O-4, A.O-5, A.Q-27 y la R.C-3, con una media de 6,13 mm. Este estudio contribuyó al desarrollo de una producción agropecuaria eficiente y sostenible en Ecuador poniendo a prueba el uso bioproductos microbianos autóctonos.

REFERENCIAS

- Anaya, A. (2003). Ecología química. 1 ed. plaza y Valdés. México
- Arroyo, J. (2010). Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de agave (Agave tequilera). Tesis. Biólogo. Universidad Michoacana san Nicolás Hidalgo. Morelia, Michoacán México
- Chamorro, C. (2001). El suelo maravilloso teatro de la vida. Rev.Acad. Colombia ciencia. Vol. 25 484-486
- Benavides, G. Hermida, A. (2008). Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde Y Guasca (Cundinamarca). Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. P.
- Diorio, L., Forchiassin, F., Papinutti, V. Sueldo, D. (2003) "Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por Saccobolus saccoboloides (Fungi, Ascomycotina)". Rev Iberoam Micol. P. 11-15
- Gaitán, D. y Pérez, L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora). Tesis Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P. 64
- González, A. Mejía, T. Mújica, F. Ortega, J. (2002). Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. Avance y Perspectiva. V 21. P 267
- Grajales, O. (2005). Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica. 1 ed UNAM. P 43-44. México.
- Linares, C. Monedero, M. (2004). Uso, manejo y conservación de los suelos. 1 ed. La Habana. Cuba. P 6
- Mikán, J. castellano, D. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. Revista Colombiana de Biotecnología. V 6. P 58-71
- Sánchez, C. Mejía, C. Figueroa, C. Esquivia, M. Agudelo, L. Zapata, N. Gómez, M. (2005). Estudio de cepas nativas amilolíticas. Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica. V 12. P. 21-28. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia
- Stanier, R. S. (1996). Microbiología. Barcelona. Editorial Revert. 2 ed, 750
- Vilches, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis Biólogo. Lima-Perú