



Caracterización de bacterias y hongos productores de celulasas aislados de material lignocelulósico

Navarro-Mosqueda, F.¹; López-Ramírez, V.¹; Morales-Rodríguez, R.²; Rodríguez-Gómez, D.¹✉

Datos de Adscripción:

¹Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. División de Ingeniería Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km 12.5, C. P. 36821., Col. El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

²Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Química, Noria Alta S/N, C.P. 36050, Col. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, México.

✉ divanery_rg@irapuato.tecnm.mx

Resumen - Los residuos agroindustriales están compuestos de material lignocelulósico, los cuales están expuestos a una gran diversidad de microorganismos que pueden degradarlos mediante la acción de varias enzimas. Por tanto, microorganismos crecidos sobre dichos materiales podrían expresar enzimas lignocelulósicas de importancia biotecnológica y de aplicación en procesos industriales. En este estudio se evaluaron 36 aislados procedentes del Estado de Guanajuato: 19 bacterias y 17 hongos, aislados de residuos agroindustriales tales como: bagazo, bolsa, cartón, gasa, paja de maíz, rastrojo de maíz, además de algodón y pintura; con el objetivo de medir su actividad celulasa producida a 28, 37 y 45 °C. Se realizó una prueba semicuantitativa de celulasas en placa de Petri conteniendo medio carboximetilcelulosa y un cultivo en medio líquido para la cuantificación de la actividad enzimática celulasa total (UPF/ml) en el sobrenadante usando papel filtro como sustrato. Los aislados de bacterias que mostraron la mayor actividad corresponden a los aislados de bolsa de plástico-4 y paja de maíz-8 (0.2 UPF/ml a 37 °C y 0.17 UPF/ml a 28°C, respectivamente). Por otra parte, los hongos que presentaron la mayor actividad fueron Algodón-06 y Algodón-07 (0.2 y 0.16 UPF/ml a 28 °C). Los resultados de la actividad celulolítica evaluada a través de los dos métodos no son coincidentes, por lo que, es importante el haber realizado dos técnicas de manera complementaria para la selección de aislados con posibles aplicaciones industriales y relacionadas con la temperatura en la que presentan mayor actividad.

Palabras clave: Bacterias, Carboximetilcelulosa, Celulasas, Hongos, Residuos Agroindustriales.

Abstract - Agroindustrial wastes are composed of lignocellulosic material, which are exposed to a great diversity of microorganisms that can degrade them through the action of several enzymes. Therefore, microorganisms grown on these materials could express lignocellulosic enzymes of biotechnological importance and application in industrial processes. In this study, 36 isolates from the State of Guanajuato were evaluated: 19 bacteria and 17 fungi, isolated from agroindustrial waste such as: bagasse, plastic bag, cardboard, gauze, corn straw, corn stubble, as well as cotton and paint; with the aim of measuring their cellulase activity produced at 28, 37 and 45 °C. A semiquantitative cellulase test was performed in Petri dishes containing carboxymethylcellulose medium and the other test was the quantification of the total

cellulase activity (FPU) in the supernatant from liquid culture through filter paper assay. The bacterial isolates showing the highest activity corresponded to plastic bag-04 and corn straw-08 (0.2 PFU/ml at 37 °C and 0.17 PFU/ml at 28 °C, respectively). While, in fungi, the highest activity was presented by cotton-06 and cotton-07, (0.2 and 0.16 FPU/ml, respectively, at 28 °C. The results of the cellulolytic activity evaluated through the two methods were not related, so it was important that two techniques were carried out in a complementary manner for the selection of isolates with possible industrial applications and their temperature-related activity.

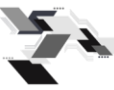
Keywords - Agroindustrial Residues, Bacteria, Carboxymethylcellulose, Cellulases, Fungi.

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son aquellos que se generan durante las diferentes etapas de los procesos productivos agrícolas, que van desde el cultivo hasta la obtención de la materia prima de interés. La mayoría de estos residuos terminan en vertederos o son utilizados en compostajes para la obtención de abonos orgánicos. Al ser residuos naturales, aparentemente menos peligrosos o contaminantes, y debido a su mala gestión, terminan ocasionando un impacto en el medio ambiente como altas emisiones de CO₂, la contaminación de acuíferos por lixiviados, la generación de malos olores y la proliferación de plagas. Guanajuato es el segundo estado de México con mayor generación de residuos agroindustriales, de cultivos de maíz, sorgo, trigo y cebada, reportando 3,830,305 toneladas durante el periodo de 2008-2011 (SAGARPA, 2015).

Los residuos lignocelulósicos están conformados por polímeros como la lignina, la celulosa y la hemicelulosa (Yepes *et al.*, 2008). Los microorganismos capaces de crecer a expensas de estos residuos deben secretar enzimas, como son las celulasas, que actúan de manera simultánea para lograr su descomposición hasta monómeros de carbohidratos. Debido a su papel primordial en la naturaleza, estas enzimas se encuentran de manera abundante ya que, son producidas por organismos como plantas, nematodos, hongos y bacterias (Kuhad *et al.*, 2011).

Las celulasas pertenecen a la superfamilia de las glicosil-hidrolasas, su mecanismo de acción consta de un complejo enzimático simultáneo y sinérgico conformado por endoglucanasas, seguido por exoglucanasas y que concluye con β-glucosidasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β-1,4 hasta la liberación de la glucosa (Davies & Henriessat, 1995). Las enzimas celulasas tienen diversas aplicaciones en diferentes procesos industriales, siendo utilizadas en la industria alimentaria, agropecuaria, textil, detergentes, papelería, cervecera y de biorrefinerías (Xia & Cen, 1999). La temperatura óptima de acción en cada proceso puede ser



variable y dependiente del proceso en sí. El obtener celulasas con amplio rango de acción puede depender de la temperatura de producción de las enzimas (Patel *et al.*, 2019). Las enzimas celulasas que se encuentran actualmente en el mercado en su mayoría se obtienen de microorganismos (hongos y bacterias), ya que la purificación y producción de estas enzimas es más favorable debido a su tasa de crecimiento más rápida, producción de complejos enzimáticos completos y su capacidad para soportar condiciones extremas (Islam, 2019).

Existe una gran cantidad de microorganismos capaces de secretar enzimas celulasas y su importancia ha impulsado la detección y selección de aislados productores. Para lo cual se utilizan técnicas de detección en placa, el más común es el revelado con Rojo Congo, donde el sustrato celulósico se incorpora al medio de crecimiento basal, los microorganismos son inoculados y llevados a las condiciones que se desean evaluar. El microorganismo al estar expuesto al sustrato específico secretará enzimas capaces de degradarlo, de manera que podrá adquirir los productos como nutrientes, los cuales facilitan el crecimiento del microorganismo. En su mayoría se detecta la actividad de celulasas en medio superficial en caja de Petri conteniendo agar con carboximetilcelulosa (CMC). Además del crecimiento, se evidencia un halo de hidrólisis alrededor del crecimiento, el cual puede ser detectado al aplicar Rojo Congo, debido a que éste se fija al sustrato, en este caso, CMC, tomando una coloración roja intensa y un halo de menor decoloración en la zona donde se liberaron las celulasas para hidrolizar el CMC.

Esta técnica permite un primer acercamiento para la selección de microorganismos celulolíticos, se realiza una correlación del halo de hidrólisis respecto a su crecimiento, obteniendo el índice enzimático (IE). Por medio de ésta técnica se han evaluado hongos y bacterias; a bacterias aisladas de estiércol de vaca, de tratamiento de efluentes y de residuos industriales se les detectó actividad celulolítica, los aislados de estiércol presentaron IE de 2.8 hasta 3.1 en cultivo superficial usando CMC como sustrato a 30°C por 72h, las cuales fueron identificadas en su mayoría como bacterias Gram positivas y por las pruebas bioquímicas realizadas se consideraron como posibles *Bacillus* (Demissie *et al.*, 2024). De acuerdo a Sethi *et al.* (2013), existe mayor énfasis en estudios de bacterias que producen celulasas con alta tasa de crecimiento como: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Serratia marcescens*; en su estudio, éstas bacterias fueron aisladas del suelo, y se seleccionaron los aislados productores de celulasas en medio con CMC incubadas a 45, 50 y 55 °C durante 24 horas y reveladas con Rojo Congo, para posteriormente optimizar su producción de endoglucanasa al evaluar diferentes condiciones de pH, temperatura, fuente de carbono y de nitrógeno. La mayor actividad para estas bacterias se determinó a 40 °C, a un pH de 7, usando como fuente de carbono a la glucosa.

Por otra parte, los hongos que han sido ampliamente estudiados como productores de enzimas celulasas son *Trichoderma reesei*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. *T. reesei*, particularmente es un hongo que ha recibido mucha atención por la producción de celulasas, pero se ha reportado ampliamente que presenta una baja producción de enzimas de β-glucosidasas (Peterson & Nevalainen, 2012), lo que conlleva a la búsqueda de otros microorganismos que sean altamente

eficientes en la descomposición de la celulosa. *Aspergillus* es un género de hongos filamentosos que se utiliza comúnmente para la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos de la pared celular de las plantas, ya que consta de un complejo enzimático completo (endo, exo y β-glucosidasas). De acuerdo con la literatura, *A. niveus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans* aislados de fuentes ambientales nativas como el suelo, plantas de trigo, tallos y hojas en descomposición presentan actividad celulasas a temperaturas entre 30 y 37°C, y a diferentes pH, de 3.2 hasta 4.8. Se reportó en este estudio que el aislado con la máxima actividad enzimática fue *A. nidulans*, de 0.3 UPF/ml a 30 °C a un pH de 4.8 (actividades en UPF/ml por el método de Mandels *et al.*, 1976).

Otro de los hongos más estudiados para la producción de celulasas y que reporta altas actividades es el género *Penicillium*. Prasanna *et al.* (2016), estudiaron una cepa de *Penicillium sp.* proveniente de un efluente de descarga textil con residuos de algodón, obtuvieron la actividad enzimática de 0.94 UPF/ml en un medio sin optimizar de Czapeck-Dox con 0.5% celulosa, hasta llegar a un valor de 8.7 UPF/ml posterior a la optimización, correspondiente a cambios en la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, temperatura (30 °C) y pH (5).

Por lo anterior, en este trabajo se planteó el objetivo de seleccionar aislados productores de enzimas celulasas a partir de un cepario de hongos y bacterias aisladas de diversas fuentes lignocelulósicas halladas en el Estado de Guanajuato. El tamizaje de la producción enzimática incluyó un análisis de producción a tres temperaturas: 28, 37 y 45°C y dos métodos de selección, en cultivo superficial y en cultivo líquido.

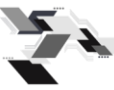
II. PARTE TÉCNICA DEL ARTÍCULO

2.1 Colección de microorganismos lignocelulósicos

Los aislados fueron proporcionados por el Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (LDIM-ITESI) con un total de 36 aislados: 19 bacterias y 17 hongos, su procedencia y código de identificación se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1.
Aislados evaluados y procedencia

<i>Aislados de bacterias</i>	<i>Material de aislamiento</i>
Bolsa-1, Bolsa-2, Bolsa-3, Bolsa-4	Bolsas contaminadas
Paja-1, Paja-2, Paja-3, Paja-4, Paja-5, Paja-6, Paja-7, Paja-8, Paja-9, Paja-10	Residuos de paja de maíz
Pintura-1, Pintura-2, Pintura-3, Pintura-4, Pintura-5	Pintura acrílica contaminada
<i>Aislados de hongos</i>	<i>Material de aislamiento</i>
Alg-1, Alg-2, Alg-3, Alg-4, Alg-5, Alg-6, Alg-7	Algodón
Bagazo-1, Bagazo-2	Bagazo de caña de azúcar
Cartón-1, Cartón-2	Cartón contaminado
Gasa	Gasa
Lirio	Residuos de Lirio acuático triturado
Paja-1	Residuos de paja de maíz
RM-1, RM-2, RM-3	Residuos de rastrojo de maíz.



Los hongos se reactivaron en medio agar dextrosa Sabouraud y las bacterias en agar nutritivo a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 5 días, los cuales fueron usados como inóculo para los experimentos posteriores. Los hongos fueron observados al microscopio con tinción de azul de lactofenol. Las bacterias fueron identificadas microscópicamente por tinción Gram. Los bacilos Gram positivos se les realizó la técnica de hidrólisis de almidón para confirmar el género *Bacillus*; la formulación del agar almidón en placas Petri fue la siguiente (g/l): peptona de gelatina, 5; extracto de carne, 3; almidón soluble de papa, 20; NaCl, 5; agar bacteriológico, 20. Una vez inoculadas las bacterias, se incubaron a 28°C durante 72 h y después se revelaron al agregar 2 a 3 gotas de solución de lugol de Gram sobre la superficie del agar (Oduña & Oyewole, 1986).

2.2 Prueba semicuantitativa para la detección de celulasas

Se preparó el medio de cultivo con la siguiente formulación (g/l): carboximetilcelulosa (CMC), 5; NaNO₃, 3; K₂HPO₄, 1; MgSO₄, 0.5; KCl, 0.5; FeSO₄.7H₂O, 0.01 y agar bacteriológico, 20; se ajustó a un pH de 5 con NaOH, se esterilizó en autoclave y se vertió en placas de Petri. Las bacterias fueron inoculadas por estría simple y los hongos por inoculación central de 1 cm² de agar con micelio de 5 días de crecimiento. Los análisis se llevaron a cabo Luego de ser incubadas por separado a 28, 37 y 45 °C durante 72 h. Al finalizar la incubación se midió el diámetro del crecimiento y después se añadió 10 ml de solución de Rojo Congo al 0.25 % (p/v) a cada placa por 15 min a temperatura ambiente, después se retiró el colorante y posteriormente se agregó 10 ml de NaCl, 1M por 15 min; se retiró el exceso de líquido y se midió el diámetro del halo de hidrólisis. Los ensayos se realizaron sin réplicas. Se midió el diámetro de crecimiento (DC) de cada microorganismo y el diámetro del halo de hidrólisis (DHH) en centímetros, el cual se reconoce por una zona de claridad alrededor del área de crecimiento (Teather & Wood, 1982), con estos datos se calculó el índice enzimático (IE) según la ecuación (1).

$$IE = \frac{DHH}{DC} \quad (1)$$

2.3 Cultivo en medio líquido para la cuantificación de la actividad enzimática de celulasas totales

Se preparó el medio de cultivo con la siguiente formulación (g/l): carboximetilcelulosa (CMC), 20; glucosa, 5; (NH₄)₂SO₄ 14.9, KH₂PO₄, 3.6; MgSO₄.7H₂O, 0.54; CaCl₂.2H₂O, 0.72; Bacto peptona, 1.62; Tween 80 al 0.01 %, 0.18 ml y elementos trazas, 0.9 ml; se ajustó a un pH de 6, se sirvieron 20 ml de medio en tubos plásticos de 50 ml y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 min. El inóculo para los hongos consistió en un cubo de agar con micelio de 1cm² de 5 días de crecimiento, para bacterias se tomaron colonias aisladas. Se incubaron por separado a 28, 37 y 45 °C durante 72 h, con agitación constante de 110 rpm. Los ensayos se realizaron sin réplicas. Después se centrifugaron para tomar el sobrenadante y conservarlo bajo refrigeración hasta que se determinó la actividad enzimática (Rodríguez-Gomez & Hobbey, 2013).

2.4 Ensayos enzimáticos

La actividad de las celulasas totales en el sobrenadante se determinó siguiendo el protocolo reportado por Xiao *et al.* (2004), en el ensayo del formato 60 µl usando papel filtro como sustrato y por detección de azúcares reductores obtenidos

mediante la prueba con ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (Miller, 1959) por espectrofotometría a una absorbancia de 540nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de papel filtro por mililitro (FPU/ml), según se indica (2), la cual se define como 1 µmol de glucosa liberado por ml en un minuto. Para la cuantificación de la concentración de equivalentes de glucosa liberados se utilizó una curva estándar de glucosa.

$$\frac{UPF}{ml} = \frac{A_{540nm}muestra}{A_{540nm}estandar} * 5.55 \frac{\mu mol}{mg} * \frac{1}{60min} * \frac{1}{Xml} \quad (2)$$

A_{540nm} muestra; absorbancia obtenida de cada uno de los ensayos de celulasas.

A_{540nm} estandar; absorbancia estándar de 1 mg de glucosa derivada de la curva glucosa estándar.

5.55 µmol/mg; número de µmoles de glucosa en 1 mg

60 min; tiempo de incubación de la reacción.

X: volumen de la enzima.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación morfológica

La Tabla 2 presenta el resultado de la identificación de los aislados evaluados. Los hongos corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Los aislados de hongos denominados lirio y cartón-1 no pudieron ser identificados morfológicamente debido a que no se observaron estructuras de reproducción, solamente micelio. Mientras que las bacterias se observaron como bacilos Gram positivos o bacilos Gram negativos. A las especies identificadas como pertenecientes al género *Bacillus* se les observó endospora en la tinción de Gram y presentaron una prueba hidrólisis de almidón positiva (ejemplo en Figura 1).

Tabla 2.

Identificación morfológica de los aislados. Gram positivos (GP), Gram negativos (GN).

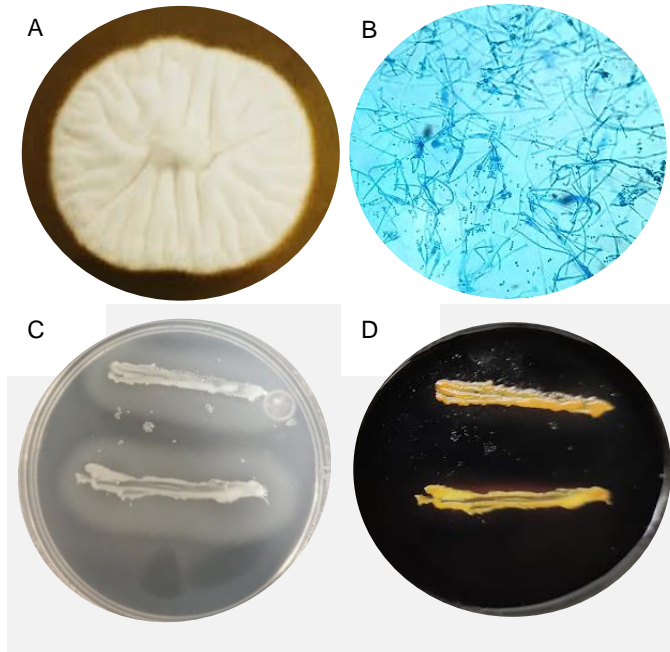
Hongos		Bacterias	
Código	Género	Código	Género
Alg-1	<i>Penicillium</i> spp.	Bolsa-1	<i>Bacillus</i> sp.
Alg-2	<i>Penicillium</i> spp.	Bolsa-2	Bacilos GP
Alg-3	<i>Aspergillus</i> spp.	Bolsa-3	Bacilos GN
Alg-4	<i>Aspergillus</i> spp.	Bolsa-4	Bacilos GN
Alg-5	<i>Fusarium</i> spp.	Paja-1	<i>Bacillus</i> sp.
Alg-6	<i>Aspergillus</i> spp.	Paja-2	Bacilos GP
Alg-7	<i>Penicillium</i> spp.	Paja-3	<i>Bacillus</i> sp.
Bagazo-1	<i>Fusarium</i> spp.	Paja-4	<i>Bacillus</i> sp.
Bagazo-2	<i>Fusarium</i> spp.	Paja-5	<i>Bacillus</i> sp.
Cartón-1	No identificado	Paja-6	<i>Bacillus</i> sp.
Cartón-2	<i>Penicillium</i> spp.	Paja-7	<i>Bacillus</i> sp.
Gasa	<i>Penicillium</i> spp.	Paja-8	<i>Bacillus</i> sp.
Lirio	No identificado	Paja-9	Bacilos GP
Paja-1	<i>Penicillium</i> spp.	Paja-10	Bacilos GP
RM-1	<i>Fusarium</i> spp.	Pintura-1	Bacilos GP
RM-2	<i>Aspergillus</i> spp.	Pintura-2	<i>Bacillus</i> sp.
RM-3	<i>Aspergillus</i> spp.	Pintura-3	Bacilos GP
		Pintura-4	<i>Bacillus</i> sp.
		Pintura-5	<i>Bacillus</i> sp.

De manera general, no se observó alguna relación entre el tipo de residuo y el género de hongo encontrado, ya que los géneros de los aislados pertenecen a especies saprobias propias de material lignocelulósico. En cuanto a las bacterias se esperaba que en su mayoría correspondiera al género

Bacillus, sin embargo, se ha reportado la presencia de celulasas en bacilos Gram negativos (Sethi *et al.*, 2013).

Figura 1.

Ejemplo de la Identificación morfológica y bioquímica de los aislados de hongos y bacterias. (A) morfología macroscópica del hongo Alg-5; (B) vista microscópica 40X con azul de lactofenol de hongo Alg-5; (C) bacteria Pintura-4 creciendo en medio con almidón; (D) bacteria Pintura-4 crecida en medio con almidón revelada con solución de lugol



3.2 Evaluación semicuantitativa de la actividad celulolítica de hongos y bacterias

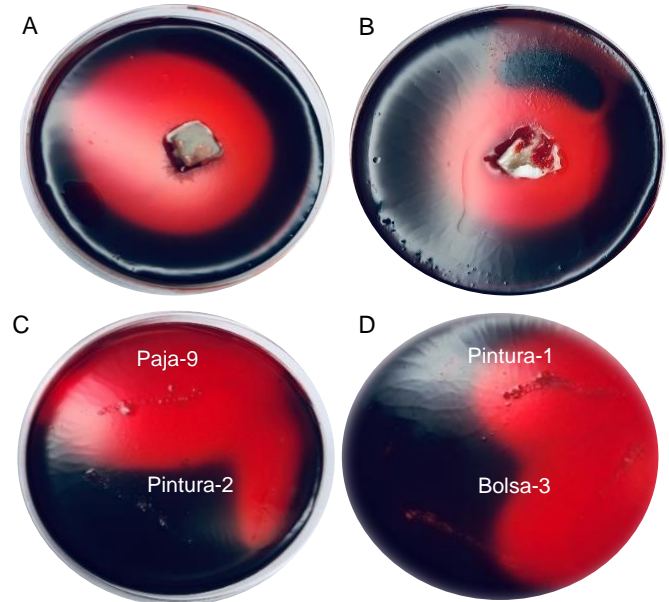
Los microorganismos que se evaluaron por la prueba CMC-Rojo Congo en medio superficial presentaron halos de hidrólisis correspondientes a la hidrólisis de la CMC por la secreción de las enzimas hacia el exterior de la célula, ya que al agregar el colorante Rojo Congo, éste se adhiere a la CMC residual en la placa (Teather & Wood, 1982). La forma en que se observó la hidrólisis en este tipo de prueba para los dos tipos de microorganismos se presenta en la Figura 2.

En general, éste es un ensayo muy usado en hongos, debido a la liberación de enzimas en la punta de la hifa, y al característico crecimiento radial del hongo. Mientras que, en las bacterias, el crecimiento se da sobre la estría de inoculación y el IE obtenido debido a la liberación de enzimas por las bacterias en la placa de Petri puede ser muy variable.

Se realizó la evaluación de los aislados productores de enzimas celulolíticas a 28, 37 y 45 °C en carboximetilcelulosa en medio superficial, donde un valor de índice enzimático (IE) superior a 1.5 es tomado como una alta actividad (Tabla 3). Los aislados que no presentaron actividad celulolítica corresponden a un IE de 1, ya que, el diámetro del halo hidrólisis es igual al de crecimiento.

Figura 2.

Actividades celulolíticas producidas en cultivo superficial con CMC y revelado con Rojo Congo. (A) hongo Cartón-1; (B) hongo Alg-1; (C) bacterias Pintura-2, Paja-9; (D) bacterias Pintura-1, Bolsa-3 evaluados a 37°C.



En los cultivos de hongos la mayoría presentaron actividad celulolítica favorable a temperaturas de 45°C y de 37 °C. Los aislados Alg-2, Bagazo-2 y Alg-6 presentaron IE > 3 a 45 °C. A 37 °C, los hongos carton-1 y paja-1 presentaron IE > 3 (Tabla 3).

Tabla 3.

Valores de índice enzimático (IE) de actividad celulolítica de los aislados de hongos evaluados a diferentes temperaturas en medio CMC.

Código	28°C	37°C	45°C
Alg-1	1.44	2.00	2.85
Alg-2	1.00	1.68	3.18
Alg-3	1.00	1.33	1.32
Alg-4	1.40	1.15	1.00
Alg-5	1.33	1.48	2.92
Alg-6	1.70	2.70	3.17
Alg-7	1.00	1.67	1.08
Bagazo-1	1.19	2.50	2.15
Bagazo-2	1.42	2.18	3.15
Cartón-1	1.26	3.16	2.46
Cartón-2	1.04	2.85	2.27
Gasa	1.00	1.00	1.00
Lirio	1.45	1.67	1.00
Paja-1	1.76	3.14	1.47
RM-1	1.24	2.60	2.22
RM-2	1.77	1.00	1.00
RM-3	1.60	1.33	2.00

Los IE obtenidos en los aislados fueron variables, sin tener relación entre los sustratos de donde fueron aislados, tampoco de alguna de las especies en particular, ya que los mayores IE se encontraron en los tres géneros: *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Los hongos ambientales se clasifican como mesófilos, teniendo la mayor tasa de crecimiento a temperaturas que oscilan entre 25 y 45°C. Por lo cual se espera que en este rango variable cualquiera de los hongos creciera y produjera las celulasas en las tres temperaturas evaluadas, sin embargo, los hongos presentaron mayores IE a mayores temperaturas (Gupta *et al.*, 1987; Miller, 2020).

Anteriormente se han reportado análisis en hongos del género *Aspergillus* entre las especies identificadas como *A. candidus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. varicolor* y *A. japonicus*, que corresponden a aislados de residuos de ricino, que presentaron índices enzimáticos entre 1.6 hasta 2. En *A. japonicus* se reportó un IE de 5 a una temperatura de 30°C (Herculano *et al.*, 2011), por tanto similares a los IE aquí reportados, ya que se encuentran en el rango de 1.6 hasta 3.18.

En cuanto al género *Fusarium*, un estudio similar fue realizado en Marruecos con reportes de IE hasta 1.47, evaluados en medio agar czapek con celulosa cristalina a una temperatura de 25°C (M'barek *et al.*, 2019). Por último, respecto a estudios similares en *Penicillium*, un análisis realizado en la región amazónica central de Brasil sobre hongos filamentosos celulolíticos aislados de las tripas de insectos acuáticos, identificó especies de *Penicillium spp.* y *Talaromyces* con valores de IE de 2 hasta 4, evaluado en medio CMC a una temperatura de 27°C (Belmont-Montefusco *et al.*, 2020).

En cuanto a los cultivos de bacterias, los que presentaron actividad celulolítica favorable, con un IE ≥ 1.5 , fueron los identificados como bacilos Gram positivos, destacando: Paja-1, Paja-3, Paja-5, Paja-9 con IE de 4.5, 4, 2.5 y 3.1, respectivamente (Tabla 4). Exceptuando la bacteria Paja-9, los mayores IE se presentaron a 37°C en bacterias. No se observó crecimiento a 45 °C.

Tabla 4.

Valores de Índice enzimático (IE) de actividad celulolítica de los aislados de bacterias evaluados a diferentes temperaturas en medio CMC. NC= no creció

Código	28°C	37°C	45°C
Bolsa-1	1.00	1.00	NC
Bolsa-2	1.00	1.00	NC
Bolsa-3	1.00	1.20	NC
Bolsa-4	1.00	1.00	NC
Paja-1	1.40	4.40	NC
Paja-2	1.00	1.00	NC
Paja-3	1.00	4.00	NC
Paja-4	1.00	1.00	NC
Paja-5	1.20	2.50	NC
Paja-6	1.00	1.00	NC
Paja-7	1.00	1.00	NC
Paja-8	1.40	1.00	NC
Paja-9	3.10	1.90	NC
Paja-10	1.40	1.00	NC
Pintura-1	1.00	1.50	NC
Pintura-2	1.00	1.50	NC
Pintura-3	1.00	1.00	NC
Pintura-4	1.00	1.40	NC
Pintura-5	1.00	1.00	NC

En cuanto a los bacilos Gram positivos con alta actividad se espera que correspondan al género *Bacillus*, debido a que en la literatura es el género con alta producción de celulasas en condiciones aerobias. Sin embargo, en la identificación morfológica y bioquímica no se pudo confirmar este género para todos los aislados Gram positivos, según se indica en la Tabla 2.

En cuanto a reportes de la literatura, bacterias celulolíticas asociadas al intestino de *Heterotermes indicola* (termita que se alimentan de madera), identificadas en su mayoría como Gram-positivas presentaron valores de IE entre 1.3 hasta 4 (Azhar *et al.*, 2024). De igual manera, recientemente se realizó el análisis de bacterias aisladas de residuos agroindustriales identificadas como Gram positivas que presentaron IE entre 1.6 y 1.8 a una temperatura de 37 \pm 2 °C, los cuales son inferiores a los reportados en el presente estudio (Demissie *et al.*, 2024).

Los índices enzimáticos de bacterias y de hongos no son comparables debido a que presentan varias diferencias, tanto morfológicas como metabólicas. Adicionalmente, existen reportes de microorganismos que presentan un solo gen de celulasa Ce19G (endoglucanasa), la cual actúa sobre CMC sin llegar a degradar la celulosa completamente hasta glucosa, por eso es importante realizar ensayos cuantitativos para determinar qué tan activo es el sistema completo (Desvaux, 2005).

3.3 Medición de la actividad enzimática de celulasas totales en medio líquido

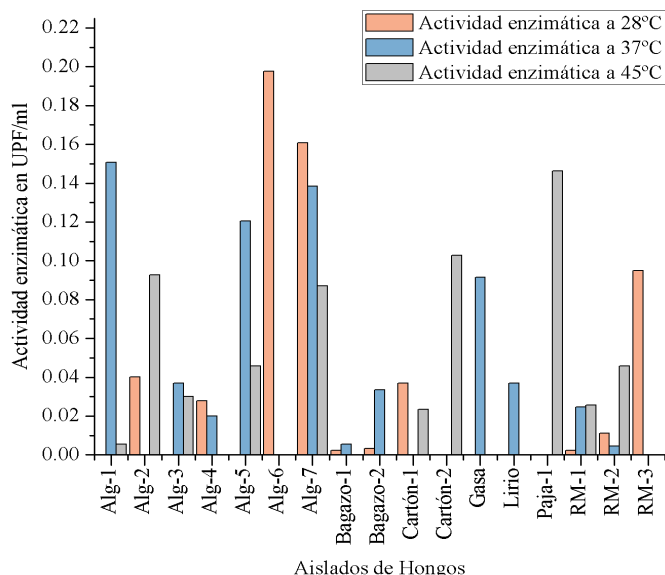
Los ensayos que se realizaron en cultivo líquido se usaron como prueba de selección de los aislados celulolíticos ya que se cosecharon a un único tiempo para un análisis comparativo de todos los microorganismos. El ensayo cuantitativo usando papel filtro como sustrato hace referencia a la detección de todo el sistema celulolítico sinérgico, llevando el papel filtro hasta el producto final, glucosa. De nuevo se observan resultados variables, sin relación entre el sustrato de aislamiento de los microorganismos, la temperatura de producción y el nivel de actividad.

A 28°C los hongos identificados como Alg-6 y Alg-7 presentaron la mayor actividad (0.2 y 0.16 UPF/ml, respectivamente). Mientras que, a 37°C, los aislados Alg-1 y Alg-7 presentaron actividad de 0.14-0.16 UPF/ml. A 45°C. el hongo Paja-1 fue el único que presentó actividad por encima de 0.1, llegando a 0.15 UPF/ml (Figura 3). La mayoría de los hongos que producen actividad mayor a 0.1 presentaron IE mayores a 1.5 en CMC (Tabla 3).

La mayor actividad enzimática se determinó en el aislado Alg-6 (0.2 UPF/ml), identificado como *Aspergillus sp.* Ya anteriormente se ha reportado que algunas especies del género *Aspergillus* presentan un sistema enzimático completo de celulasas (de Vries & Visser, 2001). La temperatura donde se presentó la mayor actividad de celulasas para las especies de *Aspergillus* fue a 28 °C, siendo resultados consistentes con informes previos que indican que la mejor producción de celulasas en *Aspergillus* se da a temperatura ambiente, encontrando que la temperatura óptima de producción es a 30°C (Varalakshmi *et al.*, 2009).

Anteriormente se han reportado análisis de *Aspergillus* (*A. niveus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*) con actividad celulolítica en UPF/ml aislados de una fuente ambiental nativa, incluido suelo, aire y plantas de trigo infectadas mediante una técnica de enriquecimiento evaluados a temperaturas de 30 y 37°C, los cuales presentaron actividad enzimática entre 0.17 y 0.28 UPF/ml, presentando mayor productividad a 30°C en los microorganismos *A. terreus* y *A. nidulans* (Jahangeer *et al.*, 2005), los cuales son mayores a los análisis reportados en el presente estudio donde la mayor actividad a 28°C fue de 0.2 UPF/ml (Figura 3).

Figura 3.
Actividades enzimáticas producidas en cultivo sumergido (UPF/ml) de hongos evaluados a 28, 37 y 45 °C.



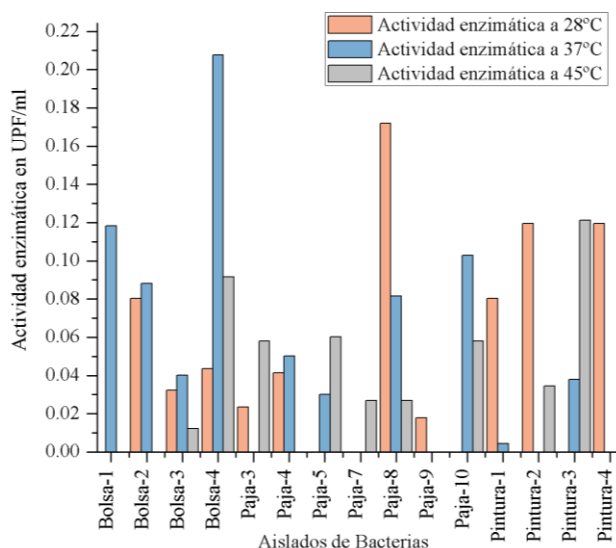
En cuanto a estudios reportando el género *Penicillium*, un aislado de suelo contaminado de la industria aldonera presentó actividad celulolítica favorable, una vez halladas las condiciones optimizadas de producción de celulasas se presentó actividad enzimática de 1.62 UPF/ml a 37 °C (Prasanna *et al.*, 2016). Además, se ha reportado *Trichoderma reesei* creciendo sobre paja de trigo, con máxima producción de celulasas totales de 0.5 UPF/ml en reactor en condiciones de tamizaje (Rodríguez-Gomez *et al.*, 2012).

Por otra parte, en cuanto al análisis de los aislados bacterianos, a 28°C la mayor actividad celulolítica la presentó la bacteria denominada Paja-8 (*Bacillus sp.*), 0.18 UPF/ml. Mientras que, a 37°C, Bolsa-4, una bacteria Gram negativa, presentó una actividad enzimática de 0.2 UPF/ml. En la temperatura de 45°C si se encontró crecimiento de algunas bacterias, dentro de las cuales, la identificada como Pintura-3, un bacilo Gram negativo presentó la mayor actividad, 0.12 UPF/ml (Figura 4).

Estos resultados son consistentes con reportes previos de actividad celulasa en bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* y *Serratia marcescens*), la máxima producción de celulasas fue registrada

a 40°C en las cuatro bacterias (Sethi *et al.*, 2013). Estos resultados son también similares a los reportados por Bakare *et al.* (2005), quienes encontraron que las enzimas celulasas producidas por *Pseudomonas fluorescens* presentaban una temperatura óptima de producción a 35°C (Wang *et al.*, 2024). Anteriormente se han reportado análisis de la capacidad celulolítica de bacterias aisladas de tracto gastrointestinal y compostaje de un hipopótamo, de las cuales 5 cepas mostraron actividad celulolítica de hasta 11 UPF/ml, identificadas como del género *Bacillus spp.*, incluso presentó mayor actividad que el control positivo *Trichoderma reesei*, la actividad fue evaluada a un pH de 4.8 (da Cruz Ramos *et al.*, 2016).

Figura 4.
Actividades enzimáticas producidas en cultivo sumergido (UPF/ml) de bacterias evaluadas a 28, 37 y 45 °C.



3.4 Comparación de las técnicas evaluados respecto a las actividades enzimáticas

Para los ensayos semicuantitativos se utilizó CMC para medir la actividad enzimática el cual es un sustrato soluble mientras que para los ensayos cuantitativos se utilizó papel filtro que se caracteriza por ser un sustrato insoluble. Se sometieron a las mismas condiciones, ya que, se incubaron por tres días a las mismas temperaturas. Las diferencias encontradas se deben principalmente a la evaluación diferencial de los sistemas enzimáticos, ya que en la prueba cuantitativa se debe registrar la concentración de glucosa liberada, para lo cual se requiere el complejo completo; mientras que, en el semicuantitativo, solamente con el rompimiento de la CMC, por las endo y exoglucanasas se evidencia un halo de hidrólisis.

Para los hongos se pudo observar, en los ensayos semicuantitativos o superficiales que, a mayor temperatura, mayor IE, mientras que, en cultivo líquido, los resultados fueron variables y muy pocos aislados resaltaron por su alta actividad. No se observó algún patrón como que al ir aumentando de IE, se encontrara alguna elevación de la actividad en unidades papel filtro (UPF).

La discrepancia que existe en la actividad enzimática de los ensayos por ambas técnicas también se debió a que, para las muestras en medio líquido, la reacción con el sustrato (papel filtro) se lleva a cabo a 50°C durante una hora, mientras que en los ensayos con medio superficial se dio de manera simultánea tanto el crecimiento del microorganismo, como la producción de las celulasas y consumo de sustrato a temperaturas de 28, 37 y 45 °C por 72 h. De acuerdo con Viikari *et al.* (2007), quienes describen que las tasas de hidrólisis evaluadas a una temperatura entre 40 y 50 °C generalmente se consideran como tasas de hidrólisis lenta, esto se debe a que se deben utilizar microorganismos termoestables que soporten altas temperaturas para que sean capaces de producir enzimas termoestables. Entre los microorganismos termoestables reportados tenemos *Bacillus*, *Geobacillus sp.*, *Talaromyces emersoni*, *Thermoascus aurantiacus*, etc., que toleran temperaturas superiores de 60 °C hasta 80 °C.

Los ensayos realizados con bacterias por los dos métodos y a diferentes temperaturas, no permitió concluir sobre alguna relación entre ellos. Se encontró que bacterias que no habían crecido a 45°C en medio superficial si crecieron y presentaron actividad al ser inoculadas en medio líquido. Se encontró menor actividad, ya que la máxima fue de 0.12 UPF/ml a 45°C mientras que a 28 y 37°C se registró actividad enzimática de 0.2 y 0.18 UPF/ml, respectivamente. Esto se pudo ver influenciado debido a que en la prueba semicuantitativa realizada en cultivo superficial en caja de Petri, el microorganismo se encontraba en la superficie, además que el medio estuviera directamente expuestos a una temperatura de 45 °C, lo que provoca la deshidratación del medio, causando que el microorganismo no creciera, mientras que en la prueba cuantitativa fue cultivo sumergido, lo que permitió que el inóculo se encontrara disuelto dentro del medio y rodeado de humedad.

Respecto a este hecho, reportes anteriores enfatizan que los datos de hidrólisis de sustrato soluble no proporcionan información útil sobre la hidrólisis de sustratos insolubles, ya que, la accesibilidad de las enzimas al enlace β -glucosídico es del 1.8%, muy bajo comparado con el enlace CMC que es 100% accesible. Además, el grado de polimerización es diferente, ya que, el papel filtro está compuesto en su mayoría de fibras de celulosa con un grado de polimerización alto de 750 a 2800, lo que significa que las cadenas de glucosa que la componen son bastante largas en comparación con la CMC, cuyo grado de polimerización suele ser menor, posiblemente entre 100 a 2000 unidades (Percival Zhang *et al.*, 2006).

IV. CONCLUSIONES

Los hongos aislados de algodón, cartón y de paja de maíz presentaron los mayores índices enzimáticos y de actividad en cultivo líquido medido por unidades papel filtro, estos aislados son pertenecientes a los géneros ya reportados ampliamente como productores de celulasas. Los valores de tamizaje inicial presentados en este estudio son valores iniciales competitivos para avanzar hacia una optimización de condiciones de cultivo y futuros estudios de caracterización de enzimas y degradación de residuos lignocelulósicos de la región. Por otra parte, las bacterias aisladas de bolsa plástica y de paja de maíz presentaron valores similares a los obtenidos en los hongos en medio líquido (UPF). Los aislados de bacterias y hongos tuvieron producción de celulasas a las 3 temperaturas

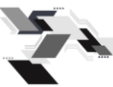
evaluadas en medio líquido, pero en medio superficial no se evidenció producción enzimática a 45°C para las bacterias. Las dos pruebas realizadas fueron complementarias por lo que evalúa diferentes sistemas enzimáticos. Un tamizaje rápido con medio líquido es un sistema completo y sencillo, con resultados ideales para este tipo de estudios iniciales de selección de cepas celulolíticas. Este estudio es el inicio de la exploración del potencial microbiano natural que habita los residuos agroindustriales hacia la valorización de los mismos.

V. AGRADECIMIENTOS

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

VI. REFERENCIAS

- Azhar, S., Aihetasham, A., Chaudhary, A., Hussain, Z., Abdul Rehman, R., Abbas, G., Alharbi, S. A., Ansari, M. J., & Qamer, S. (2024). Cellulolytic and Ethanogenic Evaluation of *Heterotermes indicola*'s gut-Associated Bacterial Isolates. *ACS Omega*, 9(10). <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10030>
- Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., & Shonukan, O. O. (2005). Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 898-904.
- Belmont-Montefusco, E. L., Nacif-Marçal, L., de Assunção, E. N., Hamada, N., & Nunes-Silva, C. G. (2020). Cultivable cellulolytic fungi isolated from the gut of Amazonian aquatic insects. *Acta Amazonica*, 50(4), 346–354. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202000902>
- da Cruz Ramos, G. F., Ramos, P. L., Passarini, M. R. Z., Vieira Silveira, M. A., Okamoto, D. N., de Oliveira, L. C. G., Zezzo, L. V., Marem, A., Santos Rocha, R. C., da Cruz, J. B., Juliano, L., & de Vasconcelos, S. P. (2016). Cellulolytic and proteolytic ability of bacteria isolated from gastrointestinal tract and composting of a hippopotamus. *AMB Express*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0188-x>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9). [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4). <https://doi.org/10.1128/mmbr.65.4.497-522.2001>
- Demissie, M. S., Legesse, N. H., & Tesema, A. A. (2024). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from forest, cow dung, Dashen brewery and agro-industrial waste. *PLoS ONE*, 19(4), e0301607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301607>
- Desvaux, M. (2005). The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(4). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.04.025>
- Gupta, V. K., Bakshi, M. P. S., & Langar, P. N. (1987). Microbiological changes during natural fermentation of urea-wheat straw. *Biological Wastes*, 21(4). [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(87\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0269-7483(87)90074-7)



- Herculano, P. N., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Neves, R. P., Souza-Motta, C. M., & Porto, A. L. F. (2011). Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). *Current Microbiology*, 62(5), 1416–1422. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9879-3>
- Islam, F. (2019). Isolation and Characterization of Cellulase-producing Bacteria from Sugar Industry Waste. *American Journal of BioScience*, 7(1). <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20190701.13>
- Jahangeer, S., Khan, N., Jahangeer, S., Sohail, M., Shahzad, S., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2005). Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3), 739–748.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. In *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
- Miller, F. C. (2020). Composting of Municipal Solid Waste and its Components. In *Microbiology of Solid Waste*. <https://doi.org/10.1201/9780138747268-4>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3). <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- M'barek, H. N., Taidi, B., Smaoui, T., Aziz, M. B., Mansouri, A., & Hajjaj, H. (2019). Isolation, screening and identification of lignocellulolytic fungi from northern central Morocco. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 23(4), 207–217. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.18182i>
- Odufa, S. A., & Oyewole, O. B. (1986). Identification of *Bacillus* species from 'iru', a fermented African locust bean product. *Journal of Basic Microbiology*, 26(2), 101–108. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620260212>
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Sim, S. J., & Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: Current status and perspectives. In *Bioresource Technology* (Vol. 279). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- Percival Zhang, Y. H., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. In *Biotechnology Advances*, 24 (5), 452–481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>
- Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158(1), 58–68. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054031-0>
- Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. 3. *Biotech*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0483-x>
- Rodriguez-Gomez, D., Lehmann, L., Schultz-Jensen, N., Bjerre, A. B., Hobbey, T. J. (2012) Examining the Potential of Plasma-Assisted Pretreated Wheat Straw for Enzyme Production by *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 2051–2063. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9631-x>
- Rodriguez-Gomez, D., & Hobbey, T. J. (2013). Is an organic nitrogen source needed for cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30?. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 2157–2165. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1381-6>
- SAGARPA. (2015). Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas primera etapa: diagnóstico nacional. [Archivo PDF]. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346978/Manejo_de_residuos_Detallado.pdf
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *International Scholarly Research Notices, Biotechnology*, 2013(1), 985685. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4). <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>
- Varalakshmi, K. N., Kumudini, B. S., Nandini, B. N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B., & Kavitha, A. P. (2009). Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 29–36. PMID: 19469283
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-aho, M. (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In Olsson, L. (Ed.). In *Biofuels. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108. 121–145. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_065
- Wang, J., Bao, F., Wei, H., & Zhang, Y. (2024). Screening of cellulose-degrading bacteria and optimization of cellulase production from *Bacillus cereus* A49 through response surface methodology. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58540-7>
- Xia, L., & Cen, P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 34(9). [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00015-1)
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2004). Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 832–837. <https://doi.org/10.1002/bit.20286>
- Yepes, S. M., Montoya Naranjo, L. J., & Orozco Sánchez, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales - frutas - en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 61(1), 4422–4431.

VII. AUTORES

Fatima Navarro Mosqueda

 <https://orcid.org/0009-0002-7477-0262>

Varinia López Ramírez

 <https://orcid.org/0000-0002-0948-9960>

Ricardo Morales Rodríguez

 <https://orcid.org/0000-0001-5909-2155>

Divanery Rodríguez Gómez

 <https://orcid.org/0000-0002-4457-5338>