

9. RESULTADOS

9. 1 Aislamiento.

A partir de las muestras recolectadas de bagazo de caña de azúcar, y siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, se aislaron un total de 6 cepas, las cuales fueron nombradas como LEV01, LEV02, LEV04, LEV05, LEV06 y LEV07. Todas las cepas crecieron en el medio mínimo adicionado con lignina, sin embargo el medio de cultivo no presentó cambio de coloración y la única evidencia de crecimiento en el medio fue la presencia de colonias grandes y mucosas sobre el agar. Cabe mencionar que en este aislamiento crecieron también hongos y bacterias, por lo tanto se realizaron siembras en agar papa dextrosa y medio Sabouroud (con tetraciclina) para obtener las cepas puras.

9.2 Identificación.

Una vez que se aislaron y purificaron las cepas, se realizó la identificación de las mismas y cuando se hizo la tinción de Gram, pudieron observarse al microscopio estructuras redondas y ovaladas con mayor tamaño que el de las bacterias, también pudieron verse levaduras en fase de gemación y estructuras mas teñidas que otras (Figura-6).

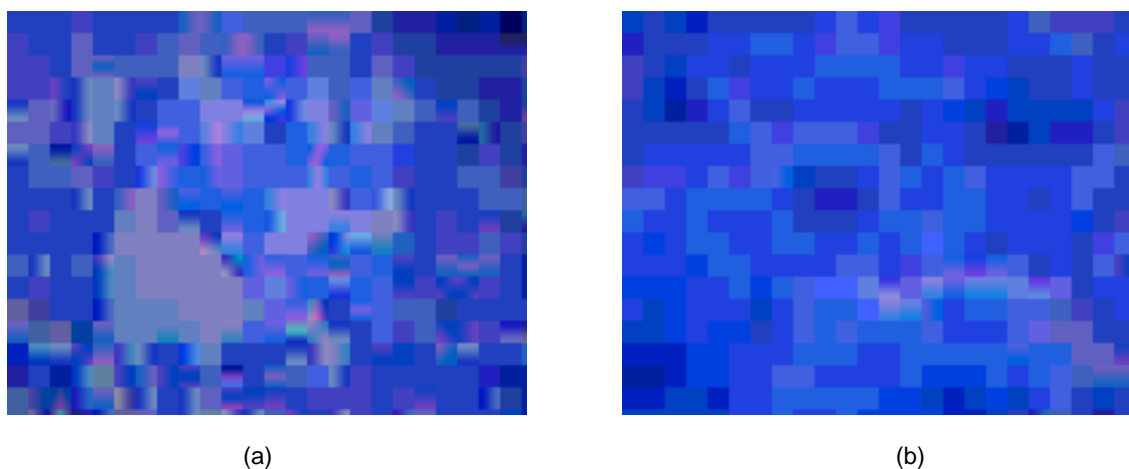


Fig. 6. Levaduras vistas al microscopio (100x), por medio de la tinción de Gram a) estructuras ovaladas b) estructuras redondas

Después de la identificación morfológica, se realizaron las pruebas bioquímicas. Transcurridas 48 horas de incubación y después de la identificación en placa y en el microscopio, se logró identificar el género y la especie de los microorganismos aislados (Tabla-5), los cuales se indican a continuación:



a) *Geotrichum spp* (LEV 01)



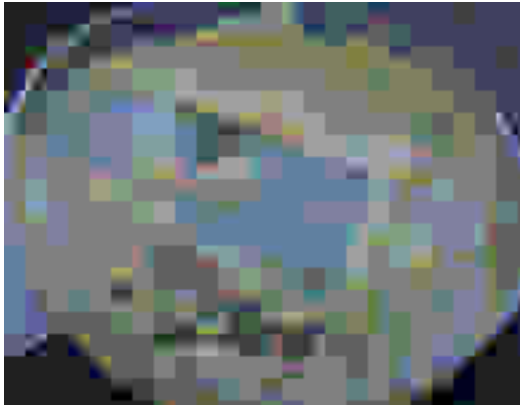
b) *Geotrichum spp* (LEV 02)



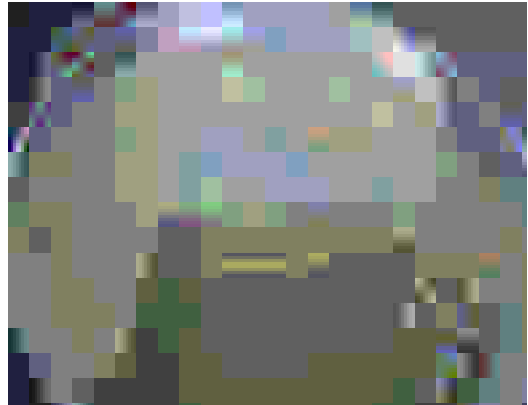
d) *Cryptomyces laurentii* (LEV 04)



c) *Rhodotorula glutinis* (LEV 05)



d) *Cryptomyces laurentii* (LEV 06)



e) *Cándida sake* (LEV 07)

Tabla 5. Resultados de pruebas bioquímicas mini API

Organismo	Perfil	% de identificación	Pruebas de confirmación
<i>Geotrichum spp</i> (LEV 01)	Muy buena identificación	90.2	GAL 90 % LAT 94 % MAN 95 % INO 10 %
<i>Geotrichum spp</i> (LEV 02)	Muy buena identificación	90.1	GAL 90 % LAT 94 % MAN 95 % INO 5 %
<i>Cryptoyices laurentii</i> (LEV 04)	Excelente identificación	99.9	LAT 100 % GLY 99 % GLN 99 %
<i>Rhodotorula glutinis</i> (LEV 05)	Muy buena identificación	78.3	GAL 80 % SBE 20 %
<i>Cryptomyces laurentii</i> (LEV 06)	Excelente identificación	99.5	LAT 100 % GLY 99 % GLN 80 %
<i>Candida sake</i> (LEV07)	Excelente identificación	95.3	GAL 80% MAL 90% GLY 83%

9.3 Crecimiento de las levaduras y degradación de lignina

Es importante mencionar que antes de efectuar la prueba de degradación, se realizaron ensayos preliminares para conocer las condiciones adecuadas de crecimiento, así como el medio de cultivo que debía utilizarse para el desarrollo de este trabajo.

El primer medio que se probó contenía lignina al 1% como única fuente de carbono, sin embargo ninguno de los organismos fue capaz de crecer.

Por otra parte, con la finalidad de activar algunas enzimas manganeso peroxidadas, se adicionó MnSO_4 (4.5mM) al medio de cultivo, ya que algunos autores indican que algunos organismos pueden realizar la degradación cuando este componente está presente (25), pero como en el caso anterior, no se obtuvieron resultados, razón por la cual en el siguiente experimento se disminuyó la concentración de lignina y se adicionó glucosa como fuente de carbono. Bajo estas condiciones se pudieron obtener los siguientes resultados.

A cada una de las cepas identificadas se les realizó la prueba de degradación de lignina tanto en medio sólido como líquido. Durante este experimento se utilizó a *Pleurotus spp* como control positivo. El medio de cultivo fue preparado con lignina al 0.2% y enriquecido con glucosa al 1%. En ésta prueba se esperaba ver el crecimiento de las cepas, así como el cambio de coloración del medio, pues éste es de color café oscuro y según lo revisado en la literatura, el medio cambia a un color amarillento cuando la concentración de lignina disminuye en el medio de cultivo.

Analizando los resultados se pudo verificar que la adición de glucosa y lignina al 0.2% favorece la degradación, pues se hicieron experimentos para saber cual es la concentración de lignina que los organismos pueden degradar.

Una vez que se sembraron las levaduras, pudo observarse crecimiento tanto en medio líquido como en medio sólido, sin embargo, únicamente en el medio líquido se vio un notable cambio de color (Figura-7). Estos resultados se resumen en la Tabla-6.

Tabla-6. Resultados de degradación

Levadura	Medio sólido		Medio líquido	
	Crecimiento	Cambio de color	Crecimiento	Cambio de color
LEV01	+	-	+	+
LEV02	+	-	+	+
LEV04	+	-	+	+
LEV05	+	-	+	+
LEV06	+	-	+	+
LEV07	+	-	+	+

+ indica positivo, - indica negativo

Una vez que se analizaron las muestras, se verificó que las levaduras no estaban contaminadas y que siguieron una crecimiento típico según lo que se puede ver en cada una de las curvas de crecimiento.

Por otra parte se determinó la concentración de lignina (mediante curva de calibración Figura-8) y se pudo observar que las levaduras fueron capaces de degradar a este compuesto, ya que dicha concentración fue disminuyendo con respecto al tiempo hasta llegar a un punto en el en que ya no hubo disminución ni cambios importantes. El tiempo total del experimento fue de 39 días.



(a) (1) (2) (3) (4)

Fig. 7. La fotografía muestra el cambio de color en el medio de cultivo donde crecieron algunas levaduras, y *Pleurotus*, después de los primeros 5 días de crecimiento. Los matraces que mas cambio de color mostraron fueron donde crecieron *Pleurotus* y *Cryptomyces laurentii* a) Medio de cultivo sin microorganismos. 1) Medio de cultivo con *Pleurotus* 2) Medio de cultivo con *Cryptomyces laurentii* 3) Medio de cultivo con *Geothricum spp* y 4) Medio de cultivo con *Candida.sake*.

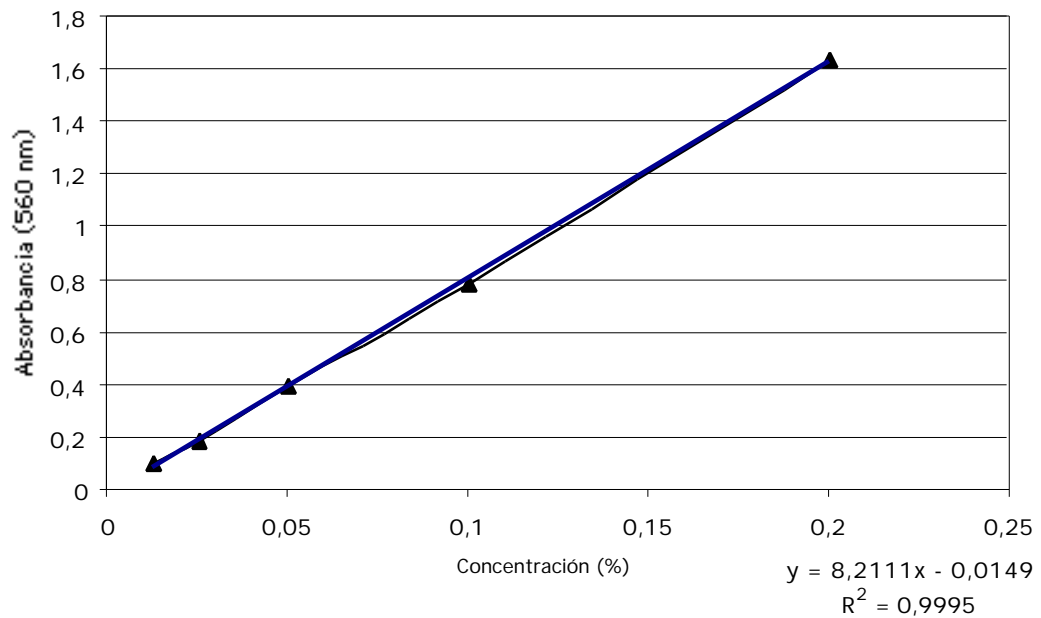


Fig. 8. Curva de calibración, lecturas tomadas a 560 nm en un espectrofotómetro Varian

a) LEV 01

Geotrichum spp (LEV01) presentó una fase lag de cuatro días (Figura-9), mientras que la fase de crecimiento exponencial duró aproximadamente 12 días, manteniéndose en fase estacionaria por un período de 16 días, hasta llegar a la fase de muerte. El tiempo de duplicación de este microorganismo fue de 2.76 días.

Por otra parte, este microorganismo provocó cambio de coloración en el medio de cultivo además de disminuir la concentración de lignina desde 0.2% hasta 0.12%. Es importante mencionar que la fase de crecimiento exponencial termina el día 16 y aproximadamente en ese tiempo termina también la degradación (día 18). El porcentaje de degradación para este caso fue de 40%.

En ésta gráfica (Figura-9) también se puede observar que no existe simetría entre el crecimiento del organismo y la degradación que realizó, ya que cuando la levadura está pasando por la etapa de adaptación al medio de cultivo es cuando realiza la mayor parte de degradación de lignina. Sin embargo cuando esta en fase de crecimiento exponencial disminuye el porcentaje de degradación, aunque éste se sigue realizando inclusive en la etapa estacionaria.

Es decir, la cepa presenta mayor actividad de degradación cuando fue recién inoculada al medio de cultivo y a medida que el tiempo va transcurriendo la actividad disminuye, probablemente porque la concentración de glucosa ha disminuido o se ha terminado, demostrando que este organismo necesita de glucosa para tener actividad degradativa.

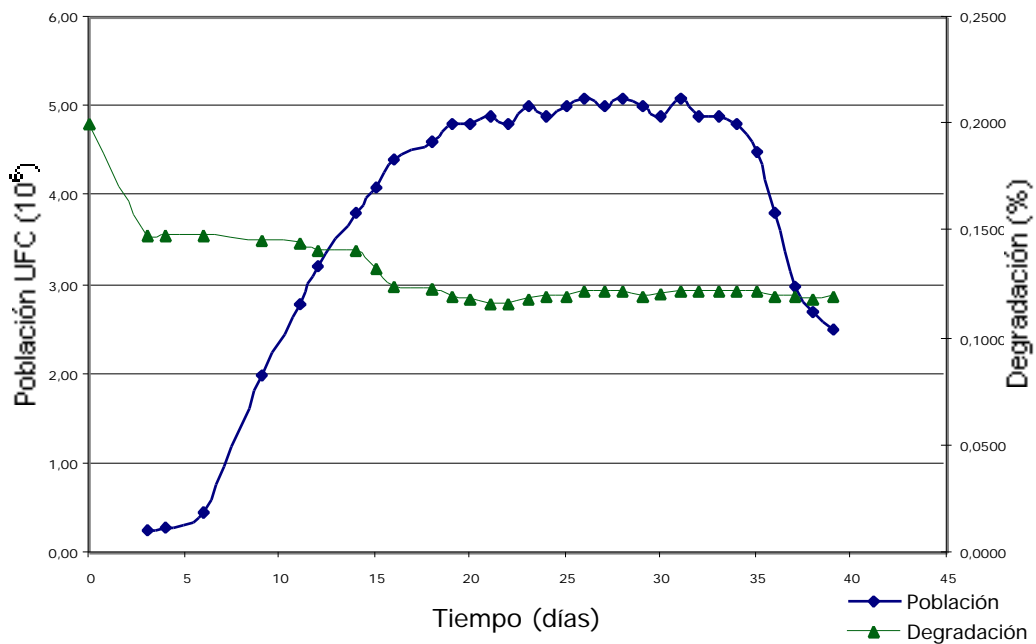


Fig. 9. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por *Geotrichum spp.* (LEV01). El porcentaje total de degradación es de 40%.

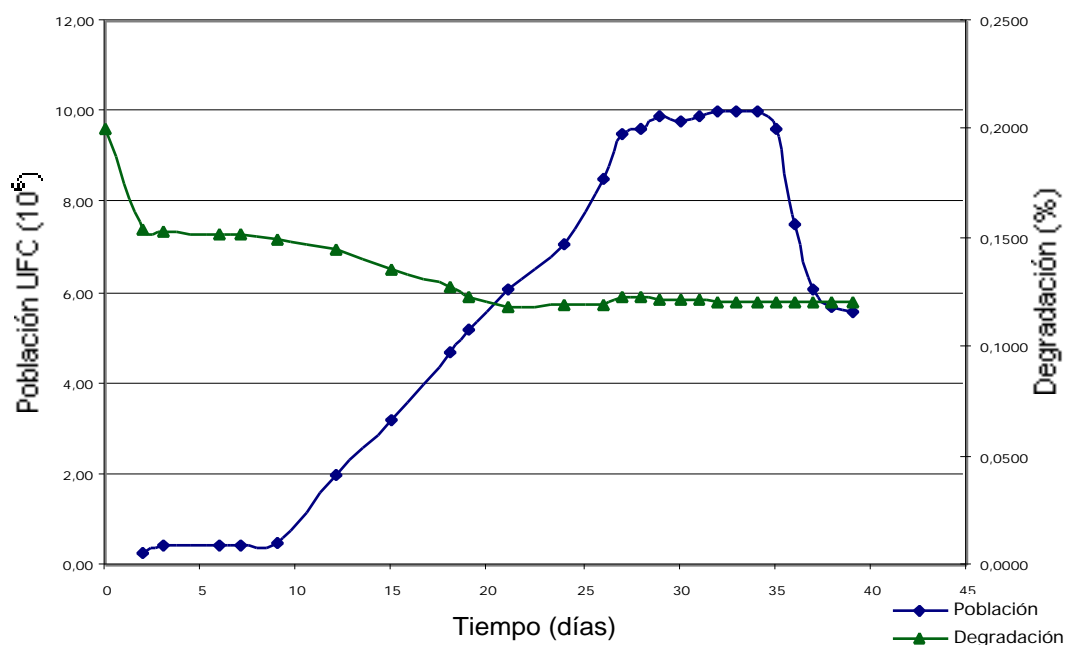
b) LEV 02

La cepa de *Geotrichum spp.* presentó un comportamiento similar a la cepa anterior, ya que también disminuyó la concentración de lignina desde 0.2% hasta 0.12% (Figura-10), pero la degradación terminó aproximadamente en el día 21. El porcentaje de degradación fue de 40%. En cuanto a su crecimiento, éste microorganismo presentó una fase de adaptación larga en comparación con la anterior, sin embargo la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración aproximada de 18 días. Su tiempo de duplicación fue de 2.95 días.

De igual manera que para la cepa 01, no hay simetría entre el crecimiento y la degradación pues como se menciona anteriormente, este organismo tiene una etapa de adaptación larga y es cuando se realiza la mayor parte de la transformación de

lignina y aunque la levadura continúa su crecimiento no se presenta una degradación importante.

De igual forma podemos asumir que este organismo requiere de glucosa para tener actividad, y cuando ésta disminuye o se termina le es difícil continuar con la



degradación.

Fig. 10. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por *Geotricum spp* (LEV02). El porcentaje total de degradación de 40%

c) LEV 04

El crecimiento de ésta levadura presentó una fase lag muy corta, lo que demuestra que pudo adaptarse rápidamente al medio de cultivo; la fase de crecimiento exponencial duró 12 días y la fase estacionaria también tuvo una duración de 12 días (Figura-11). El tiempo de duplicación de este microorganismo fue de 4.09 días. Por otra parte *Cryptomyces laurentii* provocó que la concentración de lignina disminuyera hasta 0.10 %, hubo un cambio importante en el color del medio de cultivo y fue el que quedó más claro en comparación con las demás cepas (Figura-15). La degradación total fue de 50 % .

Observando la gráfica (Figura-11) también podemos analizar que inmediatamente que la levadura fue inoculada al medio de cultivo, la concentración de lignina disminuyó casi al 50%. Este comportamiento es el mismo que en los casos anteriores,

en donde el crecimiento del organismo y la degradación dependen en gran parte de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo.

Es importante mencionar que aunque se utilizó una técnica indirecta para medir la concentración de lignina, pudimos ver claramente que el medio de cultivo cambió de color radicalmente demostrando que la concentración de lignina disminuyó y que la cepa tuvo la capacidad de metabolizar a dicho compuesto, de hecho *Cryptomyces* fue la levadura que presentó una mayor actividad en comparación con las demás cepas que se aislaron en este proyecto inclusive fue mejor que el organismo utilizado como control positivo.

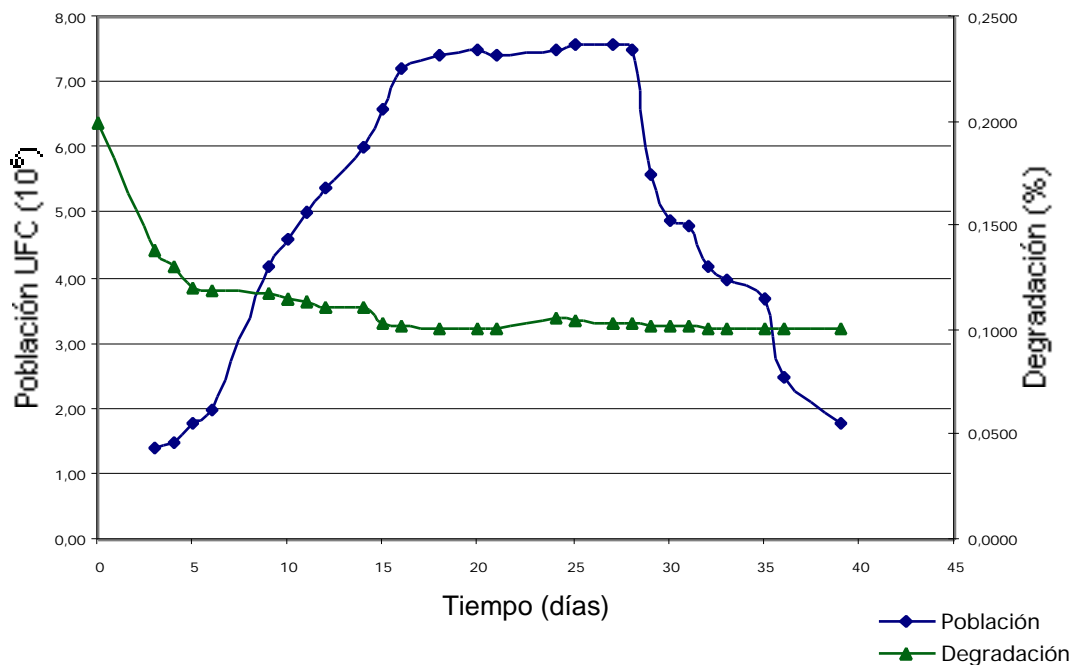


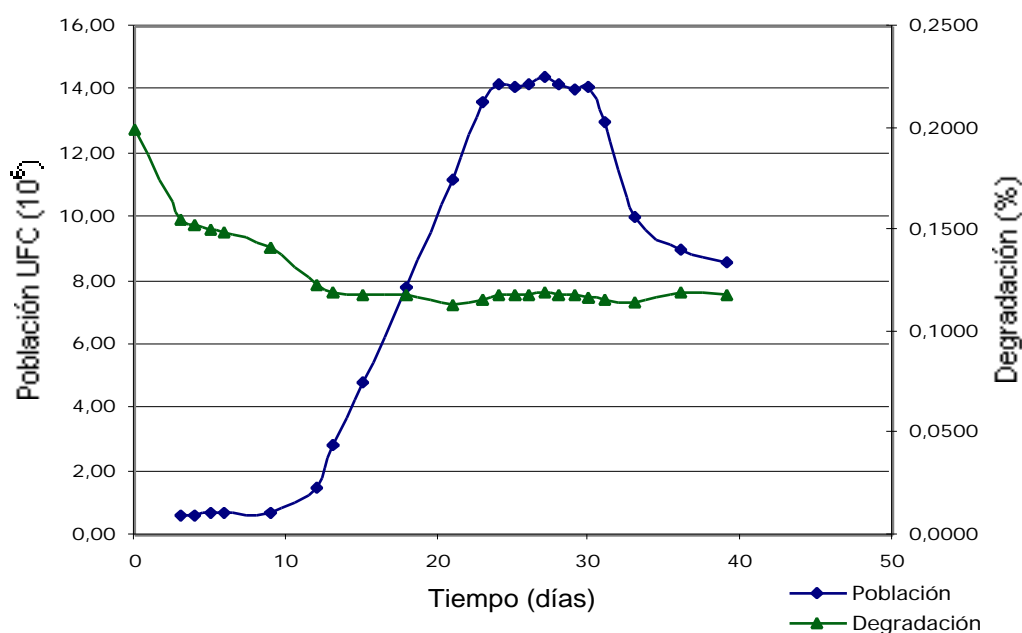
Fig. 11. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por la levadura 04 que pertenece al género *Cryptomyces laurentii*. El porcentaje total de degradación de 50%

d) LEV 05

Esta levadura (*Rhodotorula glutinis*) presentó una curva con una fase lag larga (9 días) y una fase de crecimiento exponencial de 11 días, terminando en el día 24 para llegar posteriormente a la fase estacionaria (Figura-12). El tiempo de duplicación fue de 2.10 días. Por otra parte *Rhodotorula glutinis* ocasionó que la concentración de

lignina disminuyera hasta 0.12 %. El cambio de color no fue tan evidente como el causado por la cepa anterior sin embargo si se pudo observar. Este microorganismo terminó la degradación el día 21 que es aproximadamente el mismo en que termina su fase de crecimiento exponencial. La degradación total fue de 40 %

En este caso aunque se trata de otro género y especie diferentes a los anteriores también se presentó la falta de simetría entre el crecimiento y la degradación, demostrando una vez más, que la levadura requiere glucosa para tener actividad sobre



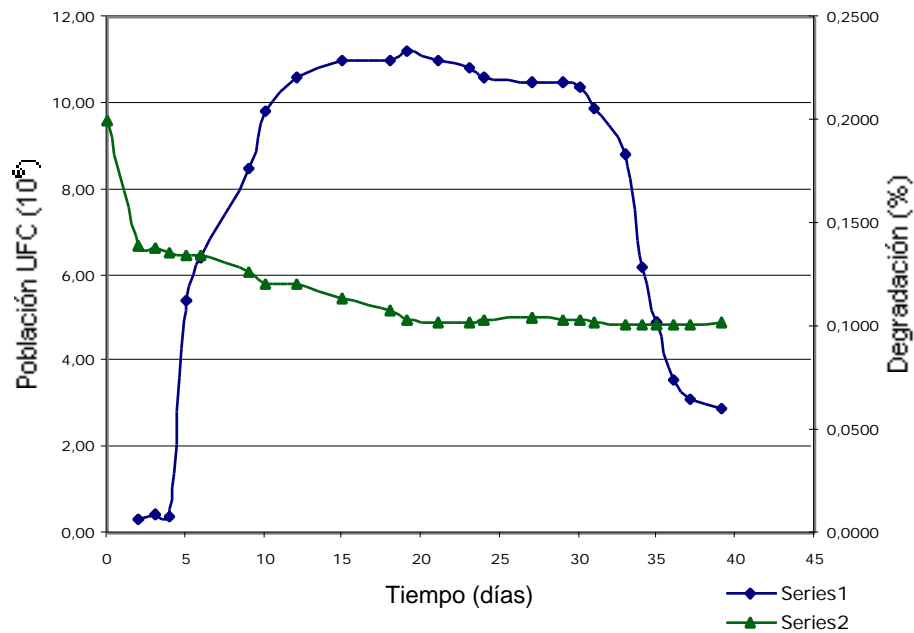
la lignina.

Fig. 12. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por *Rhodotorula glutinis* (LEV05). El porcentaje total de degradación de 40%

e) LEV 06

Cryptomyces laurentii tiene una fase logarítmica de 8 días y 18 días de fase estacionaria y presentó un tiempo de duplicación de 2.28 días. Por la parte de degradación se tiene que la levadura disminuyó la concentración de lignina hasta 0.10 % (Figura-13). El cambio de color fue notable y la degradación terminó en el día 18 aproximadamente. El porcentaje total de degradación fue de 50 %.

Este microorganismo tuvo el mismo comportamiento al de la cepa 04, que además pertenece al mismo género y especie. La degradación comienza en los primeros días de crecimiento, aún cuando la levadura está pasando por la fase lag de crecimiento. Pero con la diferencia que al final de la fase estacionaria ya no hubo cambios en la concentración de lignina (Figura-13). De nueva cuenta no existe relación entre el crecimiento y la degradación, aunque se sugieren otros experimentos que confirmen



lo aquí descrito.

Fig. 13. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por *Cryptomyces laurentii* (LEV06). El porcentaje total de degradación de 50%

f) LEV07

La cepa (*Candida sake*) presentó una fase de adaptación de 9 días y la fase logarítmica tuvo una duración de 10 días. El tiempo de duplicación de este organismo es de 3.65 días. Por la parte de degradación se tiene que la levadura disminuyó la concentración de lignina hasta 0.11 %. Dicha actividad terminó en el día 29 y el porcentaje total de degradación fue de 45 % (Figura-14)

En ésta gráfica (Figura-14) también se puede observar que no existe simetría entre el crecimiento del organismo y la degradación que realizó, ya que cuando la levadura está pasando por la etapa de adaptación al medio de cultivo es cuando realiza la mayor parte de degradación de lignina.

Como se puede ver en cada una de las gráficas, el comportamiento de todas las levaduras aisladas es muy parecido y en todos los casos se confirma el hecho de que desde el primer momento que se inocula el microorganismo comienza la degradación.

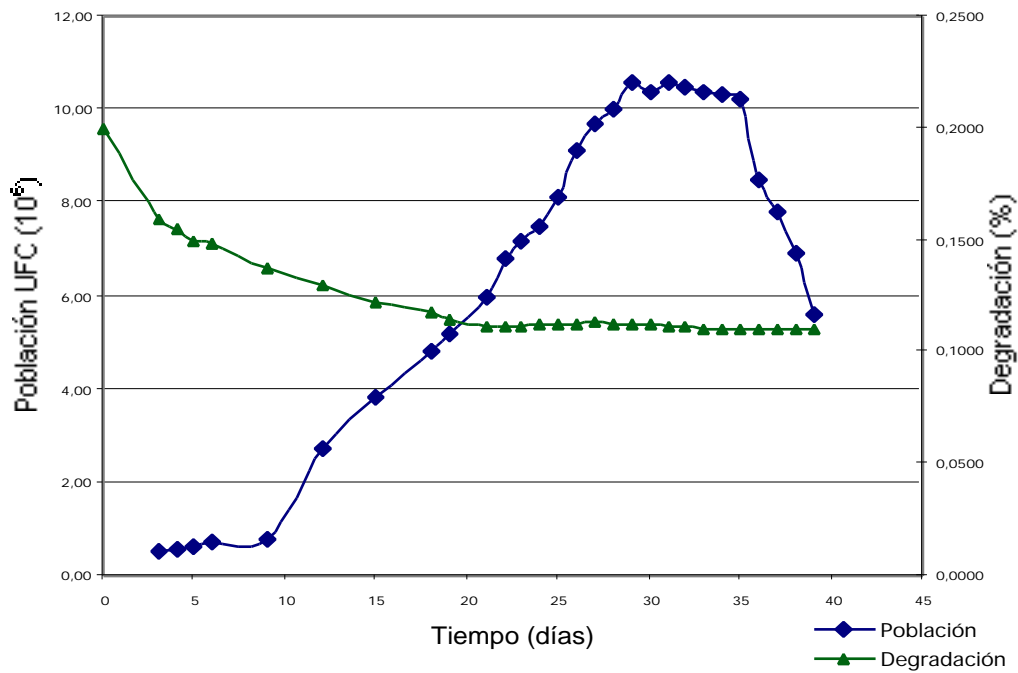


Fig. 14. La gráfica muestra la curva de crecimiento y la curva de degradación realizada por *Candida sake* (LEV07). El porcentaje total de degradación fue de 45%

También se analizó si la combinación de microorganismos en el mismo medio podría mejorar esta degradación, por lo tanto se realizaron consorcios entre *Geotrichum spp* (LEV01), *Cryptomyces laurentii* (LEV04) y *Pleurotus spp*.

Como se puede ver en la Figura-15 en este experimento también pudo observarse el cambio de color en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos de estos experimentos, demostraron que las levaduras generan un porcentaje mayor de degradación cuando crecen solas en el medio de cultivo que cuando se encuentran formando el consorcio a pesar de que en dicho consorcio se encontraba también *Pleurotus spp*.

Finalmente, comparamos las curvas de degradación de lignina de todas las levaduras y como se puede ver en la figura-16, prácticamente todas las cepas muestran una curva de degradación muy similar.



Fig. 15 La fotografía muestra el notable cambio de color de sobrenadantes donde crecieron las levaduras y el hongo filamentoso. En todos los tubos se realizó la extracción de biomasa y solo se muestra como quedó el caldo de cultivo.

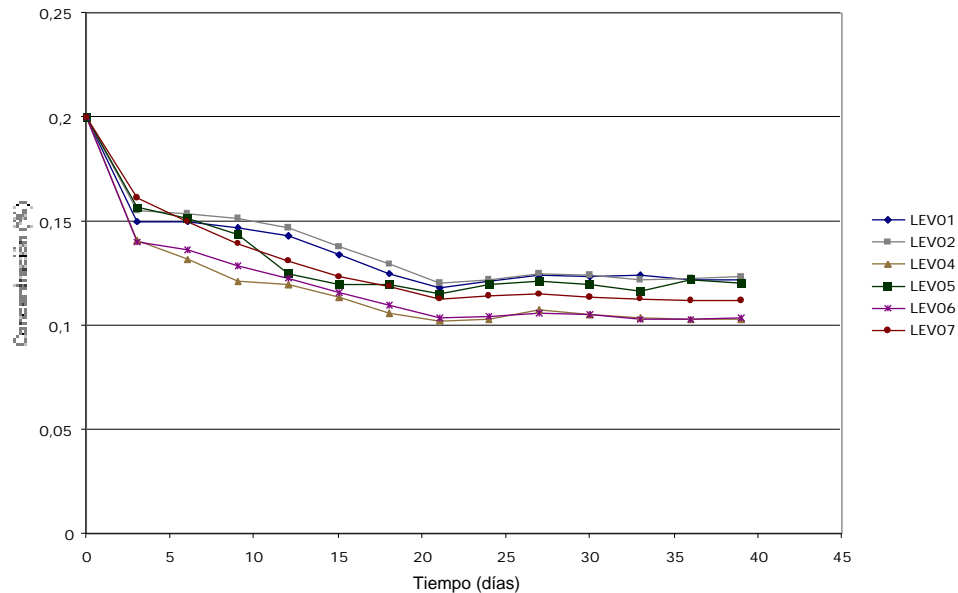


Fig. 16. La gráfica muestra un comparativo de degradación entre todos los organismos aislados.

9.4 Determinación de los compuestos que se formaron durante la degradación.

Una vez que se pudo comprobar que las cepas aisladas eran capaces de degradar a la lignina; se buscaron a los metabolitos que se formaron durante dicha degradación.

Después de hacer el análisis correspondiente, se observó que en ninguno de los sobrenadantes se formó algún compuesto semejante al estándar que fue utilizado durante el experimento, el cual contenía básicamente compuestos clorados (Figura-17), sin embargo después de realizar varias pruebas se detectaron otro tipo de compuestos.

Los compuestos que aparentemente se encontraban en las muestras, fueron fenol y vainillina.

Se prepararon los estándares correspondientes de fenol y vainillina para determinar la concentración de estos compuestos en las muestras (Figura-18).

No se pudo determinar la concentración de estos compuestos en todas las muestras sin embargo si se encontró el pico representativo de cada sustancia (Tabla-7)

Tabla-7. Metabolitos formados durante la degradación

Levaduras	Vainillina		Fenol	
	Presencia	Concentración (ppm)	Presencia	Concentración (ppm)
<i>Geotrichum spp</i> (EV01)	+	-	+	-
<i>Geotrichum spp</i> (LEV02)	+	-	+	-
<i>Cryptomyces laurentii</i> (LEV04)	+	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> (LEV05)	+	-	+	-
<i>Cryptomyces laurentii</i> (LEV06)	-	-	-	-
<i>Candida sake</i> (LEV07)	+	23	+	7

+ presencia del compuesto - ausencia del compuesto

En la figura-19 se muestran el cromatograma y el espectro de masas tanto de fenol como de vainillina del sobrenadante donde creció la levadura 02 (*Geotrichum spp*), después de 19 días de crecimiento. Estos resultados, junto con las curvas de degradación confirman que las levaduras pueden biotransformar la molécula de lignina en compuestos derivados de dicha sustancia.

Los resultados anteriores fueron similares a los obtenidos analizando el sobrenadante donde creció la levadura 04 (*Cryptomyces laurentii*) correspondiente al día 27 de crecimiento. Evaluando tanto el cromatograma como el espectro de masas se confirmó la presencia de vainillina aunque no se pudo determinar la concentración del compuesto y tampoco se detectó la presencia de fenol (Figura-20). Cuando se analizó el sobrenadante donde creció la levadura 05 (*Rhodotorula glutinis*), se observó únicamente la presencia de vainillina, igual que en el caso anterior, inclusive concuerda con el día 27 de crecimiento (Figura-21).

Por último, se analizó el sobrenadante del día 27, donde creció la levadura 07 (*Candida sake*) y como se puede observar tanto en el cromatograma como en el espectro de masas, fueron fenol y vainillina algunos de los compuestos identificados (Figura-22). En este experimento si se logró determinar la concentración presente de cada uno de los compuestos encontrados.

Durante estos análisis cromatográficos, las muestras correspondientes a la levadura 07 fueron en las que en repetidas ocasiones se encontraron fenol y vainillina a diferencia de las demás cepas, en las cuales no se observó el mismo comportamiento. En el sobrenadante donde creció la cepa 06, no se encontró ninguno de los compuestos señalados anteriormente, sin embargo se sugieren experimentos posteriores que confirmen lo aquí señalado.

Finalmente al conjuntar los resultados de degradación y los de formación de metabolitos, se pudo comprobar que los organismos levaduriformes estudiados en este proyecto pueden degradar lignina de una manera parcial, siguiendo vías metabólicas alternas ya que se formaron dos diferentes compuestos: fenol y vainillina.

9.5 Extracción de ácidos nucleicos.

Para tratar de detectar la presencia de algunos de los genes implicados en la degradación de lignina, fue necesario extraer los ácidos nucleicos DNA y RNA.

Para esto, se probaron diferentes protocolos ya que en un principio sólo se lograba la extracción de RNA o DNA degradado.

Dichas técnicas fueron:

- a) Extracción de DNA con el protocolo de Piper (Anexo-16)
- b) Extracción de RNA utilizando tiocianato de guanidío (GTC 4 M) (Anexo-17)
- c) Extracción de RNA utilizando una lisosima (Anexo-18)
- d) Extracción de RNA y DNA con el protocolo de Evans (detallado en la metodología).

Dichas técnicas tienen en común la utilización de disolventes como fenol y cloroformo para la extracción, además de un detergente como el SDS, que sirve para lizar los núcleos y liberar el DNA, hecho que incrementa notablemente la viscosidad de la solución. El detergente inhibe cualquier actividad nucleasa presente en la preparación, Por otra parte, también se utilizaron GTC o lisosima, con la finalidad de romper la pared celular.

Finalmente utilizando el protocolo de Evans (38) se extrajo DNA cromosomal (Figura-23) y es la muestra que se utilizó para la amplificación.

Durante los ensayos, se obtuvo primeramente RNA (Figura-24) pero sólo en una ocasión se logró extraer dicha muestra, por lo tanto se decidió trabajar con DNA, el cual se pudo obtener en diferentes ocasiones.

9.6 Amplificación.

Como se menciona anteriormente, siguiendo el protocolo recomendado, se obtuvieron muestras de RNA para realizar la técnica de RT-PCR, sin embargo sólo en una ocasión se tuvo el RNA y al realizar la amplificación, no se obtuvo ningún producto, por lo tanto, se procedió a usar DNA de cada una de las levaduras y se realizó la amplificación, aunque tampoco se obtuvo ningún producto de PCR, a pesar de que en dicha técnica se realizaron variaciones como disminuir la temperatura de hibridación de 56 a 55 y 54 °C respectivamente, además de utilizar diferentes marcas de la enzima Taq DNA polimerasa con la finalidad de verificar si la enzima era responsable de que no se realizara la amplificación.