



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**SCREENING EFECTIVO DE ACTIVIDAD
CELULOLITICA MICROBIANA**

Ramiro Andrés Pérez Valiente

Orientadora: Dra. Alicia Gardiol

Tribunal: Dra. Lina Bettucci, Mag. Silvina Rossi y Dra. Alicia Gardiol.

Agosto 2013

SUMARIO

SUMARIO.....	2
I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCIÓN.....	5
Biocombustibles	5
Generalidades del Polímero de Celulosa	5
Utilización de la Celulosa.....	6
Cristalinidad	7
Enzimas Celulolíticas	8
Inducción	9
Problemas de la hidrólisis enzimática de la celulosa.....	11
III. ANTECEDENTES DE MICROORGANISMOS	12
IV. HIPÓTESIS	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Medios de Cultivo	15
Actividad exoglucansa.....	15
Rhizobium sp.....	16
Trichoderma harzianum.....	17
Actividad Endoglucanasa	17
Rhizobium sp.....	18
Trichoderma harzianum.....	19
Actividad Exoglucanasa y Endoglucanasa	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Actividad exoglucanasa sobre crecimiento de <i>Rhizobium sp in vivo</i>	20

Actividades exoglucanasa de <i>R. cellulosilyticum in vitro</i>	21
Actividad exoglucanasa de <i>T. harzianum in vivo</i>	22
Actividad exoglucanasa de <i>T. harzianum in vitro</i>	23
Actividad Endoglucanasa de <i>R. cellulosilyticum</i> en placa sin capa fina de agar-sustrato.....	26
Actividad Endoglucanasa de <i>R. cellulosilyticum</i> en placa con capa fina de agar-sustrato.....	26
Actividad endoglucanasa en crecimiento sobre capa fina de agar - sustrato.....	28
Actividad endoglucanasa de <i>Rhizobium sp. in vitro</i>	29
Actividad <i>in vitro</i> sobre CMC utilizando sobrenadante de <i>R. cellulosilyticum</i> ..	30
Actividad endoglucanasa de <i>Trichoderma harzianum</i>	30
Actividad endoglucanasa y exoglucanasa	34
Resumen de los resultados encontrados.	36
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. Métodos seleccionados y Protocolo de screening.....	38
IX. AGRADECIMIENTOS.....	41
X. BIBLIOGRAFÍA	42

I. RESUMEN

La celulosa es el polímero más abundante sobre la tierra. Posee características fisicoquímicas que permiten que sea utilizado por ciertos microorganismos para convertirlo en energía. Sin embargo, la manipulación de estos microorganismos y del proceso de hidrólisis de la celulosa aún no se ha dilucidado de manera tal que se pueda sacar provecho de todos los beneficios que conlleva la utilización de esta fuente de biomasa para la producción de energía alternativa (no derivada del petróleo).

En Uruguay no hay aplicaciones de dicha estrategia a gran escala, pero se realizan investigaciones en el tema. El bioetanol que se utiliza en Uruguay en mezcla con la gasolina estándar no proviene de celulosa, sino de granos. Estos procesos tienen sus ventajas e inconvenientes.

En el presente trabajo se propone investigar las actividades celulolíticas endoglucanasa y exoglucanasa sobre sustratos cristalinos y amorfos de los microorganismos *R. cellulosilyticum*, *Trichoderma harzianum* y *R. trifolii*, con principal interés en el primero ya que no se conoce su actividad celulolítica en detalle debido a su reciente descripción. Por otro lado se propone un protocolo de screening de actividad celulolítica de manera tal de obtener resultados fáciles de resolver y seguros. Se utilizaron variantes de los ensayos estándar para evaluar la mejor forma de realizar los ensayos. Los reactivos utilizados fueron Rojo Congo para la actividad endoglucanasa y Mu- C (methylumbelliferyl-cellobiosido) para actividad exoglucanasa.

Se obtuvieron resultados de actividad celulolítica endoglucanasa y exoglucanasa positivos cuando se utilizaron sustratos amorfos, con los tres microorganismos evaluados. Sin embargo, *R. cellulosilyticum* presenta mayor actividad endoglucanasa sobre carboximetil celulosa (CMC) y clara difusión de la actividad al medio en comparación con los demás microorganismos, en los cuales se observa menor actividad. También se observó dicha actividad en el sobrenadante. Por otro lado la actividad exoglucanasa fue mayor por parte de *R. trifolii* si bien *R. cellulosilyticum* presentó actividad tanto *in vivo* como *in vitro*.

El protocolo de screening se realizó combinando métodos *in vitro* e *in vivo* de actividad endoglucanasa y exoglucanasa; crecimiento sobre cobertura de agar blando con CMC y celulosa cristalina (RC) como fuentes de carbono celulósicas amorfa y cristalina respectivamente (*in vivo*), ensayos *in vitro* de actividad exoglucanasa y

endoglucanasa y ensayos de sinergia de las actividades donde se utilizó papel de filtro como sustrato.

II. INTRODUCCIÓN

Biocombustibles

La búsqueda de fuentes alternativas de combustibles, para disminuir la utilización de combustibles fósiles y también la contaminación es uno de los objetivos biotecnológicos primordiales en la actualidad.

El bioetanol, etanol producido a partir de biomasa, es una fuente alternativa de energía muy importante. En la actualidad, si bien no se utiliza como combustible puro, se utiliza en mezclas de 10% a 15% con gasolina estándar, disminuyendo la contaminación al reducir el CO₂ que se libera en la atmósfera por los combustibles fósiles.

La obtención de bioetanol se puede dar utilizando diversas fuentes de biomasa y varios tipos de sustratos. Entre los sustratos se encuentran el almidón y la sacarosa. Las fuentes de almidón más comunes son la papa, el sorgo y el maíz y las fuentes de sacarosa más comunes son la caña de azúcar, la remolacha y las melazas (Martin, 2000)

El proceso de sacarificación es la obtención de azúcares simples a partir de carbohidratos complejos. En la naturaleza este proceso lo realizan los microorganismos, utilizando enzimas para obtener glucosa y luego ésta puede ser fermentada (generalmente por otro microorganismo) obteniendo como producto final etanol (Lynd *et al.*, 2002).

Generalidades del Polímero de Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante del planeta. Se encuentra en la naturaleza mayormente en la pared celular de las plantas. Es sintetizada por algunas bacterias y animales.

En la naturaleza son pocos los casos en que la celulosa se encuentra en estado puro (en algodón, prácticamente pura) (Lynd *et al.*, 2002). Al contrario, generalmente la fibra está embebida en una matriz con otros biopolímeros estructurales, hemicelulosa y lignina. Las interacciones con esta matriz varían dependiendo de las plantas y la madurez de las mismas. Esta es una característica muy importante que limita la utilización de toda la biomasa no pretratada.

Utilización de la Celulosa

Una vez que la celulosa esté despojada de todos los biopolímeros protectores puede ser completamente hidrolizada y utilizada por ciertos microorganismos en las condiciones de crecimiento adecuadas para dar lugar a los azúcares básicos que luego podrán ser fermentados (Wilson, 2011).

La hidrólisis de celulosa necesita de la formación de complejos enzima-sustrato (complejo binario) o celulosa-enzima-microorganismo (complejo terciario) (Fig. 1) (Lynd *et al.*, 2002).

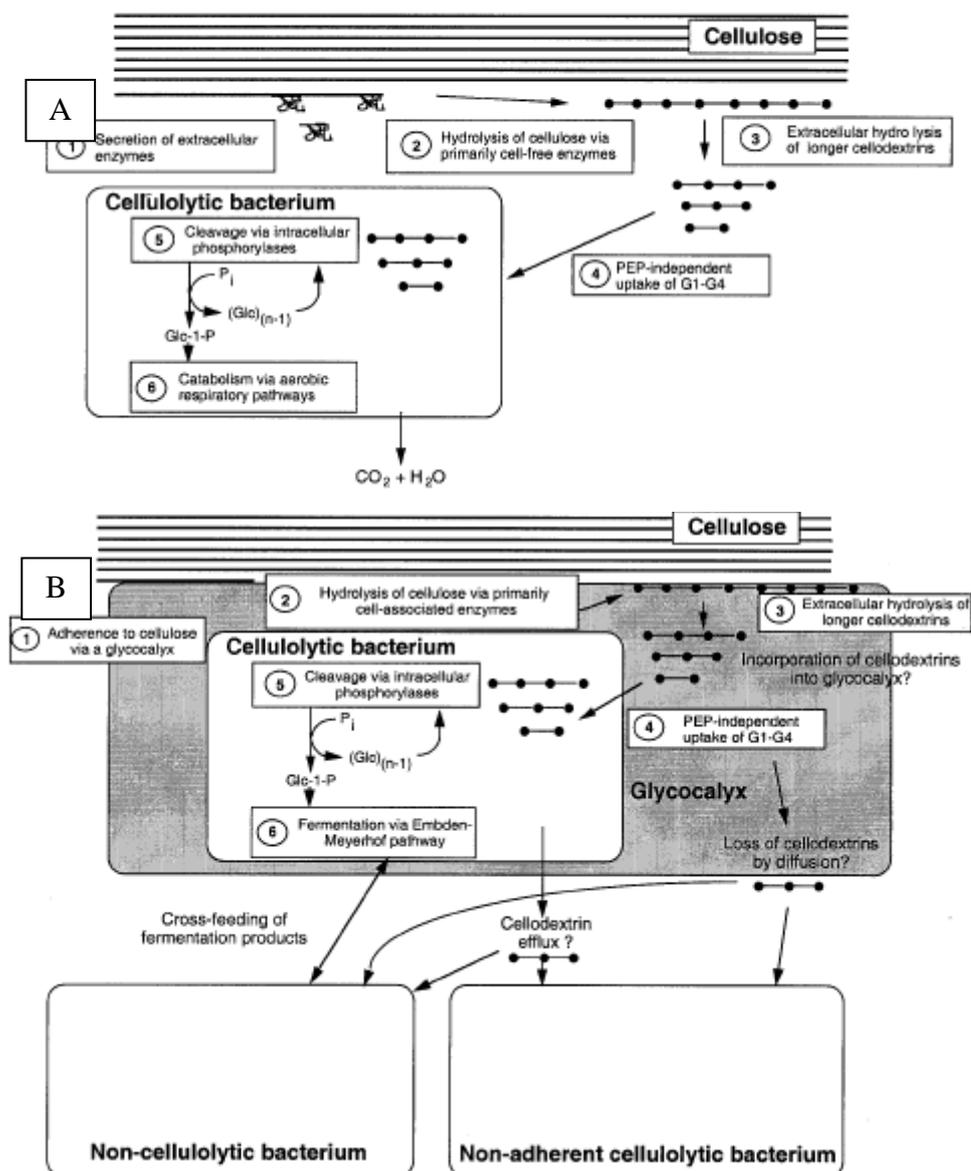


Figura 1. Las estrategias generales de la hidrólisis de la celulosa y la utilización por microorganismos aerobios como *Trichoderma reesei* (A) y anaerobios como *Clostridium* sp. (B). La celulosa, los productos de degradación y las características celulares no se muestran a escala. Algunas características del tipo de estrategia alternativa son utilizadas por una o más especies. Tomado de Lynd *et al.*; 2002.

Cristalinidad

Otra característica importante de la celulosa es la cristalinidad, que es debida a las propiedades fisicoquímicas de las moléculas que la componen, permitiendo el autoensamblaje, gracias a interacciones por puentes de Hidrógeno. La molécula de celulosa es sintetizada como un polímero lineal formado por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β (1-4) glucosídicos. Estas cadenas luego se autoensamblan. La agregación de 30 cadenas aproximadamente es conocida como fibra elemental, la cual es empaquetada en unidades mayores llamadas microfibrillas, para luego ser ensambladas en la fibra de celulosa. La cristalinidad natural de la celulosa implica un orden en el cual todos los átomos están arreglados en posiciones discretas uno respecto al otro. Este empaquetamiento de las microfibrillas de celulosa impide la penetración no solamente de las enzimas sino de moléculas pequeñas (Lynd *et al.*, 2002). En la naturaleza existen diferentes grados de cristalinidad, lo más común es que en una misma fibra de celulosa existan regiones amorfas y cristalinas, así como otras estructuras: microporos, dobleces y giros de las microfibrillas. En consecuencia la heterogeneidad de la celulosa facilita la interacción con el agua en ciertas zonas y la degradación enzimática de la celulosa.

Existen distintos tipos de celulosa purificada que son utilizados en estudios de hidrólisis *in vitro* y por microorganismos *in vivo* y varían mucho en sus características, es por esto que la elección de un sustrato sin duda afecta mucho los resultados de la hidrólisis (Yoshida *et al.*, 2008). La celulosa microcristalina comercial difiere particularmente en la distribución del tamaño de partícula, lo cual tiene grandes implicaciones en la hidrólisis y utilización (Lapanen *et al.*, 2009). La complejidad de la variabilidad estructural de la celulosa en estado puro y la dificultad de trabajar con sustratos insolubles ha llevado al uso de celulosa modificada, altamente soluble, carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato para el estudio de producción de endoglucanasas. La utilización de biomasa celulósica es más compleja aún, no sólo por la hemicelulosa y lignina de la planta sino también por la diversidad en la arquitectura de las células de la planta. En diferentes tejidos, la planta tiene más o menos grosor de la pared celular y por lo tanto más o menos lignina. Algunos tipos de células, como las del tejido mesófilo tienen paredes delgadas y poco lignificadas que son más fácilmente degradables por enzimas que hidrolizan polisacáridos. Por otro lado las células del esclerénquima tienen paredes espesas y láminas muy lignificadas que separan las células entre sí (Wong *et al.*, 1988).

Enzimas Celulolíticas

Los microorganismos producen múltiples enzimas (o sistemas enzimáticos) que degradan la pared celular de las plantas, destacando que no solamente actúan sobre celulosa sino que producen enzimas capaces de degradar hemicelulosa, lignina y pectinas. Las enzimas hemicelulasas son comúnmente coproducidas con las celulasas en los microorganismos celulolíticos (Lynd *et al.*, 2002). Para la degradación de la celulosa se deben de producir celulasas extracelulares asociadas a la superficie o excretadas al medio. Los componentes de los sistemas de celulasas se han clasificado en base a sus propiedades catalíticas y estructurales. Mayormente se han encontrado tres actividades enzimáticas: i) endoglucanasa (endo-1,4- β -glucanasa; Eg; EC 3.2.1.4); ii) Exoglucanasa o celobiohidrolasa (exo-1,4- β -glucanasa; Cbh; EC 3.2.1.91) y iii) β glucosidasa (β -1,4-glucosidasa; EC 3.2.1.21) (Coutinho & Henrissat, 1999). Las endoglucanasas cortan de manera aleatoria en sitios internos amorfos de la cadena del polisacárido celulosa, generando oligosacáridos de varios índices de polimerización y consecuentemente nuevos extremos de cadenas. Las exoglucanasas actúan de manera progresiva sobre el extremo reductor o no reductor del polisacárido de celulosa, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) como productos más abundantes. Estas enzimas también pueden actuar sobre celulosa microcristalina, presuntamente liberando cadenas de celulosa de la estructura cristalina. Las enzimas β glucosidasa hidrolizan los dímeros solubles de celobiosa a glucosa. Las celulasas se diferencian de otras glucosil hidrolasas por la habilidad de hidrolizar los enlaces β -1,4-glucosídicos entre los residuos glucosídicos. La acción enzimática consiste en romper el enlace vía un mecanismo de hidrólisis ácida, usando un aminoácido dador de protones y un aceptor, nucleófilo o base (Cantarel, 2008).

Para que estas actividades puedan ser utilizables no alcanza con contar con una presunta actividad celulolítica que se puede deducir de una secuencia o que se dispone comercialmente, sino que es necesario caracterizarlas para establecer si tienen las propiedades adecuadas al objetivo planteado. Las propiedades de interés que no se pueden deducir de la secuencia incluyen: afinidad por el sustrato (K_m), especificidad por el sustrato (amorfo y cristalino), temperatura y pH óptimo, velocidad máxima y grado inhibición por productos y etanol.

Por otro lado, la hidrólisis completa de la celulosa conlleva la actividad sinérgica conjunta de las tres actividades enzimáticas anteriormente descriptas (Fig. 2).

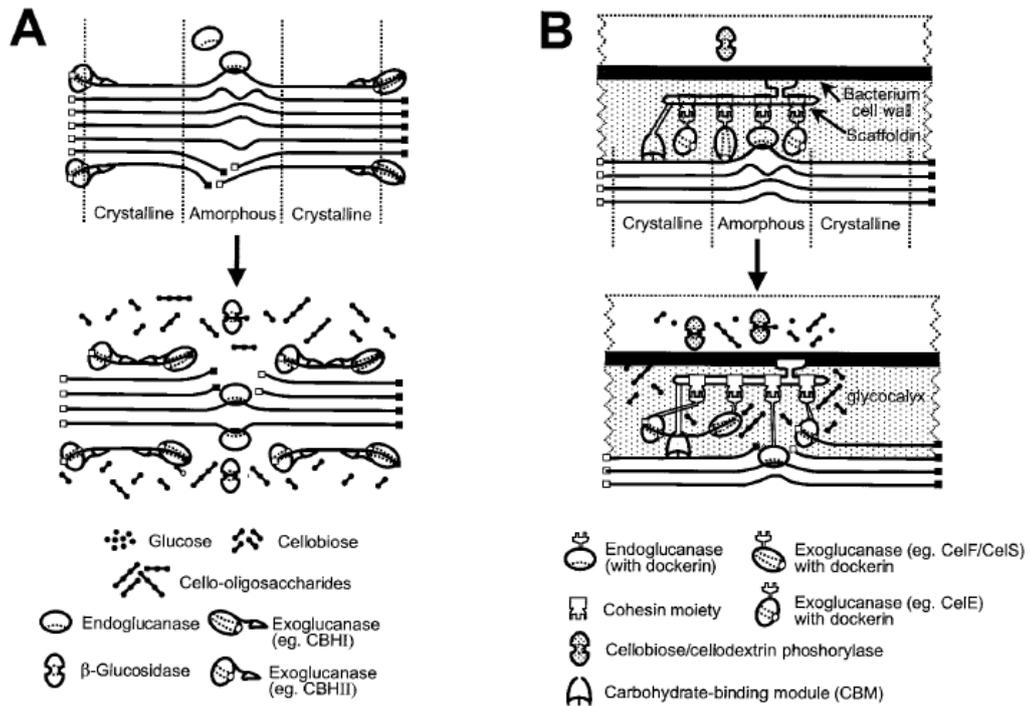


Figura 2. Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa microcristalina y amorfa por sistemas de celulasa de forma libre (a) y formando complejos (b). Los cuadrados sólidos representan los extremos reductores, y los cuadrados en blanco representan los extremos no reductores. Regiones amorfas y cristalinas se indican. Celulosa, enzimas y productos hidrolíticos no se muestran a escala. Tomado de Lynd *et al*; 2002)

Inducción

El estudio de la regulación de los promotores de los genes que codifican para estas enzimas se ha realizado en algunos hongos, e incluye celobiohidrolasas, endoglucanasas, β -glucosidasas, endoxylanasas y β -xylosidasas. Su expresión es regulada por tres mecanismos principales: *i*) la regulación por activadores específicos, *ii*) por activadores universales que controlan la expresión de más de un gen, y *iii*) mediante la regulación integradora (Suto & Tomita, 2001). Se ha determinado que la expresión de celulasas y hemicelulasas está controlada principalmente por fuentes de carbono. En presencia de D-glucosa la transcripción se encuentra reprimida, mientras que en ausencia de ésta y en la presencia de celulosa la transcripción es fuertemente inducida. Aún más, las enzimas celulolíticas pueden co-inducirse por diversos mono y disacáridos, como sofrosa, xilobiosa, lactosa, D-xilosa y L-sorbosa (Suto & Tomita, 2001). En el caso de *Trichoderma reesei* la producción de enzimas para utilizar sustratos complejos, como la celulosa, es inducida en presencia del sustrato (o sus

subproductos) y fácilmente suprimida por los azúcares como glucosa cuando está disponible. Debido a que la celulosa es insoluble y no puede entrar a la célula, se ha buscado el inductor natural de las enzimas utilizando mutantes con deleciones para examinar el rol individual de las celulasas para producir el inductor. Se demostró que la deleción de los genes *cbh2* o *egl2* previenen la expresión de otras celulasas, sugiriendo que CBHII y EGII pueden tener un papel muy importante sobre la formación del inductor (Lynd *et al.*, 2002). Lo mismo ocurrió cuando se suprimieron los genes de β -glucosidasa, lo que resultó en la disminución de la actividad endoglucanasa, sugiriendo que también puede ser responsable de la síntesis del inductor. En 1962, la soforosa (β -1,2-glucobiose) fue identificada como un fuerte inductor de celulasas. Mediante bancos sustraídos de cDNA se ha determinado que algunos genes son expresados únicamente en presencia de celulosa, pero no con soforosa o lactosa (Schmoll *et al.*, 2004). Al analizar el transcriptoma de enzimas involucradas en la degradación de biomasa, se describió un número importante de genes que codifican para enzimas degradadoras, pero también un conjunto de proteínas relacionadas con el transporte, secreción y modificación de estas enzimas, demostrando así mismo que la soforosa es mejor inductor que la lactosa (Foreman *et al.*, 2003)

Es importante recalcar que no sólo la producción de celulasas sino también la de hemicelulasas es inducida, posiblemente reflejando la interacción con el polímero en la Naturaleza.

La producción de celulasas en *T. reesei* es regulada a nivel de la transcripción. La expresión de los genes de celulasas está coordinada a través de factores de transcripción. Los genes de los factores de transcripción (ACEI y ACEII) fueron identificados por la capacidad de unirse a los promotores correspondientes. ACEII es homólogo a XLnR, un factor de transcripción en *Aspergillus niger*, y ACEII también estimula la expresión de los genes de celulasas y xilanasa.

Estos niveles basales de producción de celulasas resultarán en la hidrólisis, aunque limitada, de celulosa permitiendo la generación del inductor y constituyendo un bucle de activación. Este tipo de mecanismos constituye una forma de vínculo entre la represión de catabolitos y el estado energético de la célula.

La expresión de los genes de celulasa en *Trichoderma fusca* está también regulada en dos niveles: inducción por celobiosa y por el represor de catabolitos en presencia de glucosa. CelR reprime la producción de celulasas en ausencia de celulosa o

celobiosa. Sin embargo, celobiosa actúa como inductor e inactiva CelR, facilitando la disociación del promotor permitiendo la transcripción de los genes de celulasas.

Varias cepas de *Cellulomonas* han sido reportadas como grandes productoras de celulasas en sustratos celulósicos y bajas cantidades en xilano, galactomanosa y azúcares. Este dato sugiere que hay producción constitutiva de celulasas en niveles basales en ausencia de glucosa y que la producción de celulasas está sujeta a la represión de catabolito. Sustratos de celulosa, como también celobiosa y xilosa, en niveles moderados de 0,05 a 0,2 g/litros, sirven como inductores de la producción de celulasas.

La formación del complejo de celulasas en *Clostridium thermocellum* ocurre bajo condiciones limitadas de carbono. Sin embargo su composición puede estar influenciada por la fuente de Carbono utilizada: por ejemplo, la exoglucanasa mayor CelS es más predominante cuando la célula crece en celulosa que cuando lo hace sobre celobiosa. El complejo de celulasas de *Clostridium cellulovorans* es producido en presencia de celulosa pero no de carbohidratos solubles como glucosa, fructosa, celobiosa o incluso CMC. Sin embargo crece en celobiosa y en CMC y exhibe gran actividad celulolítica y transcripción de los genes de celulasas. Lo cual sugiere que las celulasas pueden ser producidas en ciertos carbohidratos solubles, pero el ensamblaje del (poly) celulosoma y su desprendimiento de la pared celular necesitan algún tipo de activación por la presencia de celulosa insoluble microcristalina.

Por otra parte se ha encontrado expresión constitutiva de celulasas en *Ruminococcus flavefaciens* (bacteria del rumen) (Lynd *et al.*, 2002).

Problemas de la hidrólisis enzimática de la celulosa

Los problemas principales involucrados en la hidrólisis enzimática están en tres áreas principales (Dewey and Mandels, 1980).

- i) Sustratos sólidos y multiplicidad de sustratos. Contenido de lignina y hemicelulosa, tamaño y superficie de área del material de sustrato celulósico, cristalinidad y grado de polimerización, grado de absorción de la enzima en celulosa y lignina y la asociación constante entre el sustrato de celulosa y todas las variedades de enzima con la fuente de sustrato y el tiempo que dura la reacción de hidrólisis.

ii) Sistemas multienzimáticos. Hay varios componentes de celulasas, incluyendo celulasas endo, exo y β -glucosidasas y tienen buen mecanismo de reacción coordinado y concertado por el cual el sustrato polimérico de celulosa es degradado hasta monómeros de glucosa. En la secuencia de la hidrólisis de la reacción, el producto de cada reacción inhibe (en cierto grado) la enzima. El efecto del producto de inhibición en la enzima β -glucosidasa es más severo, debido a la acumulación de producto final en la secuencia de reacción. La actividad relativa y la tasa de cada componente debería de ser optimizada con respecto a la tasa total de la reacción de tal manera de no causar ningún paso limitante durante la secuencia de hidrólisis.

iii) Inactivación de la enzima. La pérdida de actividad enzimática y desactivación de la enzima son causadas por factores tales como calor, pH, iones minerales, proteasas y adsorbentes de celulasas, incluyendo celulosa y lignocelulosa. El grado de desactivación de celulasas por estos factores varía con los diferentes componentes de las celulasas durante la hidrólisis.

III. ANTECEDENTES DE MICROORGANISMOS

Un evento central en el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y en la formación del nódulo es la erosión localizada de la pared celular de componente celulósico a través del cual el simbiote bacteriano pasa al estado endosimbiótico intracelular dentro de su anfitrión leguminosa, para iniciar la fijación de Nitrógeno. Las enzimas que degradan la pared celular de los vegetales participan en dos pasos de este proceso de infección. Durante la infección primaria de los pelos radiculares, en la formación del hilo de infección (Inf) y más tarde la liberación bacteriana (Bar) a partir de los hilos de infección a las células de nódulos del hospedador. Este proceso de degradación de la pared de la célula vegetal debe ser delicadamente equilibrado para permitir la penetración localizada del simbiote bacteriano en el huésped celular sin provocar lisis ni destrucción. Varios estudios indican que los *Rhizobium* sp. simbióticos producen enzimas capaces de degradar los polímeros de la pared celular vegetal, pero es poco lo que se conoce de sus propiedades moleculares. Las actividades relativamente bajas de estas enzimas de rizobios han obstaculizado los avances de investigación en esta área. El uso de ensayos mejorados con mayor sensibilidad y fiabilidad han

detectado estas actividades enzimáticas. Se estableció que las celulasas son producidas por cepas de tipo silvestre de *Rhizobium leguminosarum* (*biovares trifolii*, *phaseoli*, y *viciae*), *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti*. Otros estudios utilizando *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 indicaron que este modelo de cepa salvaje de rizobio del trébol nodulante produce por lo menos dos isoenzimas celulasas, C1 y C2. Varias líneas evidencian y apoyan la interpretación de que ambas enzimas están unidas a la superficie celular: (i) su actividad se detectó en los extractos después de ser tratadas las células con lisozima-EDTA (sonicación breve de lavado y células sedimentadas), pero no se detecta en el medio extracelular, (ii) microscopía electrónica de transmisión y de escaneo revelan hoyos erosionados cóncavos que replican la conservación *in situ* del contorno de las células bacterianas individuales adheridas a la epidermis de la pared celular de la raíz de trébol blanco (Robledo *et al.*, 2008).

Rhizobium cellulosilyticum fue descrita por primera vez en el año 2007, por investigadores de la Universidad de Salamanca, España. Se aisló a partir de aserrín de *Populus alba* en España. A diferencia de las cepas *Rhizobium galegae* y *Rhizobium huautlense* con las cuales se les asigna parentesco filogenético por similitud del ARN 16S, esta cepa posee actividad celulolítica sobre CM-celulosa (García-Fraile, Paula *et al.*, 2007).

También se ha usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas, protegiendo durante dos meses al fruto *in situ*. Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *Trichoderma* spp. son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el micoparasitismo el principal mecanismo de acción de este hongo. Este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular, causa retracción de la membrana plasmática y desorganización del citoplasma (Guédez *et al.*, 2009). Se ha reportado que posee la enzima CBHI, y que esta actúa sobre avicel, su temperatura óptima es de 50°C y pH 5.0 (Colussi *et al.*, 2011).

IV. HIPÓTESIS

Rhizobium cellulosilyticum es una bacteria celulolítica aislada de aserrín (provistas por Prof. Pedro Mateos, Universidad de Salamanca, España) (Robledo *et al.*, 2008). Por esta razón se consideró la posibilidad de que esta cepa pudiera utilizar celulosa. Se propuso investigar la presencia de actividades endoglucanasa y exoglucanasa sobre sustratos amorfos y cristalinos en esta bacteria aislada de aserrín.

Objetivo general

Determinar qué actividades enzimáticas celulolíticas posee *R. cellulosilyticum* y en que fracción celular se encuentran.

Objetivos específicos

- Detección y diferenciación de actividades celulolíticas: endoglucanasa y exoglucanasa.
- Ensayos de actividad *in vivo* (asociadas al microorganismo vivo) e *in vitro* (posterior a su aislamiento).
- Ensayos de actividad con sustratos amorfos y cristalinos.
- Poner a punto la detección y el análisis de propiedades de enzimas celulolíticas microbianas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han ensayado numerosos microorganismos como fuente de enzimas celulolíticas

En este trabajo se estudió enzimas celulolíticas Endoglucanasas y Celobiohidrolasas de microorganismos que interaccionan con plantas con efectos simbióticos (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 843, cepa modelo, a la que se referirá en adelante como *R.trifolii*), de biocontrol (*T. harzianum*, cepa nativa) o aislados de restos vegetales (*R. cellulosilyticum*).

Se utilizó inicialmente los siguientes microorganismos como fuentes de enzimas: *Trichoderma harzianum*, cepa nativa, proporcionada por Prof. Lina Bettucci, Facultad de Ingeniería, UdelaR. *Trichoderma harzianum* se cultiva industrialmente como agente de biocontrol contra hongos patogénicos de plantas (Graham *et al.*, 1997 y Nishimura *et al.*, 1987).

Rhizobium cellulosityticum, bacteria celulolítica aislada de aserrín provista por Prof. Pedro Mateos, Universidad de Salamanca, España.

R. trifolii, bacteria simbiótica de trébol, provista por Prof. Pedro Mateos (Robledo *et al.*, 2008).

Medios de Cultivo

A continuación se detallan los medios de crecimientos utilizados para las cepas de *R. trifolii*, *R. cellulosityticum* y *T. harzianum*.

Tabla 1. Medios de Cultivo.

Componente	Medio <i>Rhizobium</i> sp. (MRh)	Medio <i>T. harzianum</i> (MTh)
K ₂ HPO ₄	0,05%	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01%	-
NaCl	0,02%	-
CMC/RC	0,1%	0,1%
Extracto de levadura	0,05%	0,1%
Agar	2%	2%

No se utilizó inhibidor de bacterias u hongos ya que se partió de cultivos puros. Los medios tienen pH cercano al neutro y en los casos que se modificó se describe en el método correspondiente al igual que las variaciones en fuente de carbono.

Actividad exoglucanasa

Se realizaron varios ensayos para lograr los mejores resultados y simplificar la metodología. El reactivo utilizado como sustrato en este ensayo es Mu-c (methylumbelliferyl-cellobioside), el cual es hidrolizado por la enzima Exoglucanasa o cellobiohidrolasa (exo-1,4- β -glucanasa; Cbh; EC 3.2.1.91) liberando celobiosa. El otro producto de la hidrólisis del reactivo, la metilumbeliferona, es fluorescente al ser iluminado por luz UV (las longitudes de onda de excitación son $\lambda_{\text{máx}}=365\text{nm}$ y

de emisión, $\lambda_{\text{máx}}=445\text{nm}$) y es así como se visualiza la presencia de la enzima utilizando un transiluminador que tiene una fuente de luz UV (Wong *et al.*, 1988).

Rhizobium sp.

Actividad exoglucanasa *in vivo*.

Se incluyó el reactivo en concentración 1 mM en medio (MRh) para crecer *Rhizobium* sp. Los ensayos se realizaron en tubos de ensayo de 10 ml y se creció sobre slants de medio sólido para mejor visualización de la actividad. Las fuentes de carbono fueron celulosa amorfa (CMC) y celulosa cristalina (RC) y también se usó el medio solo con extracto de levadura, sin otra fuente de carbono. La mezcla completa en este ensayo *in vivo* consistió en medio con Muc (Sustrato) y con crecimiento (Enzima). Se utilizó como control medio sin Muc y con crecimiento (- Sustrato) y medio con Mu-C, sin crecimiento como control (- Enzima). Se crecieron los microorganismos a 30°C por dos días y se utilizó un transiluminador con luz UV (312 nm) para visualizar la fluorescencia que indica la presencia de la enzima.

Actividad exoglucanasa *in vitro*

En sobrenadante. Se hizo crecer *R. cellulosilyticum* en MRh (sin el agar) con CMC 0,2%. Se inoculó 10 ml (x 2) y creció 4 días a 30°C en shaker a 180 rpm. Se transfirió el cultivo a 200 ml del mismo medio (x 2) y se creció 4 días. Se centrifugó a 10.000 rpm, a 6 °C por 30 min. El pellet se guardó congelado a -80 °C. El sobrenadante se filtró con filtros Millipore 0,45 μm . Se dializó 2 días a 4 °C, contra buffer Fosfato pH 7, 10 mM, (con un cambio de buffer), en bolsas de diálisis para retener $\text{PM}>10,000\text{ DA}$. Se guardó el sobrenadante filtrado y dializado a 4 °C y a -80°C. El sobrenadante también fue liofilizado en fracciones de 15ml (x10). Se congeló la muestra a -80°C y se liofilizó durante 24 hs. Se guardó a 4°C. Por último se realizó 1 ml de mezcla de reacción en solución buffer fosfato-citrato 25mM, pH 5,2 (Buffer P-C) con 0,2 ml de sobrenadante (Enzima) y 100 μl de Muc (sustrato). Se utilizaron controles (- Enzima) y (-Sustrato).

En extracto hidrosoluble. Se realizó extracto de *R. cellulosilyticum* con ultrasonido. Se centrifugaron las células congeladas a 13.000 x g en tubos Eppendorf, 10 min. Se suspendieron en 0,5 ml de buffer P-C. Se mantuvo en baño de hielo/sal. Se hizo 5 tratamientos de 1 min con el equipo a 100 % potencia, medio ciclo, con

intervalos de 2 min para enfriar. Se centrifugó a 13,000 x g por 10 min. Se guardó el extracto a -80 °C. Una vez obtenido el extracto se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Luego se procedió a trabajar con el extracto. Se realizó la mezcla de incubación completa con 0.9 ml de buffer P-C, con 40 µl de extracto y 0.1 ml de reactivo Muc 10 mM. Como blanco se utilizó la mezcla de incubación sin el reactivo (-Sustrato) y sin el extracto (-Enzima).

Trichoderma harzianum

In vivo. Se hizo crecer el microorganismo en medio sólido (Harman, G. *et al.*, 1999), 4 días a 25 °C. Se utilizó medio de crecimiento solo con extracto de levadura (sin sustrato), con CMC (sustrato amorfo) y RC (sustrato cristalino). Los crecimientos se realizaron en pico de flauta y se incorporó al agar el reactivo Mu-C, se reveló con el transiluminador. En este experimento el tiempo de reacción es igual al tiempo de incubación.

In vitro. Se inoculó el microorganismo en el mismo medio líquido bajo las mismas condiciones en agitador, utilizando como fuente de carbono CMC 0,2 % y luego se procedió a trabajar con el sobrenadante. El sobrenadante fue obtenido filtrando los cultivos a través de papel Whatman N°1 y filtros de 0,45-0,2 µm. La mezcla de incubación completa está compuesta por el reactivo Mu-C (Sustrato) y el filtrado (Enzima) en buffer P-C en tubo de ensayo. Se incluyeron controles (-sustrato) y (-enzima). Se reveló luego de incubar a 30°C 12 horas.

Actividad Endoglucanasa

Esta actividad fue revelada utilizando el colorante Rojo Congo (Teather & Wood, 1982). Dicho colorante forma un complejo con las cadenas de celulosa. La actividad endoglucanasa degrada las cadenas de celulosa. El colorante Rojo Congo no puede formar complejo con las cadenas de celulosa degradadas. Se cultivan los microorganismos en medio conteniendo una fuente de Carbono celulósica. Al finalizar el crecimiento se agrega el colorante Rojo Congo (solución 1%) sobre la superficie del medio, el tiempo de reacción es de 15 minutos, luego se procede a remover el colorante de la placa y observar el resultado. La reacción es positiva cuando se observa un halo de degradación (color rosado muy claro a blanco) sobre la superficie donde hubo actividad endoglucanasa. La degradación que resulta de la actividad, se refleja en dicho

halo (disminución de color respecto a donde no hubo reacción). Para observar si hay reacción por debajo del crecimiento, se remueve la colonia con agua y luego se agrega el colorante Congo Rojo.

Rhizobium sp.

In vivo.

Se realizaron crecimientos de *R. trifolii* y *R. cellulosilyticum* en medio solido (MRh) en placas de Petri con variaciones en la metodología.

Crecimiento simple. Se utilizó como fuente de carbono CMC y RC. Luego del crecimiento se procedió a bañar las muestras con solución de Rojo Congo 0,1% por 15 minutos, se lavó con NaCl 1M y se procedió a observar la presencia de halo de degradación. Como control negativo se utilizó *E.coli*. El crecimiento fue de dos días a 30 °C.

Reacción en capa fina de agar blando

Con CMC. Se creció en placa de la manera antes descrita para ambos microorganismos en medios con RC, CMC y sin fuente de carbono, el tiempo de crecimiento fue de 72 h. Luego del crecimiento se aplicó sobre la placa la capa fina de agar 0.8% (agar blando) conteniendo CMC. Luego se volvió a incubar 12 horas la placa y por último se reveló con Rojo Congo.

Con RC. Se creció en placa de la manera antes descrita para ambos microorganismos en medios con RC y CMC, 72 h. Luego del crecimiento se procedió a la aplicación de la capa fina de RC. Se volvió a incubar y fue revelado con estándar Rojo Congo.

Crecimiento sobre capa. En este caso la parte inferior de la placa contiene agar de base (1,5%, parte inferior de la placa) y todos los componentes del medio menos la fuente de carbono celulósica (solo contiene extracto de levadura). Una vez gelificado el medio, se agregó una capa de agar blando conteniendo sustratos celulósicos CMC o RC. Finalmente, se sembró la placa con el microorganismo y se dejó crecer durante 3 días a 30 °C. Las colonias fueron removidas con agua y por último se procedió a revelar con estándar Rojo Congo.

In vitro.

Se dejó crecer *R. cellulosityticum* en medio líquido como se describió anteriormente para la actividad exoglucanasa. Se utilizaron el extracto y los sobrenadantes dializado y filtrado.

Sobre capa en buffer. Por encima de la placa que contenía agar – agua 2% se aplicó una capa de agar 0,8% conteniendo RC o CMC 0,1% en buffer P-C. El extracto y sobrenadante se depositaron sobre la capa de agar 0,8%, se aplicaron 10 y 20 µl y se incubaron por 4 días a 37°C. Luego se reveló estándar con Rojo Congo.

Actividad *in vitro*. Disminución de viscosidad de CMC.

A fin de obtener más información acerca de la actividad endoglucanasa se propuso el siguiente ensayo a modo de comparar resultados y métodos.

La actividad endoglucanasa sobre sustratos amorfos (CMC) puede evidenciarse por el cambio de fluidez utilizando el sobrenadante del medio de crecimiento y una solución de CMC 1%. Esta enzima provoca una disminución grande del índice de polimerización del CMC (Gilkes *et al.*, 1995).

Como control positivo se utilizó la mezcla de enzimas de *Trichoderma reesei* obtenidas comercialmente (Sigma). Se utilizó 0,8 ml de sobrenadante de *R.cellulosityticum* y 1 ml de CMC 1%. El blanco (-E) contiene 1 ml de CMC 1% sin el sobrenadante y el control positivo 1 ml de CMC 1% y 40µl de preparación enzimática de *T.reesei* (10 mg/ml). La disminución de fluidez se determina por inspección visual.

Trichoderma harzianum

Sobre capa. Se creció el microorganismo en medio sólido, en tubos inclinados. En el medio de crecimiento se substituyó la fuente de carbono principal por CMC y RC al 0.1%. El crecimiento fue de 4 días a 25°C, luego se procedió a realizar la capa con agar blando (0.8%) con CMC o RC 0.2% en agua. Se revela con Rojo Congo.

Actividad Exoglucanasa y Endoglucanasa

Las reacciones se realizaron en tubos de ensayo de 10 ml, donde se sumergieron recortes de papel de filtro estériles de 5x15 mm en Buffer P-C conteniendo la mezcla enzimática. El control positivo fue la mezcla enzimática de *T. reesei* (obtenida

comercialmente en Sigma), se agregaron 40 µl de una solución de 10mg de enzima/ml y se completó hasta 1 ml con buffer P-C, luego se agregó el papel de filtro. El tiempo de reacción fue de una noche y la temperatura 37 °C para todos los ensayos. Como control negativo se utilizó el papel de filtro sumergido en buffer P-C pero sin la mezcla enzimática, a la misma temperatura y tiempo de reacción. Las fuentes de enzimas ensayadas fueron los sobrenadantes de *R. cellulosilyticum* y *T. harzianum*, de los cuales se añadieron 100 µl (10 mg de sobrenadante liofilizado/ ml) y se llevó a 1 ml con Buffer P-C en ambos casos, luego se agregó el papel de filtro. Se incubó a 37 °C, 12 horas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad exoglucanasa sobre crecimiento de *Rhizobium sp in vivo*

Con este método se observa una presunta actividad exoglucanasa de ambos microorganismos, en medios con extracto de levadura, CMC o RC. Hay mayor fluorescencia por parte de *Rhizobium trifolii* 843. Ambos microorganismos producen mayor emisión de luz en el medio que contiene CMC (Tabla 2, Fig. 3) y la emisión de luz es muy similar cuando crecen con RC o con extracto de levadura como fuente de carbono.

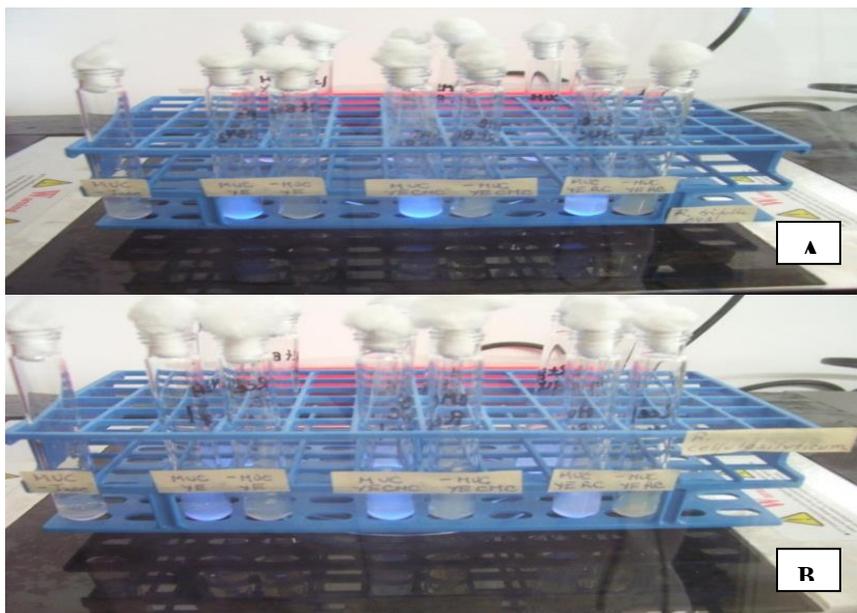


Figura 3. Actividad Exoglucanasa de *Rhizobium sp*. Los ensayos con *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (fig. 3A) y con *R. cellulosilyticum* (fig. 3B). Mezcla completa: Crecimiento (E, fuente de enzima) + Mu-C (S, sustrato) + Buffer (B); Control A: - Enzima; Control B: - Sustrato. Tubos 2 y 3 contiene extracto de levadura en el medio (izquierda a derecha), 4 y 5 contienen CMC en el medio, 6 y 7 contienen RC. El primer tubo es el control A; tubos 2,4 y 6 son la mezcla completa y tubos 3,5 y 7 son control B.

Tabla 2. Actividad exoglucanasa de *Rhizobium* sp en medio sólido

Indicador de la actividad	Visualización de la actividad	Ensayo	Medio de crecimiento sólido, en tubo	Actividad exoglucanasa	
				<i>Rhizobium trifolii</i> 843	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>
			Rh ^b CMC	+++	++
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	in vivo	Rh RC	++	+
			Rh	++	+

a Mu-c: methylumbelliferyl-cellobioside, 1mM. La actividad enzimática hidroliza la unión del indicador fluorescente con el disacárido celobiosa, lo que permite detectar la actividad enzimática exoglucanasa por la fluorescencia del producto de la reacción (Mu) al iluminar con luz UV (Wong *et al.*, 1988).

b Medio para *Rhizobium* spp. (YEM) (Vincent, 1970) en el que se sustituyó manitol por CMC o RC.

Actividades exoglucanasa de *R. cellulosilyticum* in vitro

En la Fig. 4 y Tabla 3 se muestran los resultados del ensayo con el sobrenadante de *R. cellulosilyticum*, donde se observa un background de reacción basal en el tubo control que contiene el buffer y mu-c y nula reacción sin añadir Mu-c. La intensidad de la fluorescencia al agregar el sobrenadante es mayor a la obtenida con el blanco. Los resultados de actividad exoglucanasa sobre extracto fueron negativos (Tabla 3).



Figura 4. Actividad exoglucanasa de sobrenadante de *R.cellulosilyticum*. Mezcla completa: Sobrenadante (E, fuente de enzima) + Mu- C(S, sustrato) + Buffer (B); Control A: - Enzima; Control B: - Sustrato. Primer tubo (izquierda a derecha) contiene mezcla completa, segundo tubo es control B y tercer tubo control A.

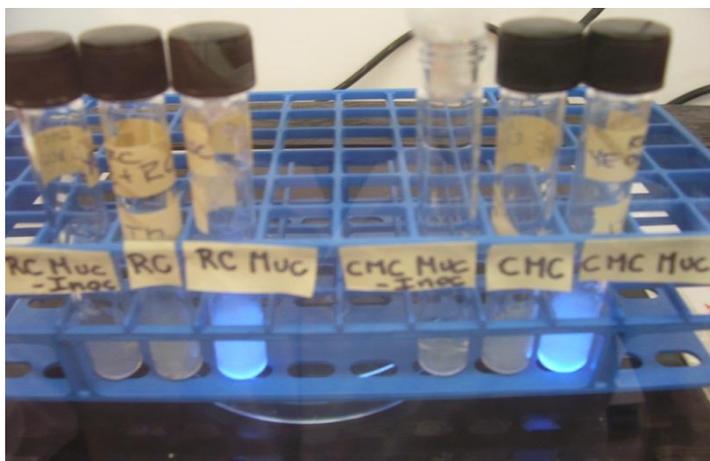
Tabla 3. Resultados de Actividad exoglucanasa en *R. cellulosilyticum* in vitro del sobrenadante y extracto

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Mezcla de Incubación líquida	Actividad <i>Rhizobium cellulosilyticum</i>
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	<i>in vitro</i>	^b Sobrenadante + Mu-c 1mM + ^c Buffer PC	+
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	<i>in vitro</i>	Sobrenadante + Buffer PC (sin Mu-c)	-
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	<i>in vitro</i>	Mu-c + Buffer PC	-/+
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	<i>in vitro</i>	^d Extracto + Mu-c 1mM Buffer PC	-

a- Mu-c es methylumbelliferylcellobioside; b- Sobrenadante de cultivo crecido en medio para *Rhizobium* sp. (YEM) en el que se sustituyó manitol por CMC; c- Buffer PC es 25 mM fosfato-citrato, pH 5,2; d- Extracto de *R. cellulosilyticum*.

Actividad exoglucanasa de *T. harzianum* in vivo

En este ensayo (Fig. 5, Tabla 4) los resultados fueron positivos cuando se usaron ambas fuentes de carbono en los medios de crecimiento. En ausencia del microorganismo no hay reacción del Mu-c en ambos casos. En presencia de CMC en el medio la intensidad de fluorescencia es mayor que con RC en el medio.



sólido.

Figura 5. Se creció *T. harzianum* en medio sólido en presencia de CMC o RC. Mezcla completa: Crecimiento

(E, fuente de enzima) + Mu-C(S, sustrato) + Buffer (B); Control A: - Enzima (-E); Control B: - Sustrato (-S).

Los tres primeros tubos contienen RC en el medio y los tres siguientes contienen CMC. Tubos 1 y 4 (de izquierda a derecha) son control A (-E), tubos 2 y 5 controles B (-S) y tubos 3 y 6 son la mezcla completa.

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Medio de Crecimiento sólido, en tubo	Actividad <i>Trichoderma harzianum</i>
Mu-c ^a	Fluorescencia	<i>in vivo</i>	YE ^b CMC	+++
	Mu (UV)		YE RC	++

a- Mu-c: methylumbelliferyl-cellobioside; b- Medio para *Trichoderma harzianum* (Harman, 1999) en el que se substituyó sacarosa por CMC o RC.

Actividad exoglucanasa de *T. harzianum* *in vitro*

Se observó actividad exoglucanasa positiva para el sobrenadante de *T. harzianum* (Fig. 6, Tabla 5), el control muestra actividad basal, debida probablemente a descomposición parcial del sustrato.

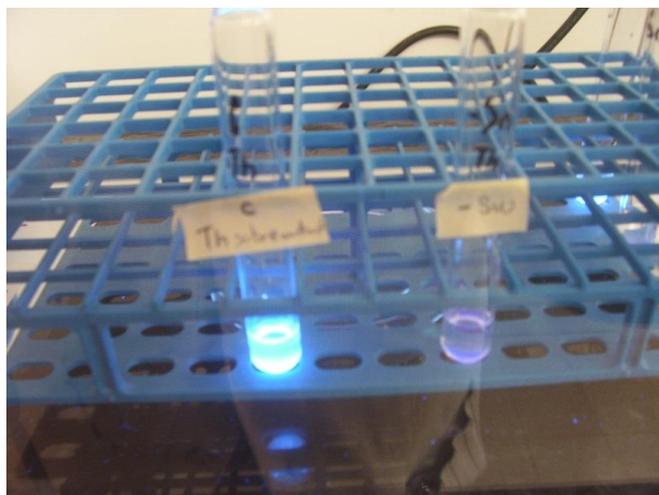


Figura 6. Mezcla completa: Sobrenadante (E, fuente de enzima) + Mu-C(S, sustrato) + Buffer (B); Control: - Sustrato. El tubo a la izquierda contiene la mezcla completa y a la derecha el control.

Tabla 5. Resultados de actividad exoglucanasa de *T. harzianum* *in vitro*

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Mezcla de Incubación líquida	Actividad <i>Trichoderma harzianum</i>
Mu-c ^a	Fluorescencia Mu (UV)	<i>in vitro</i>	Sobrenadante ^b	+
			+ Mu-C 1mM + Buffer PC ^c	

a- Mu-c es methylumbelliferyl-cellobioside; b- Sobrenadante de cultivo crecido en medio para *Trichoderma harzianum* en el que se substituyó sacarosa por CMC, c- Buffer PC es 25 mM fosfato-citrato, pH 5,2.

Los ensayos de actividad exoglucanasa permitieron confirmar la presencia de esta actividad en *Trichoderma harzianum* y en *Rhizobium cellulosilyticum*

En *R. cellulosilyticum* la actividad se visualizó tanto *in vivo* en el sobrenadante como *in vitro* pero no con el extracto celular. En trabajos posteriores llevados a cabo en el Polo Tecnológico de Química que continúan el presente trabajo (trabajo a publicar) se cuantificaron las proteínas en el sobrenadante y en el extracto celular. El resultado obtenido para el extracto fue 474 ug/ml y para el sobrenadante fue de 6,4 ug/ml. Estos resultados evidencian que el extracto contiene suficiente concentración de proteínas. Por lo tanto, si la enzima estuviera presente de forma funcional se debería detectar. El sobrenadante posee actividad exoglucanasa y sin embargo la cantidad de proteína en éste es mínima comparada con el extracto. El hecho de que el sobrenadante contenga la enzima era muy probable debido a que los microorganismos aerobios en general sintetizan las enzimas celulolíticas y las liberan al medio donde cumplen su función. La reacción fue positiva utilizando los medios de crecimiento con extracto de levadura y con CMC y RC como fuentes de carbono celulósicas, indicando un nivel basal y una inducción leve por las fuentes de carbono.

Este resultado se observa en los tres microorganismos, *R. cellulosilyticum*, *R. trifolii* y en *T. harzianum*. En principio se obtuvo los resultados esperados, que en el extracto de levadura hubiera menor síntesis de la enzima que en los medios con sustratos celulósicos CMC y RC. La celulosa insoluble (inductor natural) funciona mejor como inductor de la expresión de las enzimas que CMC (inductor soluble) si el microorganismo posee las enzimas necesarias para degradar el sustrato insoluble. En nuestros ensayos se observó en los tres microorganismos el mismo comportamiento de actividad exoglucanasa frente a los sustratos celulósicos; hay inducción de actividad con CMC. En los medios con RC y sin sustrato cristalino (solo extracto de levadura) se obtiene similar actividad basal. En general las celulasas son enzimas adaptativas y no son inducibles por monosacáridos simples. Hay disacáridos (por ej. soforosa y lactosa) que inducen la síntesis enzimática. La actividad celulolítica no es parte del metabolismo primario de los microorganismos (etapa de crecimiento) sino que estaría asociada a la resistencia (Lynd *et al.*, 2002). El extracto de levadura posee nutrientes que permiten establecer el metabolismo primario. Este tipo de inducción podría ser debida a que el microorganismo es sometido a condiciones adversas (inducción por falta de fuente primaria de carbono) y por lo tanto se expresan las enzimas correspondientes al metabolismo secundario pero al no tener inducción ya sea por productos de degradación

de sustrato (en el caso que pudieran actuar sobre el sustrato) solo se da una pequeña producción de enzimas (basa). Esto podría ser una explicación del porque el medio con RC tiene el mismo efecto que el medio que contiene solo extracto de levadura, si no posee las enzimas para actuar sobre RC entonces tampoco hay inducción por los productos de la degradación y el comportamiento es igual a que solo tuviera el extracto de levadura, solo se ve la inducción basal posiblemente debida a la falta de fuente de carbono primaria. En el medio con CMC la emisión de luz es mayor, lo cual podría indicar inducción debido a los productos de degradación del CMC.

En el ensayo *in vivo* *R. cellulolyticum* y *R. trifolii* presentaron mayor fluorescencia cuando el medio contenía CMC, lo cual es indicativo de que la inducción de la enzima podría ser mejor cuando se utiliza un sustrato amorfo que uno cristalino.

Los resultados con *T. harzianum* muestran que la enzima en este microorganismo está presuntamente en forma libre en el sobrenadante ya que éste dio positivo para la reacción. El crecimiento hifal de los hongos tiene la característica de permitir mayor penetración en el sustrato llegando a lugares propicios para comenzar la actividad enzimática aprovechando al máximo la capacidad enzimática de degradar la celulosa. De esta manera gracias a la penetración de la hifa, los hongos una vez que colonizan el sustrato liberan las enzimas al medio o el contacto de la pared celular con el sustrato permite que la reacción ocurra eficientemente.

Actividad Endoglucanasa de *R. cellulosilyticum* en placa sin capa fina de agar-sustrato.

Los resultados (Fig. 7Ay 7B, Tabla 6) muestran actividad positiva para *R. cellulosilyticum* en medio con CMC y mínima actividad para *R. trifolii*. Se utilizó *E.coli* como control negativo. En cuanto a RC no hay evidencia de actividad para ambos microorganismos.

El reactivo Rojo Congo se comporta diferente en ambos medios, la coloración roja del medio con CMC es el estándar.

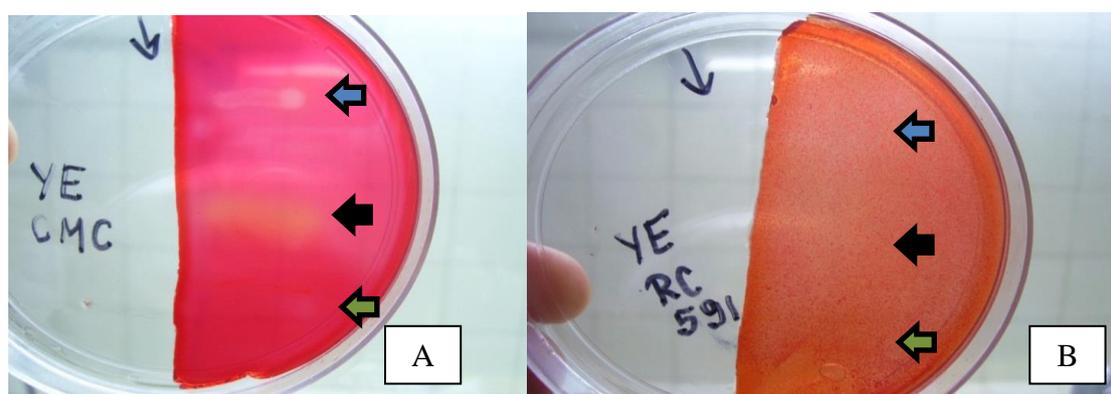


Figura 7. Se inocularon los microorganismos sobre medio para *Rhizobium sp.* con CMC (Fig. 7A) y RC (Fig. 7B) como fuente de carbono. En la parte superior de la placa *R. trifolii* (flecha azul), en el medio *R. cellulosilyticum* (flecha negra) y en la parte inferior *E.coli* (flecha verde).

Tabla 6- Actividad endoglucanasa de *Rhizobium sp.*

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Medio de Crecimiento (sólido, placas)	Actividad	
				<i>R. trifolii</i> 843	<i>R.cellulosilyticum</i>
Color Complejo Rojo Congo - celulosa ^a	Decoloración del complejo	<i>in vivo</i>	Rh ^b CMC ^c	+	+++
			Rh RC ^d	-	-

a- El Rojo Congo forma un complejo de color rojo con la celulosa. La actividad enzimática endoglucanasa hidroliza la celulosa y por lo tanto se visualiza su presencia por la decoloración del complejo (Teather, R. and P. Wood, 1982); b- Medio para *Rhizobium sp.* (YEM) en el que se sustituyó manitol por CMC o RC 0,1 % (MRh); c- CMC (carboximetilcelulosa, celulosa amorfa soluble); d- RC (celulosa 90 % cristalina, insoluble).

Actividad Endoglucanasa de *R. cellulosilyticum* en placa con capa fina de agar-sustrato

En el ensayo (Fig. 8 y 9, Tabla 7) se observa mayor reacción por parte de *R. cellulosilyticum* cuando se crece en medio con CMC como fuente de carbono y se añade

la capa fina de CMC. Pero también hay reacción, aunque menor, cuando se crece en medio con RC y se añade la capa con CMC. En ambos casos la actividad que se revela es siempre sobre CMC porque la capa que se agrega sin llegar al medio de crecimiento contiene CMC. La reacción de *R. trifolii* es un poco menor en ambos a *R. cellulosilyticum*. Para ambos microorganismos la reacción es menor con RC en el medio de crecimiento que con CMC en el mismo. *E. coli* no presenta reacción en ningún ensayo como era de esperarse (control negativo).

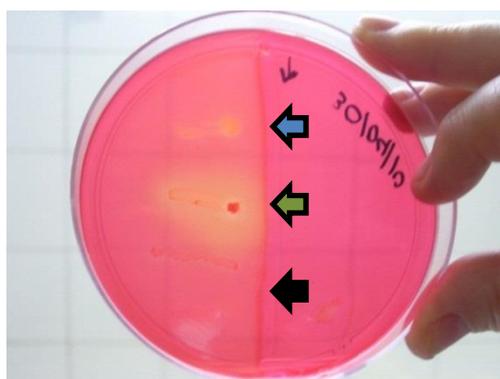


Figura 8. Se observa el crecimiento celular en medio para *Rhizobium sp.* con CMC como fuente de carbono, sobre la células se añadió la capa de CMC. En la parte superior (flecha azul) se inoculó *R. trifolii*, en el centro (flecha verde) *R. cellulosilyticum* y en la parte inferior (flecha negra) *E.coli*.

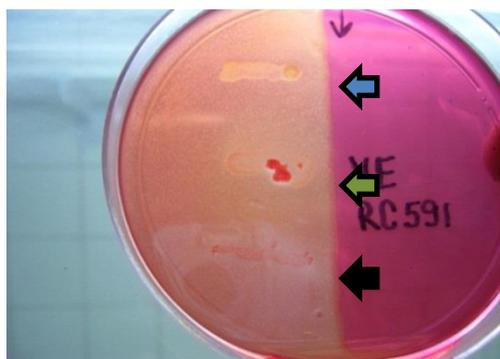


Figura 9. Se observa el crecimiento celular en medio para *Rhizobium sp.* con RC 591 como fuente de carbono, sobre las células se añadió la capa de CMC. En la parte superior (flecha azul) se inoculó *R. trifolii*, en el centro (flecha verde) *R. cellulosilyticum* y en la parte inferior (flecha negra) *E.coli*.

Tabla 7. Actividad endoglucanasa sobre capa de CMC

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Medio de Crecimiento, solido placas	Capa ^e	Actividad	
					<i>R. trifolii</i> 843	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>
Color Complejo Rojo Congo -celulosa ^a	Decoloración Complejo	<i>in vivo</i>	Rh ^b CMC ^c	CMC 0,2%	+	+++
			Rh RC ^d	CMC 0,2%	+	++

a- El Rojo Congo forma un complejo de color rojo con la celulosa. La actividad enzimática endoglucanasa hidroliza la celulosa y por lo tanto se visualiza su presencia por la decoloración del complejo; b- Medio para *Rhizobium sp.* (YEM) en el que se sustituyó manitol por CMC o RC; c- CMC (carboximetilcelulosa, celulosa amorfa soluble); d- RC (celulosa 90 % cristalina, insoluble); e- La capa contiene agar 0,8%.

Actividad endoglucanasa en crecimiento sobre capa fina de agar - sustrato

Con este método se observa reacción de decoloración por parte de ambos microorganismos cuando se hace crecer sobre una capa de agar fina con CMC (Fig. 10, Tabla 8). En el ensayo de crecimiento sobre la capa con RC (Fig. 11, Tabla 8) no hay halo de degradación por parte de ningún microorganismo. La tinción del medio con CMC es transparente y de color intenso, siendo que la tinción del medio con RC es opaca debido a la celulosa insoluble. El agar en la capa fina de arriba es blando lo cual permite que los componentes de la parte inferior que contienen el medio para el crecimiento pero sin fuente de celulosa sean captados por el microorganismo y por otro lado la tinción solamente se realiza en esa capa, por lo cual la visualización de la reacción corresponde solo a la reacción con el sustrato de celulosa que contiene la capa en la parte superior.



Figura 10. En este ensayo se realizó el crecimiento sobre la capa con CMC, la parte inferior de la placa contiene medio para *Rhizobium* sp. pero no posee fuente de carbono. La parte de arriba de la placa contiene agar blando con CMC. Sobre este se procedió a inocular. En la fila superior se creció *R. cellulosilyticum* por duplicado y en la fila inferior *R. trifolii* por duplicado también. Se observan halos de degradación de celulosa.



Figura 11. En este ensayo se realizó crecimiento sobre capa con RC de *Rhizobium* sp. En la parte inferior de la placa se añadió medio para *Rhizobium* sp y luego se aplicó el agar blando de RC. En la fila superior se creció *R. cellulosilyticum* por duplicado y en la fila inferior *R. trifolii*. Se delimita el crecimiento de las células. No se observan halos de degradación de celulosa

Tabla 8. Actividad endoglucanasa de *Rhizobium* sp. *in vivo* crecido sobre capa fina

Medio de crecimiento sólido en placas	Sustrato en capa ^a	Siembra sobre la capa, tiempo de crecimiento ^b	Actividad ^c	
			<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>R. trifolii</i>
MRh YE	RC en agua	4 d	-	-
	CMC en agua	4 d	+	+

a- Agar 0,8%. RC (90 % celulosa cristalina, insoluble), 0,1%. CMC, 0,1%; b- Crecimiento a 30 °C; c- Ensayo de actividad endoglucanasa sobre el sustrato en la capa. Se elimina el crecimiento con agua y posteriormente se revela con procedimiento estándar con Rojo Congo.

Actividad endoglucanasa de *Rhizobium* sp. *in vitro*

Se observa reacción positiva con el extracto (Fig. 12, Tabla 9). La reacción negativa con el sobrenadante puede ser debida a la baja concentración de proteínas.



Figura 12- Se observan los resultados *in vitro* de *R. cellulosilyticum* sobre capa con CMC. En la fila superior se inocula, sobrenadante dializado, en la fila central el extracto celular y en la fila inferior el sobrenadante dializado y filtrado con Millipore 0,45µm.

Tabla 9. Actividad endoglucanasa de *Rhizobium* sp. *in vitro* sobre capa fina

Medio sólido en placas	Sustrato en capa ^a	Incubación ^c	Actividad ^d <i>R. cellulosilyticum</i>		
			Extracto ^e	Sobrenadante Filtrado ^f	Sobrenadante Dializado ^g
Agar 2% en agua	RC en buffer PC, pH 5,2	4 d	(10 ul)	-	-
			(20 ul)	-	-
			(10 ul)	-	-
	CMC en buffer PC, pH 5,2	4 d	(10 ul)	+	-
			(20 ul)	-	-
			(20 ul)	+	-

^a Agar 0,8%. RC (90 % celulosa cristalina, insoluble), 0,1%. CMC, 0,1%; ^b Se deposita sobre la capa 10 o 20 ul de extracto; sobrenadante filtrado; o sobrenadante dializado; ^c Se incuba a 37 °C. ^d Ensayo de actividad endoglucanasa sobre el sustrato en la capa. Se elimina el crecimiento con agua y posteriormente se revela con procedimiento estándar con Rojo Congo; ^e Se utilizan 10 o 20 ul de extracto; ^f Se utilizan 10 o 20 ul de sobrenadante filtrado; ^g Se utilizan 10 o 20 ul de sobrenadante dializado.

Actividad *in vitro* sobre CMC utilizando sobrenadante de *R. cellulosilyticum*

Este ensayo (Tabla 10) muestra que el sobrenadante de *R. cellulosilyticum* tiene actividad endoglucanasa ya que hay disminución apreciable de la fluidez de la solución de CMC cuando es tratada con la fuente de enzima. El control (-E) es negativo.

Tabla 10. Actividad *in vitro* sobre solución de CMC

Actividad	Ensayo In vitro	Incubación	Incubación Proteínas (µg) Volumen (ml)	Sustrato	Buffer PC, pH 5,2	Producto	Resultado
Endo	Sobrenadante <i>R. cellulosilyticum</i>	Medio líquido	5,1 µg (08 ml de sn)	CMC(endo) 2% (20 mg)	0,2 ml	Disminución viscosidad	+
	Control negativo <i>R.cell</i>	Medio líquido	-	CMC (endo) 20 mg	1 ml	Disminución viscosidad	-

Actividad endoglucanasa de *Trichoderma harzianum*.

En este ensayo (Fig. 13, Tabla 11 y 12) se observa decoloración cuando se utiliza una capa de agar-CMC ya sea en crecimiento en medio con CMC o RC. La reacción con RC en el medio y en la capa no es clara.

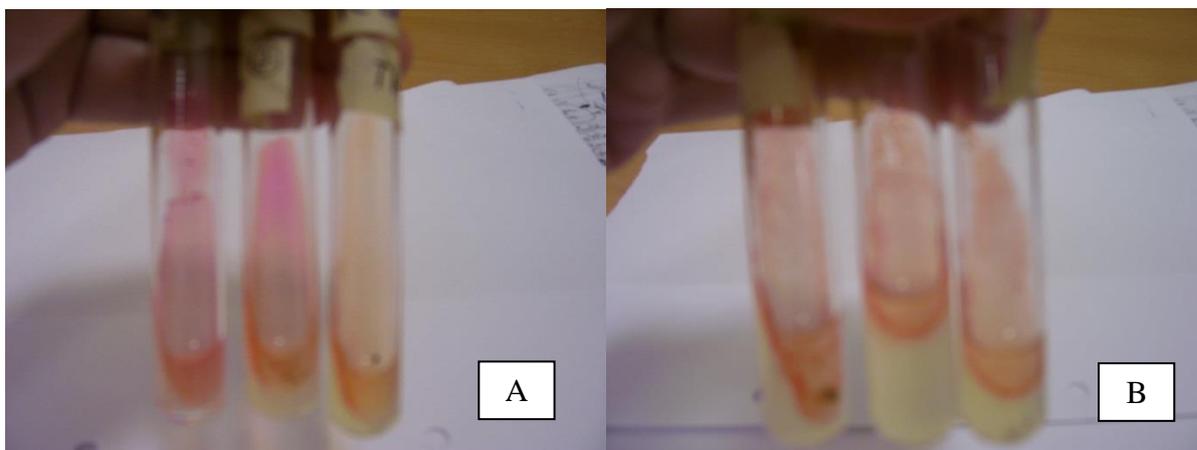


Figura 13. Actividad endoglucanasa de *T. harzianum* crecido sobre medio con CMC y RC, aplicando capa por encima de agar sustrato. En la figura A se creció con CMC en el medio (de izquierda a derecha) tubo 1 sin inocular con capa de CMC; el tubo 2 contiene capa con RC; el tubo 3 capa de CMC. En la figura B se creció con RC en el medio, (izquierda a derecha) tubo 1 capa de RC sin inocular, tubo 2 contiene capa con RC y tubo 3 con capa con CMC.

Tabla 11. Actividad endoglucanasa de *Trichoderma harzianum* in vivo sobre sustrato en una capa fina de agar blando

Indicador de actividad	Visualización de actividad	Ensayo	Medio de Crecimiento sólido, en tubos	Capa ^e	Actividad <i>Trichoderma harzianum</i>
Color Complejo Rojo Congo - celulosa ^a	Decoloración Complejo	<i>in vivo</i>	YE ^b CMC ^c	CMC0,2%	+
				RC 0,2%	+/- ^f
				CMC0,2%	+
			YE RC ^d	RC 0,2%	+/-

^a El Rojo Congo forma un complejo de color rojo con la celulosa. La actividad enzimática endoglucanasa hidroliza la celulosa y por lo tanto se visualiza su presencia por la decoloración del complejo; ^b Medio para *Trichoderma harzianum* (YE) en el que se sustituyó sacarosa por CMC o RC; ^c CMC (carboximetilcelulosa, celulosa amorfa soluble); ^d RC (celulosa 90 % cristalina, insoluble); ^e La capa contiene el sustrato indicado en agua en agar 0,8%; ^f Actividad dudosa.

Tabla 12. Actividad endoglucanasa de *T. harzianum* in vivo con sustrato en la capa fina de agar –sustrato en buffer PC pH 5,2.

Tipo de Ensayo	Medio de crecimiento sólido en placas	Tiempo de crecimiento ^a	Sustrato en la capa ^b	Tiempo de Incubación	Actividad ^c
<i>In vivo</i>	YE	4 d	CMC en buffer PC, pH 5,2	3 d	+
	YE	4 d	RC en buffer PC, pH 5,2	3 d	(+) ^d

^a Crecimiento a 25 °C; ^b Agar 0,8%. RC es 90 % celulosa cristalina, insoluble; ^c Ensayo estándar de actividad endoglucanasa con Rojo Congo; ^d (+) Aparecen alteraciones el overlay rodeando la RC que parecen indicar actividad, reacción dudosa.

Los resultados de actividad sobre la capa con RC en agua y en extracto de levadura fueron negativos (Tabla 13). Utilizando el RC en capa fina con buffer P-C hay una reacción de decoloración leve parcial cuando se crece en ambos medios. La reacción de decoloración es dudosa porque no es homogénea en toda la capa. Es claro que esta reacción no se observa cuando no se utiliza buffer en la capa. Tampoco se observa reacción cuando se utiliza junto al sustrato el extracto de levadura en la capa, sin modificación del pH. *T. harzianum* presentó indicios de actividad *in vivo* con RC en buffer PC pH 5,2 lo que se verificará por ensayos de actividad *in vitro*.

Tabla 13. Actividad endoglucanasa de *T. harzianum* in vivo con celulosa cristalina en capa fina de agar.

Tipo de Ensayo	Medio de crecimiento sólido en placas	Tiempo de crecimiento ^a	Sustrato en la capa ^b	Tiempo de Incubación	Actividad ^c
<i>In vivo</i>	YE CMC	4 d	RC en agua	6 d	-
			RC en 0,1% YE	6 d	-
			RC en buffer PC, pH 5,2	6 d	(+) ^d
	YE RC	4 d	RC en agua	6 d	-
			RC en 0,1% YE	6 d	-
			RC en buffer PC, pH 5,2	6 d	(+) ^d

^a Crecimiento a 25 °C; ^b Agar 0,8%. RC es 90 % celulosa cristalina, insoluble; ^c Ensayo estándar de actividad endoglucanasa con Rojo Congo; ^d (+) Aparecen alteraciones en la capa rodeando la RC que parecen indicar actividad (a confirmar). Los controles sin inocular no presentan alteraciones.

La actividad endoglucanasa se visualizó para ambos microorganismos sobre medios con CMC

R. cellulosilyticum fue aislado del polvo de madera en descomposición, por lo cual se podría esperar que las fuentes de carbono más predominantes en ésta sean utilizados por el microorganismo. Una de estas fuentes de carbono es celulosa en alto grado de cristalinidad (García *et al.*; 2007). La madera está compuesta mayormente por celulosa cristalina, no amorfa, lo cual aumenta la probabilidad en primera instancia que la fuente de carbono provenga de este sustrato, sin tener en cuenta los demás sustratos que puedan servir como fuente de Carbono.

Cuando se evaluó la actividad endoglucanasa sobre crecimiento con CMC, se visualizó por parte de *R. cellulosilyticum* que la actividad difundió al medio pero también que está presente en la membrana de la célula bacteriana ya que una vez que se remueven las células aplicando NaCl y luego se añade Rojo Congo, hay decoloración donde había crecimiento. Esto podría ser indicio de que la actividad también podría estar sobre la superficie de la célula y por lo tanto estaría presente la enzima tanto en forma libre como adherida a la membrana celular.

En el ensayo paralelo de crecimiento sobre medio que contiene RC, las células también fueron removidas de la misma manera. En este ensayo no se observó actividad en el medio y tampoco por debajo de las células. La coloración que el reactivo Rojo

Congo produce en el medio es diferente en comparación a la que se obtiene utilizando CMC, el color es naranja en vez de rojo, esto se debería a que el reactivo no tiene el mismo comportamiento con cada uno de los sustratos y probablemente el colorante no pueda intercalarse de manera eficiente sobre el sustrato cristalino. Está claro que si hubiera hidrólisis se visualizaría por un color más claro al hacer la tinción.

La reacción tuvo los mismos resultados generales cuando el reactivo se aplicó sobre crecimiento y cuando se creció sobre la capa fina de agar como una película de sustrato. Cuando se utiliza el crecimiento por encima de la capa fina que contiene solo el sustrato (CMC o RC) se pretende que la actividad se pueda visualizar por más mínima que sea con la menor interferencia posible. Este método mostró mejoras en la visualización de la actividad ya que la misma se observa más claramente con respecto al resto de la placa, sin embargo los resultados no fueron diferentes a los anteriores, se visualiza actividad con CMC como sustrato pero no con RC como sustrato.

El hecho de que *R. cellulolyticum* no haya presentado actividad con el sobrenadante sobre placa con CMC fue inesperado ya que en el ensayo *in vivo* la actividad no solamente se visualizaba por debajo de las células una vez removidas sino que también difundía en el medio. En trabajos posteriores llevados a cabo en el Polo Tecnológico de Química que continúan el presente trabajo (trabajo a publicar) se cuantificaron las proteínas en el sobrenadante y en el extracto celular. El resultado obtenido para el extracto celular fue de 474 $\mu\text{g/ml}$ y para el sobrenadante fue de 6,4 $\mu\text{g/ml}$. Este resultado da una explicación a los resultados obtenidos con el sobrenadante y el extracto en placa. Quizás el problema radica en la cantidad de enzima que posea el sobrenadante, puede que no sea suficiente para poder detectar el halo en la placa, debido al volumen introducido (10 μl y 20 μl). Sin embargo cuando se usan 0,8 ml de sobrenadante en cada ensayo (cantidad mucho mayor a la introducida sobre la placa) si es suficiente para disminuir la viscosidad cuando se realiza el ensayo de fluidez con CMC 1% en tubo,

Trichoderma harzianum tiene gran actividad endoglucanasa con CMC. La actividad endoglucanasa con RC se visualiza de forma confusa por lo cual no se podría afirmar que el ensayo fue positivo. Debido a la naturaleza del microorganismo es probable que no posea actividad sobre celulosa cristalina ya que se sabe que su participación en el proceso de degradación es sobre recursos que poseen fuentes de carbono solubles y libres de lignina. Por ello no se ha demostrado que pueda actuar dañando los tejidos de las plantas.

La actividad celololítica sobre sustratos cristalinos como el RC no solamente requiere de la actividad independiente de varias enzimas sino de la actividad sinérgica de éstas y posiblemente de varios tipos de enzimas que realizan la misma actividad. Para la degradación de un sustrato cristalino son necesarias la sinergia de las actividades exo-endo, exo-exo (progresiva desde diferentes extremos), β - glucosidasa- exo, la cual removería celobiosa y también entre los dominios catalíticos y los CBMs (cellulose binding modules) (Lynd *et.al* 2002). Debido a esto al analizar la actividad endoglucanasa sobre sustrato cristalino es más complejo que sobre sustratos amorfos. En nuestros ensayos los resultados de actividad endo sobre sustratos cristalinos fueron negativos y sin embargo sobre CMC fueron positivos utilizando los mismos microorganismos, lo cual significa que no hay actividad endoglucanasa sobre sustrato cristalino, pero si frente a CMC.

Hasta este momento hay dos grandes problemáticas en la visualización de la actividad endoglucanasa con el método Rojo Congo en medio con celulosa cristalina. El primero es la reacción del colorante con el sustrato celulósico, la cual se ve afectada por la cristalinidad del mismo, si el colorante no es eficiente en la penetración del sustrato la reacción podría no ser visualizada correctamente o ser subestimada.

Actividad endoglucanasa y exoglucanasa

Se logró la degradación del papel de filtro en estas condiciones solamente con la preparación enzimática de *T. reesei*.

El papel de filtro tiene 40% de celulosa amorfa y el resto cristalina. Lo cual permite utilizarlo como sustrato de mezclas enzimáticas de modo de comprobar si las enzimas actúan en sinergia para degradar la celulosa cristalina luego de haberlas ensayado individualmente.

Tabla 15. Actividad celulolítica total (endoglucanasa, exoglucanasa) *in vitro* de *R. cellulosilyticum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei* sobre papel de filtro (PF) en medio líquido

Muestra	<i>R. cell. Sn^a</i> (10 mg/ml)	<i>R. cell. Extracto^b</i>	<i>T.h.S^c</i> (10mg/ml)	<i>T. r. Sn^d</i> (10mg/ml)	Papel de Filtro en buffer PC, pH 5,2	Degradación
1. Sn <i>R. cell</i> + extracto	100ul	50 µl	-	-	PF	-
2. Sn <i>T. h</i>	-	-	100ul	-	PF	-
3. Sn <i>T. r.</i>	-	-	-	100ul	PF	+
4. Sn <i>T. r.</i>	-	-	-	100ul	PF	+
5. Blanco	-	-	-	-	PF	-

^a Sn, sobrenadante liofilizado de *R. cell.* (10mg/ml) en buffer PC, pH 5,2.

^b Extracto *R. cell.*: 50 µl, 23,7 µg de proteína.

^c Sn, sobrenadante liofilizado de *T. h1* (10mg/ml) en buffer PC, pH 5,2.

^d *T.r.*, sobrenadante liofilizado de *Trichoderma reesei* (10mg/ml) en buffer PC, pH 5,2.

Relación ecológica con actividad celulolítica

Es sabido que existe una relación entre la el nicho donde se encuentra el microorganismo de tal manera que éste se desarrolla en condiciones más convenientes para crecer y reproducirse o se adapta a condiciones más agresivos para poder subsistir. Esto nos lleva a pensar en el caso de la bacteria *R. cellulosilyticum* que si bien fue aislada de aserrín, no presenta actividad celulolítica frente al sustrato cristalino RC. Este acontecimiento no descarta la idea de que contenga enzimas que actúen frente a otro sustrato cristalino o bajo otras condiciones, ya que el grado de cristalinidad y los sustratos son una variable importante en los resultados de actividad celulolítica. Es inevitable observar que esta bacteria posee mayor actividad endoglucanasa extracelular que su contraparte endosimbiótica *R. trifolii*, lo cual quizás denote la relación entre los nichos ocupados y la mayor utilización de las fuentes de carbono celulósicas por *R. cellulosilyticum*. En principio se podría inferir una presunta relación positiva entre la utilización de celulosa y la capacidad de liberación de enzimas al medio como el caso de *R. cellulosilyticum* y relación negativa entre la misma y la actividad endosimbiótica.

En el caso de *T. harzianum* que es un hongo utilizado para biocontrol que coloniza mayormente las raíces de las plantas, se esperaría quizás que no posea enzimas celulolíticas para la degradación de la madera o que no las secrete con el fin del dañar el tejido de la planta, sin embargo hay algunas cepas que tienen actividad sobre los enlaces

β 1-4, por ej. IOC-3844 (De Castro, A *et al.*, 2010). Este hongo también presenta enzimas para atacar a otros hongos, destruye los enlaces β 1-3 en glucanos de las paredes celulares.

Resumen de los resultados encontrados.

Actividad	Microorganismo	Método	Sustrato	Figura y Tabla -
Exo <i>In vivo</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Tubo sólido Fluorescencia	Mu-c +	Figura3, Tabla 2
Exo <i>In vitro</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Medio líquido Fluorescencia	Mu-c +	Figura 4, Tabla 3
Exo <i>In vivo</i>	<i>Trichoderma Harzianum</i>	Tubo sólido Fluorescencia	Mu-c +	Figura 5, Tabla 4
Exo <i>In vitro</i>	<i>Trichoderma Harzianum</i>	Medio líquido Fluorescencia	Mu-c +	Figura 6, Tabla 5
Endo <i>In vivo</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Crecimiento Simple	CMC + RC -	Figura 7A y 7B Tabla 6
Endo <i>In vivo</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Overlay sobre crecimiento	CMC + RC -	Figura 8 y 9 Tabla 7
Endo <i>In vivo</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Crecimiento sobre capa	CMC + RC -	Figura 10 y 11 Tabla 8
Endo <i>In vitro</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Muestra sobre capa	CMC + RC -	Figura 12 Tabla 9
Exo y Endo <i>In vitro</i>	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>	Medio líquido Disminución de viscosidad	CMC +	Tabla 10
Endo <i>In vivo</i>	<i>Trichoderma Harzianum</i>	Capa	CMC + RC (+)	Figura 13 Tabla 11, 12 y 13

VII. CONCLUSIONES

Actividad exoglucanasa.

R. cellulosilyticum posee presunta actividad exoglucanasa, secreta la/s enzima/s al medio y es probable que también se localicen en la superficie de la célula.

R. trifolii posee actividad exoglucanasa, la actividad es mayor que la observada para *R. cellulosilyticum*.

Trichoderma harzianum posee actividad exoglucanasa, se verifica que secreta la enzima al medio y es posible que esté adherida a la superficie de la célula.

Métodos:

El ensayo se visualiza de forma óptima cuando se trabaja con el sobrenadante del cultivo para registrar la actividad. Con el reactivo Mu-C no es posible, *in vivo*, saber

si la enzima se encuentra adherida a la superficie celular ya que el componente fluorescente queda libre una vez efectuada la reacción.

Actividad endoglucanasa

R. cellulosityticum muestra presunta actividad endoglucanasa cuando se utiliza el sustrato amorfo (CMC) y no posee actividad en sustrato cristalino de la manera que fue ensayado. La actividad enzimática difunde en el medio, la enzima podría encontrarse en forma libre pero hay actividad por debajo de las células lo cual indica que podría estar anclada a la superficie celular también. La celulosa cristalina no es ideal para trabajar con el reactivo Rojo Congo.

R. trifolii posee presunta actividad endoglucanasa sobre sustrato amorfo, menor que *R. cellulosityticum* y posiblemente no sea de forma libre ya que no tiene un patrón de difusión claro.

T. harzianum también presenta indicios de actividad celulolítica endoglucanasa sobre sustrato amorfo pero no sobre sustrato cristalino. La enzima posiblemente sea secretada al medio ya que la reacción se observa en toda la superficie del agar.

La actividad endoglucanasa tiene óptimos resultados cuando se siembra el microorganismo sobre la capa de agar fino con el sustrato ya que permite el crecimiento del microorganismo y revelar la actividad disminuyendo el ruido de fondo. No se visualiza dicha actividad sobre celulosa cristalina y tampoco posee propiedades inductoras significativas de la actividad cuando el microorganismo crece con RC en el medio como fuente de carbono y luego se revela con CMC en la capa fina.

Para visualizar dicha actividad utilizando el sobrenadante del crecimiento celular se utiliza la técnica de la disminución de viscosidad de solución de CMC 1%. Con este método logra buenos resultados con niveles bajos de concentración de enzima.

Los resultados de los ensayos de actividad total fueron concordantes con los resultados de los análisis individuales de las enzimas. *R. cellulosityticum* y *T. harziaunum* no poseen enzimas que actúan de forma eficiente sobre celulosa cristalina bajo las condiciones trabajadas.

VIII. Métodos seleccionados y Protocolo de screening

A continuación se presentan los métodos seleccionados en la optimización del screening cualitativo de las actividades endoglucanasa y exoglucanasa en bacterias y hongos aerobios.

Actividad Endoglucanasa

Bacterias

In vivo

- Generar placas de Petri estériles con medio para crecer el microorganismo sin Fuente de Carbono celulósica.
- Luego que solidifica el agar, agregar por encima agar blando con la fuente de carbono celulósica, RC o CMC.
- Inocular los microorganismos en la placa, sobre el agar blando. Debe haber placas controles (- Crecimiento) y (- Fuente de carbono). Crecer en los tiempos y temperaturas óptimas.
- Revelar con Rojo Congo

Hongos

In vivo

- Generar tubos estériles con medio para crecimiento del hongo, con fuente de carbono celulósica en pico de flauta.
- Inocular los microorganismos en los tubos. Debe haber tubos controles (-Crecimiento) y (- Fuente de carbono). Incubar en los tiempos y temperaturas óptimas.
- Agregar por encima agar blando con la fuente de carbono en el medio, RC o CMC
- Revelar con Rojo Congo.

Bacterias y Hongos

In vitro

sobrenadante y/o extracto

- Obtener el sobrenadante del crecimiento en medio líquido utilizando una fuente de carbono celulósica.
- Filtrar y dializar el sobrenadante de modo de obtener solo las moléculas de interés.
- Realizar la mezcla de incubación completa en tubo: sobrenadante o extracto + CMC 1% + Buffer P-C pH 5,2. Control (-sn o ext)
- Observar cambio de fluidez de la mezcla.

Actividad Exoglucanasa

Bacterias y Hongos

In vivo

- Generar tubos con medios estériles para el microorganismo a trabajar con fuente de carbono CMC o RC.
- Antes que se solidifique el medio agregar el sustrato Mu-C.
- Proceder a inocular el microorganismo e incubar a temperatura y tiempo optimos.
- Revelar con transiluminador con luz UV.

Bacterias y Hongos

In vitro

Sobrenadante y/o extracto

- Obtener el sobrenadante del crecimiento en medio líquido utilizando una fuente de carbono celulósica.
- Filtrar y dializar el sobrenadante de modo de obtener solo las moléculas de interés.
- Realizar la mezcla de incubación completa en tubo: sobrenadante o extracto + Mu-C + Buffer P-C pH 5,2. Control (-sobrenadante) y (- Mu-C).
- Incubar a temperatura y tiempo óptimos.
- Revelar con transiluminador con luz UV.

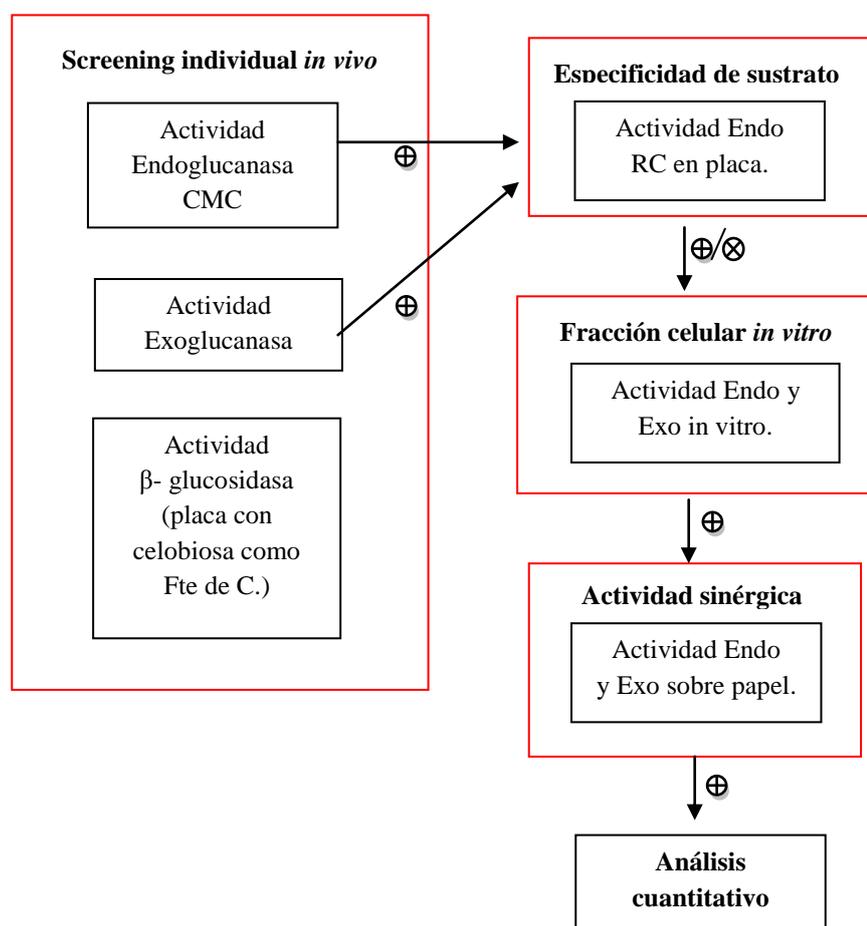
Bacterias y Hongos

In vitro

- Utilizar las fracciones celulares que dieron positivo para las actividades exo y endo.
- Realizar mezcla del papel en tubos de ensayos con buffer PC pH 5,2 + la fracción con la actividad (o fracciones)
- Observar degradación del papel (comparar con el control positivo *T.reesei*)

Protocolo para screening celulolítico en microorganismos.

Se propone el siguiente protocolo para el screening cualitativo celulolítico en microorganismos, utilizando los métodos con mejor resolución de resultados en el presente trabajo.



A continuación se detallan los pasos del protocolo y los resultados a obtener de cada ensayo:

1. Screening individual *in vivo*. Realizar los ensayos en paralelo de actividad endoglucanasa y exoglucanasa *in vivo* con sustrato amorfo (ver materiales y métodos de actividad endoglucanasa y actividad exoglucanasa). Estos resultados determinarán la presencia de actividad exoglucanasa y endoglucanasa sobre CMC. Para detectar actividad β- glucosidasa el microorganismo debe utilizar

medios de cultivo con celobiosa como única fuente de carbono, el crecimiento revela la utilización de celobiosa como fuente de carbono.

2. Especificidad de sustrato. Realizar ensayos *in vivo* con sustrato RC. Este ensayo determina la presencia de actividad endoglucanasa sobre sustrato cristalino. En caso de que sea positivo observar si la actividad difunde en el medio. Este resultado puede ser confuso ya que el colorante Rojo Congo no es óptimo en este medio (ver materiales y métodos, Actividad endoglucanasa con RC)
3. Fracción celular *in vitro*. Utilizar los sobrenadantes y extractos de los crecimientos en medio líquido, ya sea liofilizado (concentrado) o no sobre solución de CMC 1% para verificar la actividad endo. Verificar disminución de viscosidad. Este ensayo revela la actividad endoglucanasa del sobrenadante y extracto sobre sustrato amorfo (ver materiales y métodos, Actividad endoglucanasa con CMC 1% líquido). Realizar en paralelo el ensayo del sobrenadante o extracto con Mu-C para visualizar la actividad exoglucanasa, observar fluorescencia al iluminar con luz UV.
4. Actividad sinérgica. A partir de los resultados anteriores determinar las fracciones celulares que poseen las actividades enzimáticas exo y endo y utilizarlas en el ensayo con papel para evaluar las actividades en conjunto. En este ensayo se observará si hay actividad sobre celulosa cristalina de características diferentes al RC y la capacidad de las enzimas de actuar en sinergia (ver materiales y métodos, Actividad exo y endo)
5. Análisis cuantitativo. Si se observa degradación del papel, proceder a los análisis cuantitativos para determinar las enzimas presentes y las actividades de las mismas. Los análisis cuantitativos posibles son: i) medición de proteínas con reactivo de Bradford (Bradford. M, 1976); ii) azúcares reductores, liberación de azúcares reductores; iii) pNPcel (pNitrophenylcellobioside) en medio líquido para actividad exoglucanasa; iv) Actividad β - Glucosidasa sobre pNPGlu (pNitroPhenylGlucoside). Se mide al espectrofotómetro la liberación de pNitroPhenol siguiendo la Abs a 540 nm.

IX. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a:

Mis Padres, por su amor y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. Sin sus sabios consejos el camino hasta hoy se hubiese hecho más difícil sin lugar a dudas, un millón de gracias.

Mis hermanas Andrea y Lucia, siempre apoyándome en los momentos de dificultad y compartiendo los momentos de felicidad.

Alicia Gardiol, por todos los conocimientos que me brindo, su apoyo , tolerancia y por sobre todas las cosas el labor de creer en mí en momentos que yo mismo me cuestionaba.

A Lina Betucci y Silvina Rossi por sus dedicadas correcciones que me permitieron cambiar mi perspectiva del trabajo para mejor. Estoy muy agradecido con ambas.

A Valentina, por estar a mi lado, por su amor y su apoyo incondicional siempre dando lo mejor y la mejor sonrisa.

Mis amigos de facultad, una gran razón por la que valió la pena este camino fue haberlos conocido, por tantas alegrías y tanto aguante. ALVARO, CAIO Y VICTOR.

A mis amigos de toda la vida, Tristan, Pablo (lolo), Federico, Carlos, Manuel, Sebastián, por muchas alegrías y enseñanzas !!!

X. BIBLIOGRAFÍA

Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye – binding. 1976. *Biochem.* 72: 248-254.

Cantarel, B; P. Coutinho; C. Rancurel; T. Bernard; B. Lombard. and B. Henrissat. 2008. *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.*

Coutinho, P. and B. Henrissat. 1999. *Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach.* In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat H, Svensson B, editors. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 3–12.

De Castro, AM; MC. Ferreira; JC. da Cruz; KC. Pedro; DF. Carvalho; SG. Leite and N. Pereira. 2010. High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. *Enzyme Research.* 2010, Article ID 854526.

Dewey, D and M. Mandels. 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiology.* (2), Abril. 91-102.

Francieli, C; V. Serpa; P. da Silva Delabona; L. Manzine; M. Voltatódio; R. Alves; B. Mello; Jr N. Pereira; C. Farinas; A. Golubev; M. Santos; I. Polikarpov. (2011). Purification, and Biochemical and Biophysical Characterization of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21(8). 808–817.

Garcia-Fraile, P; R. Riva; A. Willems; A. Peix; M. Martens; E. Martinez-Molina; P. Mateos; E. Velazquez. (2007). *Rhizobium cellulosilyticum* sp. isolated from sawdust of *Populus alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57. 844–848.

Gilkes, N. et al. 1995. Enhancement of the endo β 1-4 glucanase Activity of an Exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. *The journal of Biological Chemistry.* 270 (9). 4383-4386.

Graham, J. et al. 1997. Subcellular fractionation, a practical approach. *New York*, pp. 256-258.

Guédeza, C; L. Cañizález; C. Castillo. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp).*Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29. 34-38.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2): 257-268.

Harman, G. E . et al., 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 2926-2933.

Leppänen, K; S. Andersson; M. Torkkeli; M. Knaapila; N. Kotelnikova and R. Serimaa. 2009. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by X-ray scattering. *Cellulose* (online).

Lynd, L. et al. 2002. *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology*. MMBR. 66:506-577.

Martin. K. 2000. *Why solid waste managers should look at the ethanol option*. *BioCycle*. 41: 2: 35.

Robledo, M; I. Jiménez-Zurdo; E. Velázquez; M. E. Trujillo; J. L. Zurdo-Pineiro; M. H. Ramírez-Bahena; B. Ramos; J. M. Díaz-Mínguez; F. Dazzo; E. Martínez-Molina; P. F. Mateos. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of de National Academy of Science of the U.S.A.* 105(19): 7064-9.

Nishimura, M., et al. 1987. Preparation of protoplasts from plant tissues. *Meth. Enzymol.* 148: 27-34.

Suto, M. and F. Tomita. 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J Bioscience Bioengineering*. 92: 305-311.

Schmoll, M; S. Zeilinger; R. Mach. and C. Kubicek. 2004. Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach.*Fungal Genet Biol.* 41, 877-87.

Teather, R and P. Wood. 1982. Use of Congo Red – polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.

Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific, Oxford.

Wilson, D. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current opinion of microbiology.* 14: 1-5.

Wong, W. *et al.* 1988. Wood hydrolysis by *C. fimi* endoglucanase and exoglucanase coexpressed as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/technology* 6: 713-719.

Yoshida, M; Y. Liu; S. Uchida; K. Kawarada; Y. Ukagami; H. Ichinose; S. Kaneko and K. Fukuda. 2008. Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to Monosaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 72(3): 805-810.

