



“Multiplicación en Medio Líquido de Microorganismos del Género *Streptomyces* Aislados de un Nicho Ecológico del Campus Belmonte de la Universidad Libre Seccional Pereira”

Autores: John Andrés Lemus Angulo*

Resumen:

El presente proyecto de investigación tiene como propósito la evaluación de medios de cultivo en condición líquida, que permita identificar un medio líquido ideal para la multiplicación de microorganismos del género *Streptomyces*, que previamente han sido aislados en el campus Belmonte de la Universidad Libre Seccional Pereira; para tal efecto se evalúa el medio Ashby en condición sólida y líquida, importante para microorganismos fijadores de nitrógeno; igualmente se está evaluando el medio GYM, tanto en condición líquida como sólida, el cual es específico para el cultivo de *Streptomyces*; también se evalúa el medio basal MS, en condición líquida, propuesto para micropropagación vegetal; al realizar las siembras de *Streptomyces* en los diversos tratamientos propuestos, se han evidenciado características morfológicas propias de Actinobacterias, que permiten continuar las siembras en estos medios en procura del medio óptimo. El medio basal MS no reportó resultados satisfactorios, mientras que el medio GYM ha permitido mejor desempeño de *Streptomyces*, con características de promisorio para su multiplicación masiva, con el propósito de inoculación en biocompostaje de subproductos de la caña de azúcar.

Palabras clave: aislamiento, medio de cultivo, multiplicación, *Streptomyces*.

Introducción:

En el presente trabajo de investigación se están evaluando los medios de cultivo: Ashby (sugerido por Salazar y Ordóñez, 2013), GYM (sugerido por Duque y López, 2016) y basal MS (Murashige y Skoog, 1962) que en micropropagación vegetal ha sido reportado como susceptible a contaminación por bacterias (López, 2009).

El Medio Ashby es un medio de cultivo libre de Nitrógeno el cual se emplea para el aislamiento de microorganismos con capacidad para Fijar Nitrógeno Atmosférico (Salazar y Ordóñez, 2013); mientras que el medio GYM permite el fortalecimiento de *Streptomyces* (Zabala, 2008).

Streptomyces son habitantes naturales del suelo, que conforman un grupo heterogéneo de microorganismos unicelulares; contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios que poseen antibacterianos, antifúngicos y antivirales, entre otros; son importantes en la mineralización de los procesos del suelo, además de actuar como descomponedores de

restos vegetales, con la ayuda de una gran cantidad de enzimas requeridas en las actividades de degradación (Sheetal y Modi, 2012).

El género *Streptomyces* forma parte del orden Actinomycetales. Son actinomicetos aerobios y se han venido agrupando según criterios morfológicos, tales como la capacidad de formar filamentos ramificados y esporas. La identificación de estas bacterias sigue siendo difícil, y su diagnóstico y clasificación se basa en características morfológicas (macro y microscópicas), en las quimiotaxonómicas y en las bioquímicas. Los representantes del género *Streptomyces* son gram positivas, aerobias estrictas y catalasa positivas (Singleton, 2004).

Problema de Investigación: Definición del área problemática y pregunta.

Los subproductos de la industria azucarera, representan una dificultad para los ingenios ya que su disposición final da origen a problemas de contaminación y salubridad, como la presencia de plagas, o la emisión de olores.

Así, con el propósito de desarrollar técnicas que puedan mejorar el proceso de compostaje de los subproductos de la caña de azúcar, este proyecto se propone la multiplicación en medio líquido de microorganismos del género *Streptomyces*. Por tanto, la pregunta que se propone resolver, es la siguiente: ¿Se pueden establecer las condiciones de un medio de cultivo líquido, que permitan la multiplicación masiva de *Streptomyces*, en condiciones de laboratorio, para su inoculación en procesos de biocompostaje de subproductos de la caña de azúcar?

Justificación:

La producción de materiales vegetales como subproductos de la actividad industrial de la caña de azúcar, del Ingenio Risaralda SA, genera una serie de sustancias que deterioran el ambiente de la zona de influencia del ingenio, provocando malestar en la comunidad.

El efecto sobre el ambiente de los contaminantes originados en los subproductos industriales de la caña de azúcar, se convierte en un problema ambiental difícil de solucionar; sin embargo, su procesamiento mediante prácticas de compostaje, puede ayudar en la disminución de efecto nocivo alcanzado.

Entonces, al disminuir el tiempo de maduración del compost de los subproductos, con intervenciones biotecnológicas, como lo es el caso de inoculación de microorganismos del género *Streptomyces*, reportado por diversos investigadores como efectivo en dicha condición, estaremos disminuyendo el impacto ambiental de dicho proceso, lo que se convierte en efecto positivo para la región.

Objetivos:

General: “Proponer una metodología para la multiplicación en medio líquido de microorganismos del genero *Streptomyces* sp., de cepas obtenidas en el Campus Belmonte de la Universidad Libre, con propósitos de inoculación e biocompostaje.

Específicos:

1. Identificar un medio de cultivo líquido óptimo para la producción masiva de *Streptomyces* sp.
2. Establecer un protocolo de uso en el laboratorio, que facilite la multiplicación de *Streptomyces* sp. inoculable en procesos de biocompostaje.

Referente Teórico:

El género *Streptomyces* (actinobacterias) forman parte del grupo de bacterias Gram-positivas, las cuales presentan un elevado contenido de G + C, habitantes naturales del suelo, ayudando en el compost, que actúan como promotoras del crecimiento vegetal (PGP), capaces de producir metabolitos secundarios de interés comercial (Gopalakrishnan *et al.*, 2014).

El medio Ashby es un agar especial que, por estar libre de nitrógeno, facilita la identificación de potenciales cepas de bacterias para la fijación de nitrógeno. Los microorganismos que crecen en este medio reemplazan la metabolización del nitrógeno por el nitrógeno atmosférico que se encierra en el microambiente de la caja de Petri (Salazar y Ordóñez, 2013).

El medio YGM contiene extracto de la malta que proporciona el ambiente ácido y el alimento requerido para el metabolismo de los microorganismos. El extracto de levadura, la dextrosa, y los nutrientes aportados, influyen en el crecimiento de actinobacterias. El carbonato de calcio es la fuente de cationes esenciales para el crecimiento (Glazebrook *et al.*, 1990).

El Medio basal MS, propuesto por Murashige and Skoog, contiene abundante cantidad de micronutrientes que proporcionan un medio óptimo para el desempeño de cualquier microorganismo, siempre y cuando éste cumpla con un pH óptimo (Murashige y Skoog, 1962).

Metodología: Diseño metodológico.

En el campus Belmonte de la Universidad Libre Sec. Pereira, se seleccionaron varios nichos, de donde se tomaron varias muestras de suelos; seguidamente se llevaron a condiciones de laboratorio. Las muestras fueron homogenizadas para proceder a realizar diluciones, de las cuales se sembraron 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Las siembras de las tres últimas diluciones se llevaron a cabo en medio de cultivo Agar avena, las cuales permanecieron en condiciones de temperatura ambiente; de los resultados se escogieron las colonias de morfología semejante al género *Streptomyces*; a los 14 días de cultivo se procedió al repique en medios Ashby, GYM y Murashige & Skoog (con pH ajustados a 7.0). Posteriormente se procedió a la caracterización microscópica, utilizando el Manual de Bergey; seguidamente se realizaron las pruebas bioquímicas recomendadas para el género *Streptomyces*. Luego se prepararon los medios de cultivo utilizados (Ashby, GYM y Murashige & Skoog) en condición líquida para la evaluación del desempeño de *Streptomyces*; el medio de cultivo GYM líquido se modificó con las variables presencia, ausencia de CaCO_3 . Seguidamente se realizaron siembras en tales medios a partir de colonias seleccionadas. Las variables a medir consistieron tamaño y número de la morfología colonial exhibida por *Streptomyces*.

Resultados esperados: Pertinentes con los objetivos.

El presente proyecto de investigación, se propone desarrollar un protocolo de multiplicación en medio de cultivo líquido, que nos permita la obtención masiva de *Streptomyces*, con el propósito de inocularse en procesos de biocompostaje de subproductos de la industria de la caña de azúcar.

Impactos: Componente de Responsabilidad social: Social, económico y ambiental.

El Ingenio Risaralda SA tiene su campo de acción en el municipio de La Virginia (Risaralda) cuya población puede superar los 30.000 habitantes, incluidos sus empleados y visitantes. La generación de olores, producto de actividad industrial de la caña de azúcar, es la causa de una serie de sustancias que afectan el ambiente de la zona de influencia del ingenio, provocando malestar en la comunidad.

Entonces, con la inoculación de microorganismos del género *Streptomyces*, aislados del Campus Belmonte de la Universidad Libre Seccional Pereira, que permita disminuir el impacto negativo sobre el ambiente, se convierte en efecto positivo para la región, a más de proponer beneficios económicos para el Ingenio Risaralda.

Bibliografía:

GLAZEBROOK, M A, J L DOULL, C STUTTARD, AND L C VINING. 1990. "Sporulation of *Streptomyces Venezuelae* in Submerged Cultures." *Journal of general microbiology* 136(1990): 581–88.

GOPALAKRISHNAN S, VADLAMUDI S, BANDIKINDA P, SATHYA A, VIJAYABHARATHI R, RUPELA O, *et al.* Evaluation of *Streptomyces* Strains Isolated from Herbal Vermicompost for Their Plant Growth-Promotion Traits in Rice. *Microbiological Research*. 2014. 169(1): 40-48.

LÓPEZ R. Micropropagación Vegetal. Una Guía Teórico-Práctica (ISBN 978-958-44-5925-1). 2009. 86P.

MURASHIGE T AND SKOOG F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–97. 1962. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> (November 17, 2016).

SALAZAR, A. M., y ORDOÑEZ, C. A. Aislamiento de identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. UTP. Trabajo de Grado, Química Industrial. 2013. 115p.

SHEETAL B, MODI H.A. *Streptomyces*: A Storehouse of Bioactive Compounds and Enzymes A: Production of Glucose Isomerase. *Research Journal of Recent Sciences*. 2013. Vol. 2(ISC-2012):330-339.

SINGLETON P. Bacterias en Biología, Biotecnología y Virología Clínica. 3º Edic. Edit. Acribia. Zaragoza. 2004.

ZABALA F. Tratamiento biológico de los residuos vegetales de la Universidad Industrial de Santander utilizando microorganismos aceleradores y lombriz roja californiana para producir un bioabono mejorado. Trabajo de Grado como Bióloga. Universidad Industrial de Santander. 2008. 81p.