



DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE ORIGEN NATURAL PARA EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA

Presentado por:

Wilson Alejandro Puerto Zea

Asesora:

Ligia Consuelo Sánchez Leal M.Sc.

BOGOTA D.C

2019-I

INTRODUCCION: LIGNINA



Biopolímero de mayor abundancia



Utilidad a nivel industrial



Estructura muy grande, difícil degradación

Presente en especies vegetales maderables y no maderables

Aporta la rigidez y el soporte para las plantas

Especies briofitas no son capaces de producir lignina

Principal contaminante en la producción de pulpa de celulosa



Angiospermas

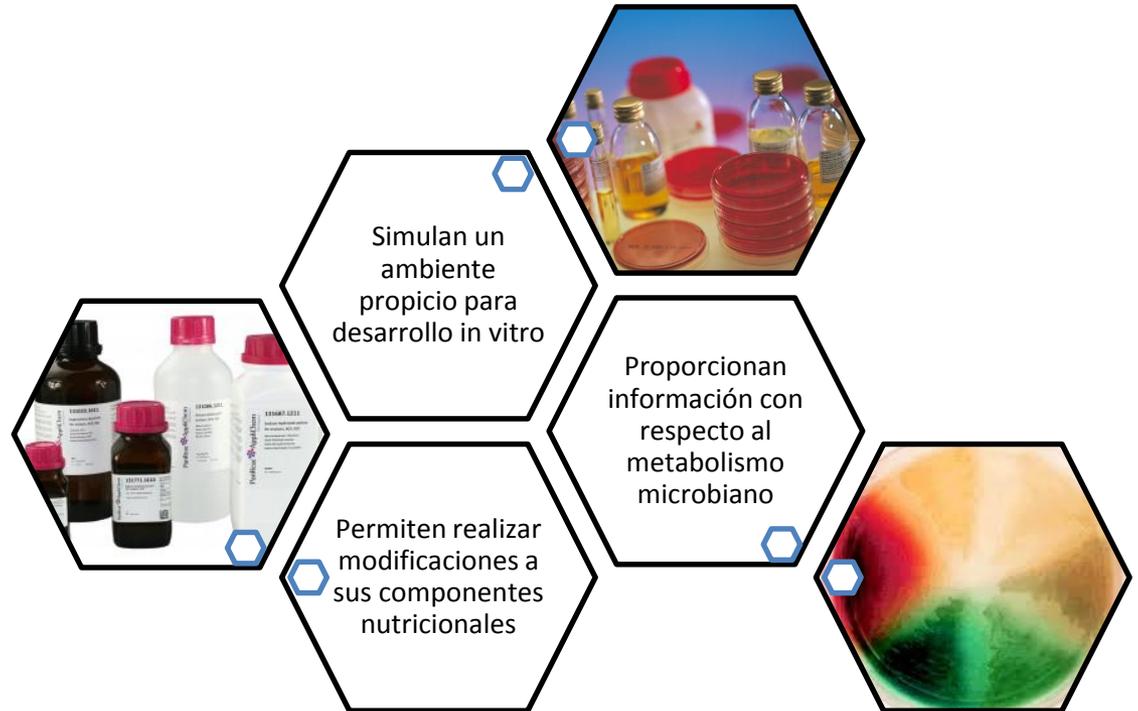
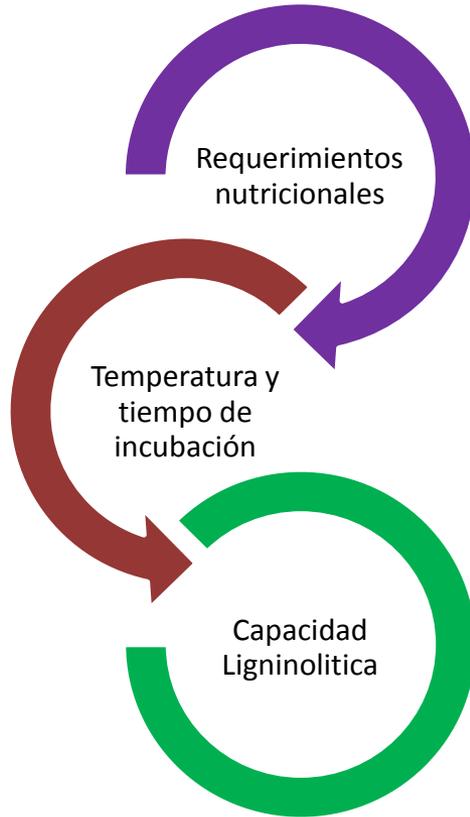
Maderas duras

Maderas blandas

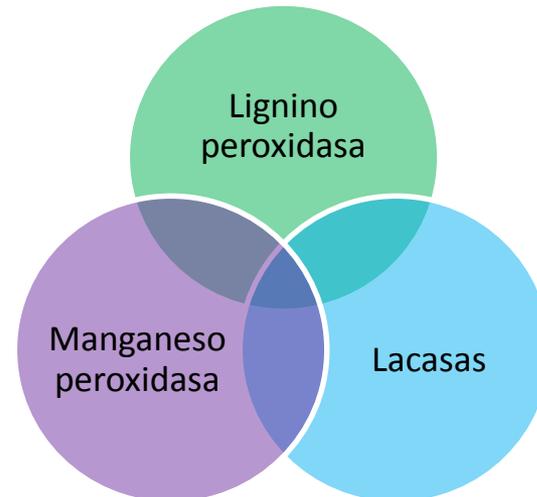


Gimnospermas

INTRODUCCION: MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO



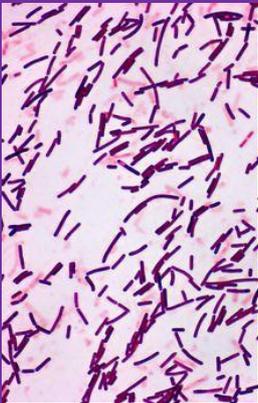
Enzimas ligninolíticas



INTRODUCCION: MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Bacillus subtilis

- Morfología bacilar
- Afinidad Gram Positiva



Serratia marcescens

- Morfología bacilar y cocobacilar
- Afinidad Gram Negativa



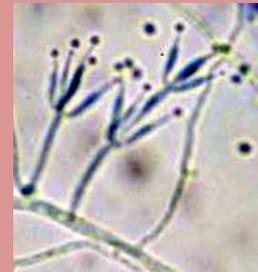
Penicillium commune

- Hongo filamentososo
- Hialino, septado, conidios ramificados que salen de las fialides



Paecilomyces formosus

- Ascomyceto
- Hialino, septado, similar al *Penicillium* sp., fialides mas largas



Pleurotus fossulatus

- Basidiomyceto
- Crecimiento mas lento
- Setas que crecen de modo lateral al tronco del árbol



INTRODUCCION: MATERIAL VEGETAL



PINO (*Pinus sp.*)

- Lignina: 24 – 28%
- pH: 4.0 – 4.4



GRANADILLO (*Dalbergia granadillo*)

- Lignina: 25.24 - 27-24%
- pH: Ligeramente alcalino



SAJO (*Camptosperma panamensis*)

- Presencia de flavonoides en su estructura
- Lignina: 24 – 28%

ANTECEDENTES

Thorn *et al*

- 1996
- Primer Agar Lignina

Abhay Raj *et al*

- 2007
- MSM con Lignina de Kraft

Arias E. Piñeros P.

- 2008
- Agar Czapeck

Tha Swe K.

- 2011
- Agar madera de abedul y agar salvado de trigo

Buitrago S. *et al*

- 2014
- Agar extracto de aserrín

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar un medio de cultivo a partir de componentes naturales ricos en lignina, utilizando aserrín de tres variedades vegetales maderables, con el fin de tener un sustrato con un contenido significativo de lignina, que permita a los microorganismos tanto de origen bacteriano como también fúngico, la utilización de enzimas degradadoras.

ESPECIFICOS

- 1)** Obtener lignina a partir de aserrín de tres variedades vegetales maderables para la elaboración del medio de cultivo
- 2)** Comprobar la actividad enzimática ligninolítica de algunos microorganismos bacterianos y fúngicos reportados con capacidad ligninolítica.
- 3)** Establecer un protocolo de la preparación del medio de cultivo a partir de las tres variedades vegetales seleccionadas.

METODOLOGIA

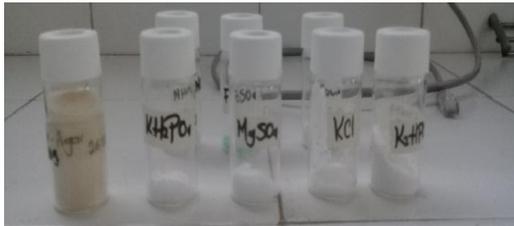
Selección material vegetal



Componentes nutricionales y cantidades



Extracción de la lignina



| SAL MINERAL | CANTIDAD |
|-----------------|-----------|
| $MgSO_4$ | 0,5 g/L |
| KCl | 0.5 g/L |
| K_2HPO_4 | 4,55 g/L |
| KH_2PO_4 | 0.53 g/L |
| NH_4NO_3 | 5 g/L |
| $FeSO_4(7H_2O)$ | 0.005 g/L |



Lignina tipo Kraft

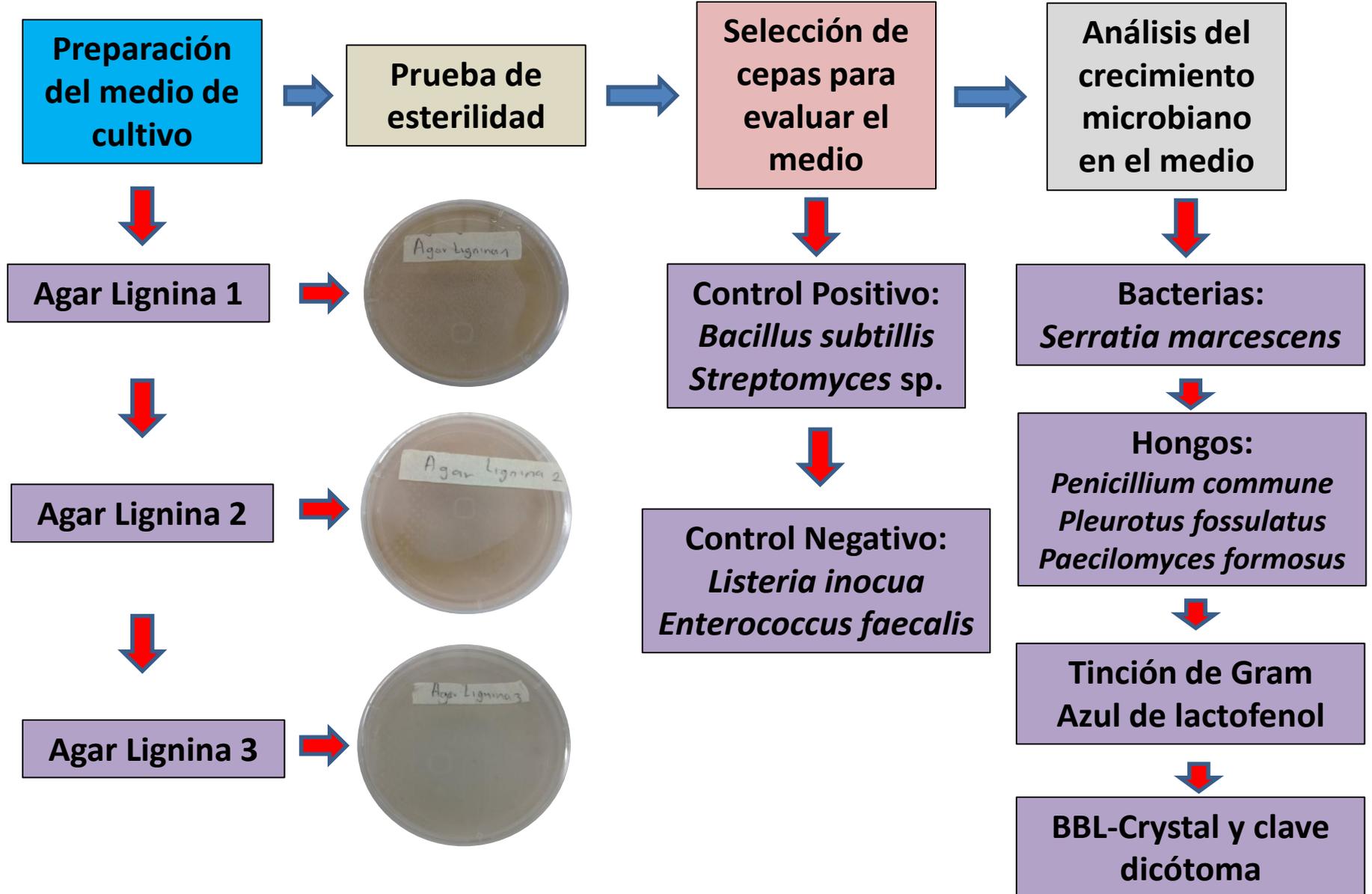


Lignina tipo sulfito



Lignina tipo soda

METODOLOGIA



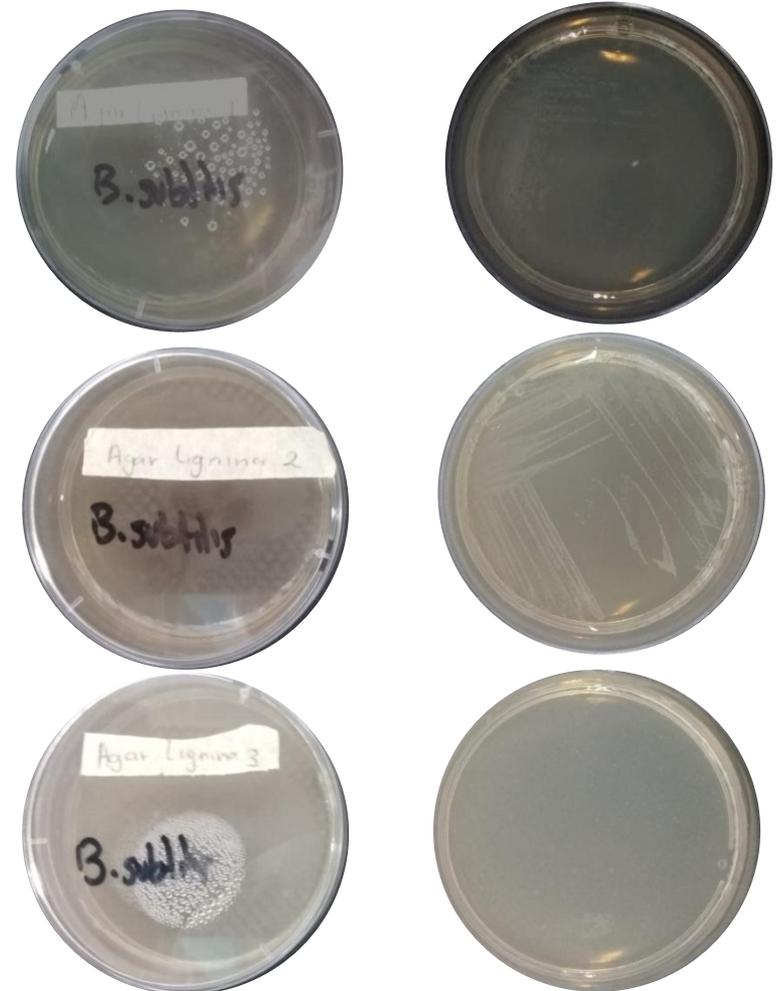
RESULTADOS Y DISCUSION: CONTROL POSITIVO

Streptomyces sp.



Thorn *et al* 1996

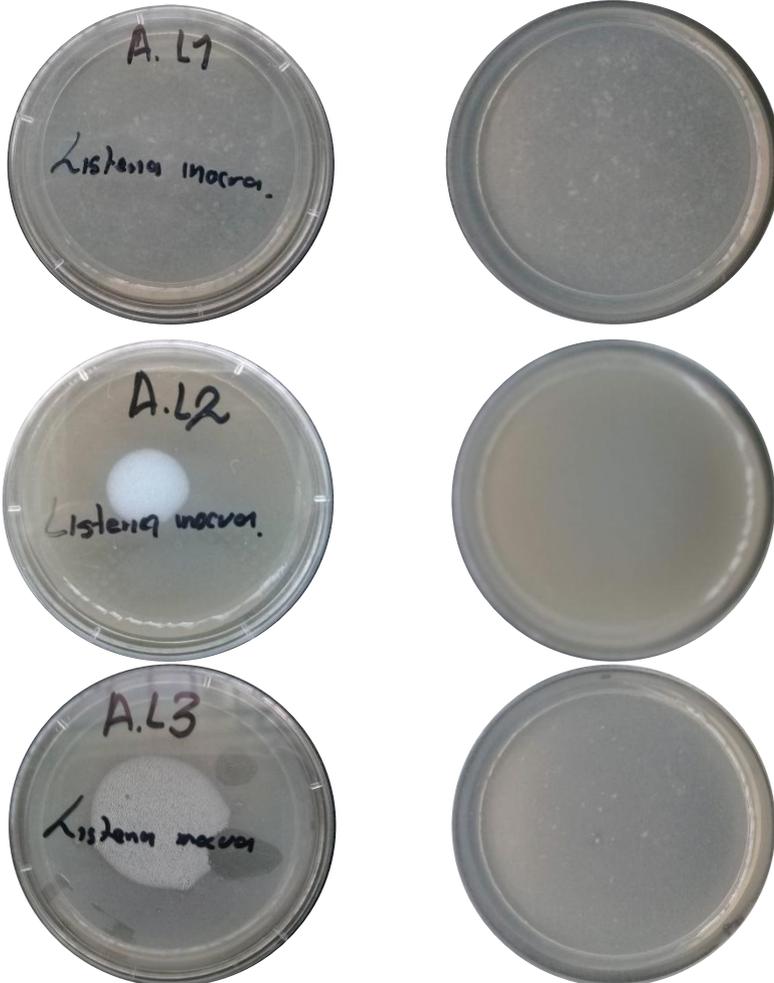
Bacillus subtilis



Abhay R. *et al* MSM 2007

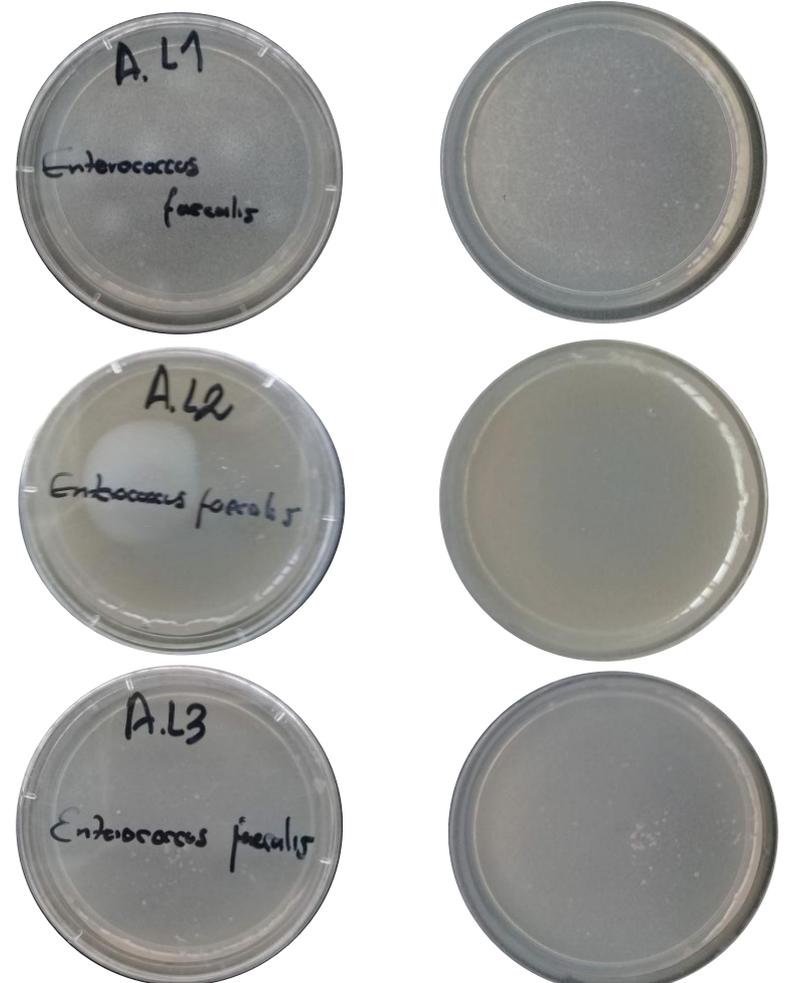
RESULTADOS Y DISCUSION: CONTROL NEGATIVO

Listeria innocua



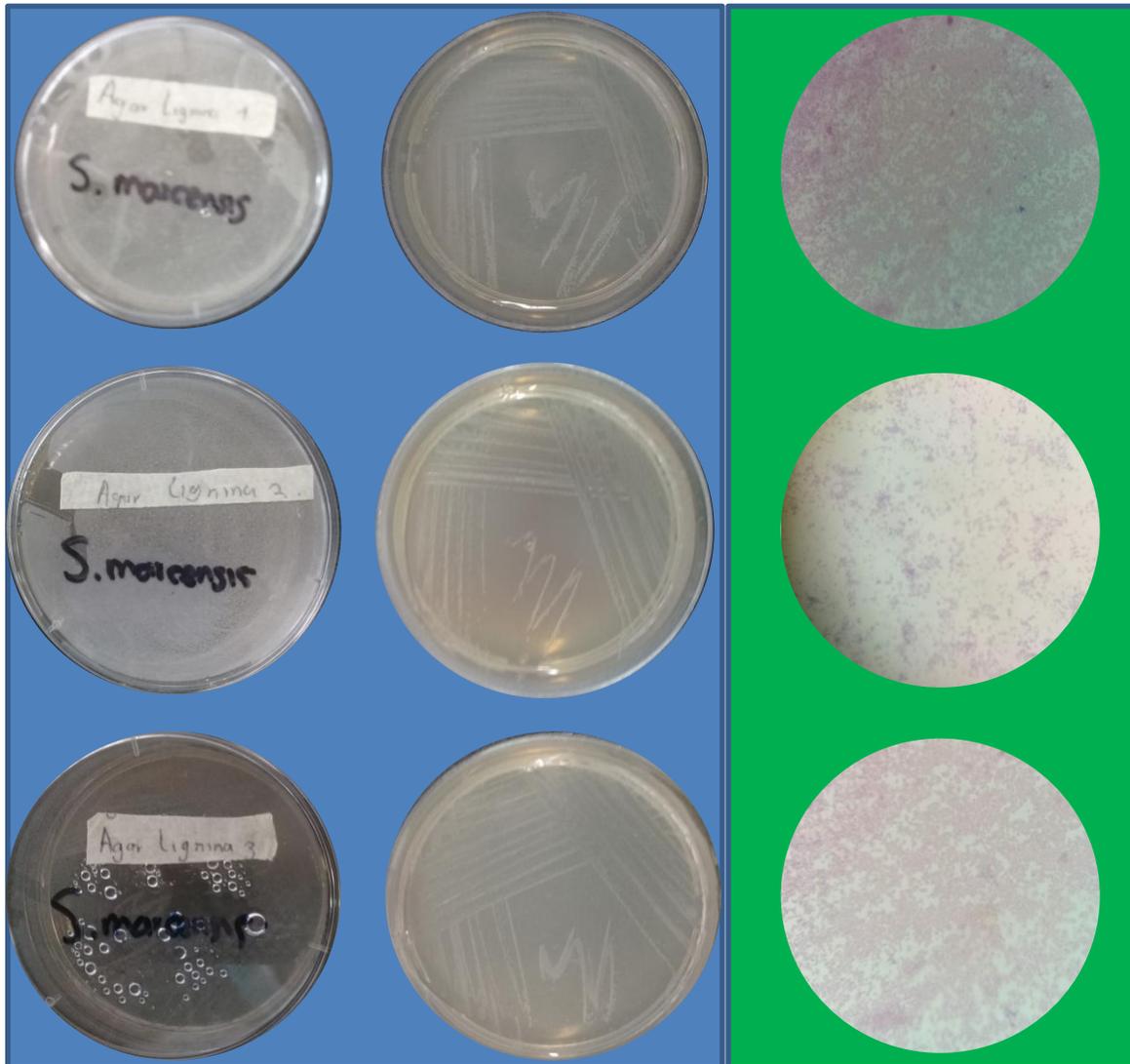
Tha Swe K. (Abedul) 2011

Enterococcus faecalis



Buitrago S. (Aserrin) 2014

RESULTADOS Y DISCUSION: *Serratia marcescens*



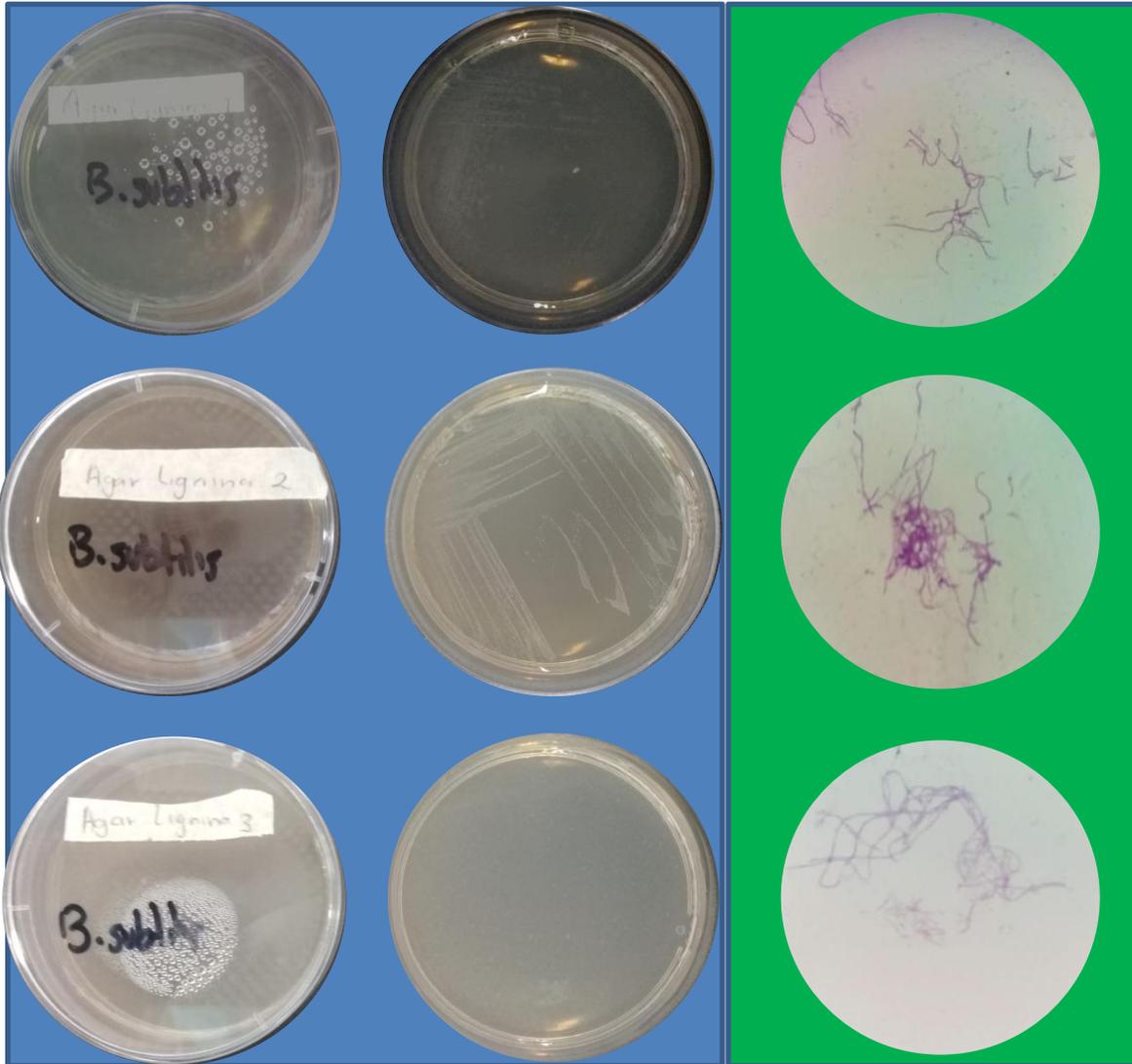
Mejor desarrollo en Agar L2
Granadillo: % cenizas: (0.62-
1.84%)
Pino: % cenizas:
(0.3%)
pH ligeramente alcalino



Perestelo F. *et al*
Produccion de enzimas

Verma P. y Madamwar D.
Degradación de lignina
marcada

RESULTADOS Y DISCUSION: *Bacillus subtilis*



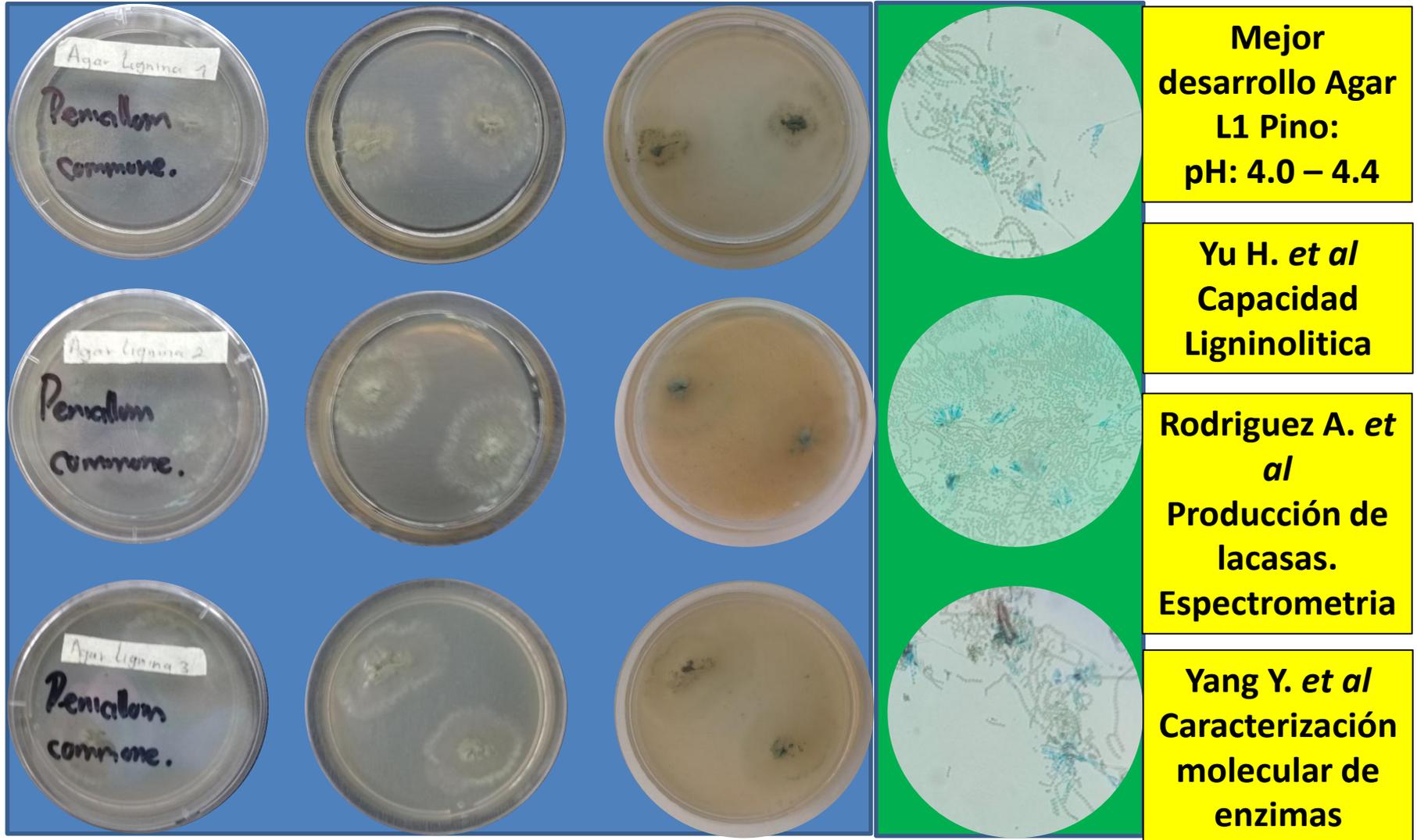
Mejor desarrollo en Agar L2

Weniger B. *et al*
Madera de Sajo con
Flavonoides antimicrobianos

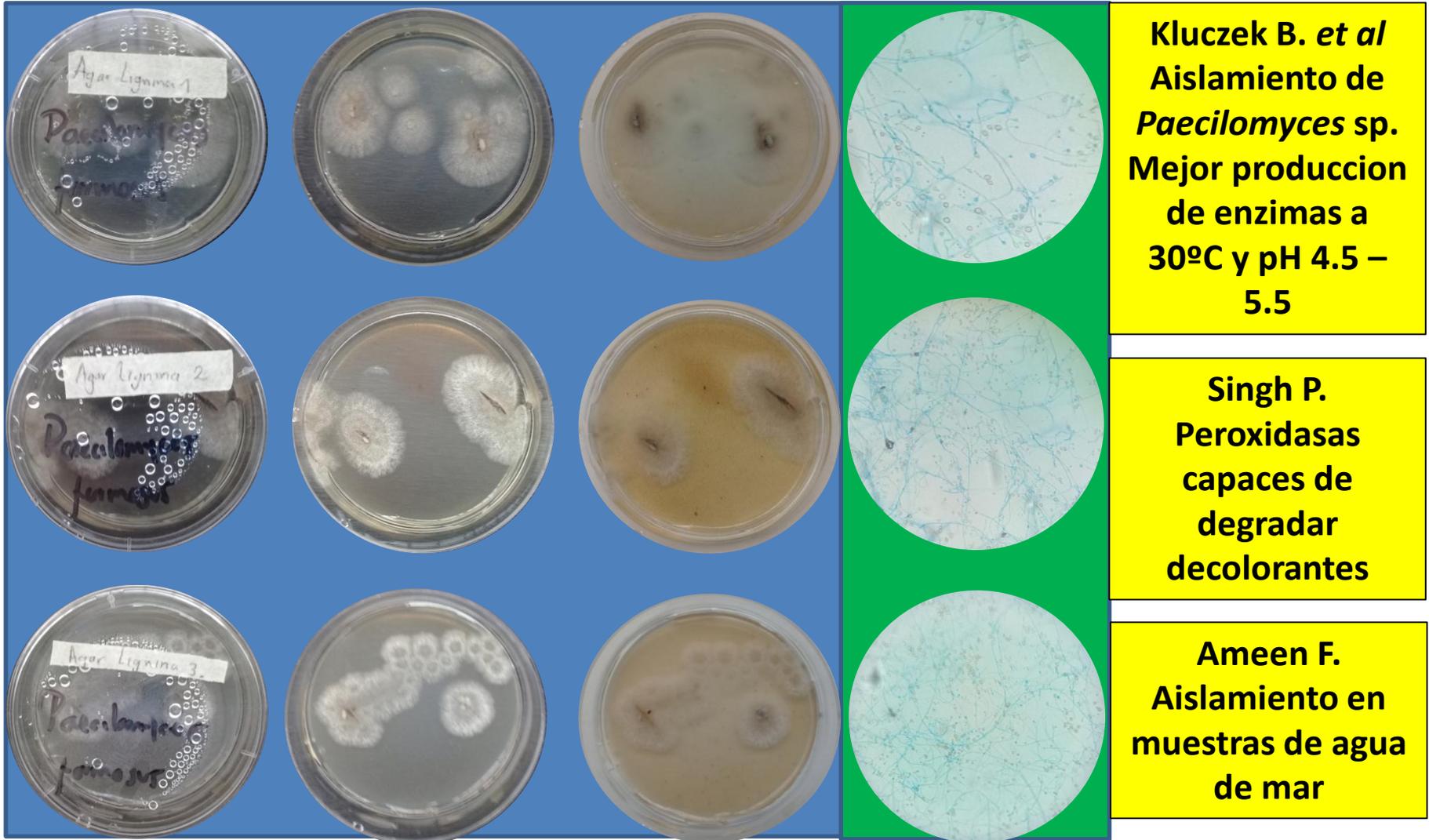
Hassan E. y Hanafy A.
Genero *Bacillus* sp.



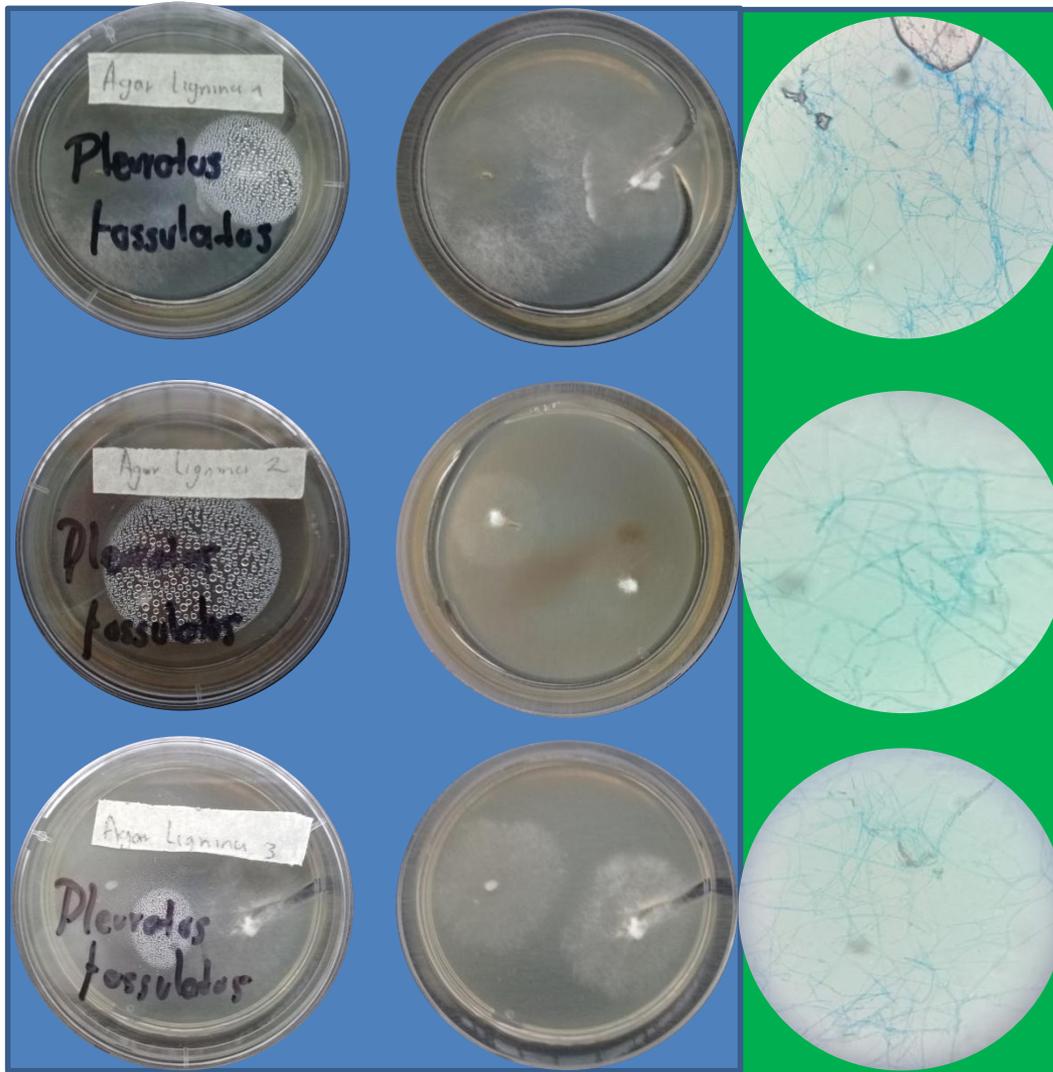
RESULTADOS Y DISCUSION: *Penicillium commune*



RESULTADOS Y DISCUSION: *Paecilomyces formosus*



RESULTADOS Y DISCUSION: *Pleurotus fossulatus*



Eggert C., Temp U. y Eriksson K. (1997)
Agar con Malta
Producción de Lacasas, Lignino Peroxidasas y manganeso peroxidasas

Das N. y Naskar S.
Arroz seco como sustrato para producción de enzimas

Salmones D. y Mata G.
Agar con extracto de malta, levadura y residuos de pulpeo de Kraft

CONCLUSIONES

Se obtuvo lignina a partir del aserrín de las tres variedades vegetales maderable seleccionadas, pino, granadillo y sajo. El granadillo fue el aserrín de donde se obtuvo una menor cantidad de líquido rico en lignina en comparación a la cantidad obtenida con las otras dos variedades.

Se comprobó la actividad enzimática ligninolítica de *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium commune*, *Paecilomyces formosus* y *Pleurotus fossulatos*

Se estableció un protocolo de preparación del medio de cultivo

Los microorganismos de origen bacteriano requieren para su desarrollo ambientes con pH ligeramente alcalino, maderas que tengan alto contenido en cenizas o que posean un pH alcalino como el Granadillo *Dalbergia granadillo* (Agar Lignina 2)

Los hongos por su parte tienden a preferir sustratos que tengan pH ligeramente ácidos, tal es el caso del pino (Agar Lignina 1)

La madera de Sajó *Camptosperma panamense* tiene la facultad de inhibir el crecimiento de la cepa de *Bacillus subtilis* (TB2) proveniente del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca esto puede ser por la presencia de flavonoides en su corteza.

REFERENCIAS

Fagerstedt k. Y kärkönen a. The plant cell wall. Revista journal of Integrative plant biology journal [internet]. 2015 [citado 17 abr 2017]; Volumen 57 (4): pp: 328-329. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jipb.12351/pdf>

Weng JK. Y Chapple C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. Revista New Phytologist tansley reviews [Internet]. 2010 [Citado 17 Abr 2017]; Volumen 187: pp: 273-285. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x/epdf>

Buitrago S., Sánchez E. Y Guerrero H. Aislamiento de microorganismos Amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. Revista SENNOVA [Internet]. 2014 [Citado el 18 Abr 2017]; Volumen 1(1): pp148-155. Disponible en: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/89/101>

Sasikumar V., Priya V., Shankar C. Y Sekar S. Isolation and Preliminary Screening of Lignin Degrading Microbes. Revista Journal of Academia and Industrial Research (JAIR) [Internet]. 2014 [Citado 20 Abr 2017]; Volumen 3(3): pp: 291-294. Disponible en: <http://jairjp.com/november%202014/10%20sasikumar.pdf>

Gao H., Wang Y., Zhang W., Wang W. Y Mu Z. Isolation, identification and Application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. Revista African Journal of Biotechnology [Internet]. 2011 [Citado 20 Abr 2017]; Volumen 10(20) pp: 4166-4174. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93601/83025>

Thorn G. Adinarayana C. Harris D. y Eldor P. Isolation of saprophytic basidiomicetes from soil. Revista Applied and Environmental Microbiology [internet] 1996 [citado el 28 Abr 2017] Volumen 62 (11): pp: 4288- 4292. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388993/pdf/hw4288.pdf>

Raj A., Reddy M., Chandra R., Purohit H. y Kapley A. Biodegradation of kraft-lignin by *Bacillus* sp. isolated from sludge of pulp and paper mill. Revista: Biodegradation [internet] 2007 [citado el 29 Abr de 2017] Volumen: 18 (6): pp: 783-792. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10532-007-9107-9>

Weniger B. *et al.* Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. Revista Phytomedicine. [Internet] 2006 [Citado el 29 Ago 2019]. Volumen: 13(3). pp: 176-180. Disponible en: <https://eurekamag.com/pdf/004/004408698.pdf>