

Obtención de microorganismos con potencial biotecnológico a partir de muestras ambientales y validación de su eficacia



Autor Jesús Salinas Nieto

Titulación Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Tutores María José López López
José Joaquín Moreno Casco

Departamento Biología y Geología

Universidad de Almería

Trabajo Fin de Máster

Almería, julio 2020



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Agradecimientos

Para empezar, me gustaría agradecer a Joaquín Moreno Casco y María José López López por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Almería y contar en todo momento con su total apoyo, confianza y dedicación. Es un honor el haber tenido la oportunidad de trabajar junto al grupo de investigación del laboratorio de Microbiología: Paqui, Juan y Macarena, quienes siempre han estado ahí cuando lo he necesitado, María José Estrella, siempre con buenos consejos y prácticas, Ana Toribio, quien nunca se cansó de darme buenas explicaciones sobre cualquier materia en la que esté trabajando, Ana Siles, compañera de viajes con quien me he rebotado en alpechín y M^a del Mar, quien siempre me ha tendido su mano en todas las tareas técnicas del laboratorio. A los estudiantes de Biotecnología y a Marta, por transmitir esa ilusión en el laboratorio con cada uno de sus ensayos y la ayuda prestada sobre mi trabajo. Quiero hacer mención especial a mi amiga María Rosa Martínez, experta en resolver brillantemente cualquiera de mis frecuentes dudas y quien, desde el primer día, ha mostrado una infinita paciencia y grandes cualidades como compañera de laboratorio. Muchas gracias por todo María.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi familia en general y en especial a mis padres, Jesús Salinas Carrión y María Nieves Nieto Sánchez-Pastor, y Prado Pérez Velasco, quienes con su esfuerzo han conseguido que haya llegado hasta aquí. Ellos han sido, desde siempre, mis referentes para todos los ámbitos de la vida, especialmente en el ámbito estudiantil y laboral. Gracias por creer en mí y guiarme en este duro camino que es la vida.

No quisiera dejar pasar la oportunidad de agradecer a mi novia Nuria y la familia López Dieste en general, por su apoyo mostrado durante este pedregoso año, facilitándome el camino y mostrándose siempre positivos y alentadores ante los peores días. No puedo dejar de agradecer al pequeño Lucas, con su alegría inocente ha hecho más llevaderos los días más pesados

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer infinitamente a mi perra Noa, por ser la mejor compañera de vida que he podido tener durante los últimos 8 años y esperarme en casa con la felicidad que le caracteriza.

Parte de los microorganismos utilizados en este trabajo fueron aislados en el contexto de los proyectos LifeRegrow y AGL2015-64512-R.



Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331) “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using biorecovering strategies in a circular economy”



Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Proyecto AGL2015-64512-R.

Indice

Resumen.....	2
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Microorganismos de interés biotecnológico	3
1.2. Microorganismos de interés en biorremediación	8
1.3. Fuentes y estrategias para el aislamiento de microorganismos.....	10
2. Justificación y objetivos.....	13
3. Material y métodos	14
3.1. Colección de cepas: aislamiento y mantenimiento	14
3.2. Análisis de la expresión de actividades enzimáticas.....	16
3.3. Cuantificación de la producción de enzimas	23
3.4. Cuantificación de la actividad degradativa de compuestos recalcitrantes.....	24
3.5. Identificación de cepas	26
3.6. Análisis de datos	27
4. Resultados y discusión.....	27
4.1. Comparación de las actividades de la colección según entorno de origen	28
4.2. Selección e identificación de cepas en función de sus capacidades enzimáticas.....	30
4.3. Microorganismos de interés biotecnológico: producción de enzimas	32
4.4. Microorganismos de interés en biorremediación: degradación del tirosol	34
5. Conclusiones.....	35
6. Bibliografía.....	36

Resumen

Aunque existe un gran avance en el elenco de microorganismos actualmente disponibles para distintas aplicaciones biotecnológicas, la gran diversidad de usos y requerimientos para estos microorganismos y sus productos, hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos candidatos. En este trabajo se aborda la búsqueda y selección de microorganismos capaces producir enzimas útiles en diversos sectores, y de degradar compuestos recalcitrantes, que serán de interés para biorremediación. Se emplearon 30 cepas fúngicas y bacterianas aisladas de tres ambientes, incluyendo suelo rizosférico, sedimentos de alpechín y material sometido a compostaje. En la colección de microorganismos se rastrearon las actividades amilasa, pectinasa, celulasa, xilanasa, proteasa y ligninasa y enzimas relacionadas, al objeto de discriminar las cepas con mayor potencial para la producción de enzimas o para aplicaciones de biorremediación. Los resultados mostraron que las cepas del compost presentaron los mayores niveles de enzimas, mientras que las correspondientes a sedimentos de alpechín mostraron actividades de interés en biorremediación. La cepa con mayor rango de actividades enzimáticas fue *Fusarium delphinoides* HC 4993, ya que produjo lipasa, proteasa, pectinasa, xilanasa y celulasa. Además, la bacteria *Bacillus smithii* BC 1958, produjo niveles elevados de amilasa y proteasa, y el actinomiceto *Streptomyces albus* AC 2815, de proteasa. Por su parte, los hongos *Scedosporium apiospermum* HSA 16, *Cosmospora viridescens* HSA 21 y *Aspergillus protuberus* HSA 6 y dos cepas del actinomiceto *Streptomyces koyangensis*, ASA 3 y ASA 4, fueron capaces de eliminar el polifenol recalcitrante tirosol, por lo que resultan idóneos para su uso en biorremediación. Este trabajo aporta nuevas herramientas para el sector biotecnológico en general y, de forma específica, para operaciones de biorremediación.

Palabras clave: Carbohidrasas, lipasa, proteasa, ligninasas

Abstract

There is a great advance in the microorganisms currently available for biotechnological applications. However, the great diversity of uses and requirements for these microorganisms and their products makes it necessary to continue searching for new candidates. This work deals with the search and selection of microorganisms capable of producing enzymes useful for various sectors, and of degrading recalcitrant compounds, which will be of interest for bioremediation. Thirty fungal and bacterial strains isolated from three environments were used, including rhizospheric soil, alpechin sediments, and composted material. The amylase, pectinase, cellulase, xylanase, protease, and ligninase activities as well as related enzymes were tracked in the collection of microorganisms, in order to discriminate the strains with the greatest potential for enzyme production or bioremediation applications. The results concluded that the compost strains presented the highest levels of enzymes, while those corresponding to alpechin sediments showed activities of interest in bioremediation. The strain with the highest range of enzymatic activities was *Fusarium delphinoides* HC 4993, since it produced lipase, protease, pectinase, xylanase, and cellulase. Furthermore, the bacterium *Bacillus smithii* BC 1958 produced high levels of amylase and protease, and the actinomycete *Streptomyces albus* AC 2815, of protease. On the other hand, the fungi *Scedosporium apiospermum* HSA 16, *Cosmospora viridescens* HSA 21, and *Aspergillus protuberus* HSA 6 and two strains of the actinomycete *Streptomyces koyangensis*, ASA 3 and ASA 4, were able to eliminate the recalcitrant polyphenol tyrosol, making them suitable for use in bioremediation. This work provides new tools for the biotechnology sector in general and, specifically, for bioremediation operations.

Keywords: Carbohydases, lipase, protease, ligninases

1. Introducción

Desde la Prehistoria se han empleado procesos biotecnológicos para aspectos tales como la conservación de alimentos, la fermentación necesaria para elaborar pan y vino o la domesticación en ganadería. El primero en emplear el término Biotecnología fue el ingeniero húngaro Karl Ereky en 1919, haciendo referencia a las técnicas utilizadas para la producción de leche y derivados en grandes granjas. La Biotecnología moderna se inicia a final de la década de los 70 y se define como una ciencia multidisciplinar en la que se utilizan organismos vivos o sus productos en beneficio del ser humano para resolver un problema (Thieman y Palladino 2010). Por tanto, los microorganismos de interés biotecnológico, son aquellos capaces producir efectos o de generar compuestos útiles. En esta categoría se encuentran múltiples microorganismos, desde los que están implicados en procesos fermentativos, a los productores de enzimas, los probióticos, los promotores del crecimiento vegetal, o los que permiten biodescontaminar o biorremediar un determinado entorno, por citar algunos ejemplos. Estos microorganismos y sus productos tienen numerosas aplicaciones en industrias tan dispares como la agroalimentaria, la química, la papelera o la farmacéutica entre otras. El uso de la biotecnología para la producción de compuestos orgánicos de utilidad obtenidos a partir de microorganismos, plantas o células animales constituye una alternativa a los procesos industriales y agroalimentarios, en los que se utilizan materias primas con elevada toxicidad y persistencia en el medio ambiente. Además, permiten una mejor optimización de los procesos y una reducción de costes (Pessôa et al., 2017).

Aunque el concepto de microorganismos de interés biotecnológico abarca a todos aquellos que pueden tener algún tipo de aplicación o ejercer algún beneficio, ya sea industrial o ambiental, incluyendo actividad en biorremediación, en este trabajo dicho término se aplica principalmente a microorganismos productores de enzimas, mientras que se reserva el concepto de microorganismos de interés en biorremediación a aquellos capaces de degradar compuestos recalcitrantes o contaminantes. En los siguientes apartados se describen algunas de las actividades de ambos grupos de microorganismos, y finalmente se abordan algunos aspectos relativos a las estrategias para la obtención y aislamiento de microorganismos a partir de diversas fuentes.

1.1. Microorganismos de interés biotecnológico

A partir de la década de los 60 las enzimas microbianas comenzaron a tener una mayor importancia respecto de las producidas a partir de fuentes vegetales o animales. El descubrimiento y avance de las técnicas de ingeniería genética y biología molecular permitió la obtención de organismos más eficaces. Así, Cohen y Boyer (1973) obtuvieron el primer microorganismo recombinante, lo que fomentó el estudio de hongos filamentosos, levaduras y bacterias como fuentes excepcionales para la obtención de enzimas. Algunas de las ventajas que presentan los microorganismos frente a otras fuentes de enzimas son su metabolismo vigoroso, su fácil manipulación y propagación a gran escala, su elevada versatilidad y sus requerimientos nutricionales generalmente simples (Saini et al., 2017). Adicionalmente, las enzimas

microbianas presentan una mayor estabilidad (Tanyildizi et al., 2007). Todas estas ventajas han hecho que las enzimas microbianas sean más utilizadas en industria frente a las de animales o vegetales.

Las enzimas son más eficientes frente a otros catalizadores naturales o sintéticos que se podrían utilizar en procesos industriales, ya que presentan una elevada especificidad de sustrato, permitiendo distinguir entre diferentes regiones de las moléculas (regioespecificidad) e incluso entre isómeros de la misma molécula (estereoespecificidad). Además, son capaces de trabajar en condiciones de reacción suaves (temperatura, pH, presión, etc.), por lo que el gasto energético y de equipamiento suele ser menor respecto a los catalizadores químicos. Otra característica que hace a las enzimas una alternativa más atractiva es que no son alteradas tras su actividad pudiendo ser reutilizadas en la mayoría de casos. Además, son amigables con el medio ambiente ya que permiten que los procesos sean más limpios. Todas estas propiedades se traducen en un abaratamiento de los costes de producción. Algunas de las enzimas más utilizadas, consecuencia de su elevado rango de aplicaciones en diferentes industrias son las carbohidrasas, las lipasas, las proteasas y las ligninasas.

Las **carbohidrasas** son un grupo de enzimas implicadas en su mayoría en la hidrólisis de polisacáridos y oligosacáridos. Entre ellas destacan las amilasas, las celulasas, las xilanasas y las pectinasas, cuyas principales características se describen a continuación.

El **almidón** es producido por plantas como reserva energética y se considera la tercera fuente de biomasa en la tierra después de la lignocelulosa y la quitina (Choubane et al., 2015). Es un homopolisacárido formado por unidades de glucosa, y está constituido por dos fracciones diferenciadas, la amilosa, polisacárido no ramificado en el que las unidades de glucosa están unidas por enlaces α -1,4-glucosídicos, presenta un gran número de residuos y es soluble en agua a 70 – 80 °C; y la amilopectina, polímero ramificado en el que las glucosas están unidas por enlaces α -1,4 y α -1,6, y es insoluble. Las enzimas encargadas de hidrolizar estos enlaces son las **amilasas**. Estas enzimas extracelulares catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 en el almidón para dar lugar a dextrinas y otros oligosacáridos de glucosa (Ryan et al., 2006). De acuerdo con la posición del enlace en el que produce la hidrólisis, se pueden diferenciar tres grupos de amilasas: α -amilasas, actúan en la cadena de almidón de forma aleatoria sobre enlaces α -1,4 de amilosa y amilopectina, pero no hidrolizan enlaces α -1,6, dan como producto dextrinas; β -amilasas, hidrolizan enlaces α -1,4 de forma exclusiva a partir del extremo reductor, produciendo unidades de maltosas; y γ -amilasas, que, además de romper el último enlace α -1,4 en el extremo no reductor de amilosa y amilopectina, liberando glucosa, puede romper los enlaces α -1, 6 (Sankari et al., 2014). Estas enzimas tienen numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, por ejemplo, se emplean en la industria panadera para aumentar los azúcares fermentables y, con ello el volumen de la hogaza. También tienen aplicaciones en las industrias textil y papelera, en la producción de detergentes y en la industria farmacéutica (Mageswari et al., 2012).

Las **pectinas** forman parte de la pared celular primaria de las plantas superiores (Yayani et al., 2005). Son heteropolisacáridos muy ramificados constituidos principalmente por residuos de ácido D-galacturónico unidos por un enlace $\alpha(1 \rightarrow 4)$ al que se unen también azúcares como L-ramnosa, L-

arabinosa o D-galactosa y ácidos urónicos como el arabinogalactano. Las pectinas tienen una importante aplicación que se basa en su capacidad de formar geles, cualidad por la cual se emplean en la producción de gelatinas en la industria alimentaria o para la producción de bioplásticos (Samanta, 2019). Las enzimas capaces de romper alguno de los múltiples enlaces de las pectinas se denominan **pectinasas**, que son un complejo enzimático (Yayani et al., 2005). Las pectinasas, junto con las celulasas y las xilanasas, pueden lograr una hidrólisis completa de la pared liberando el zumo celular, proceso conocido como licuefacción. Este proceso se aplica para la preparación de zumos de frutas que son difíciles de filtrar tales como mango, plátano o guayaba.

Las xilanasas y las celulasas son complejos enzimáticos incluidos en el grupo de las enzimas lignocelulolíticas que han cobrado una especial importancia y auge debido a su alta aplicabilidad en diferentes industrias como la papelera y sobre todo en biorrefinería (MacCabe et al., 2002). Las **xilanasas** forman un complejo enzimático encargado de la hidrólisis del **xilano**, polisacárido compuesto por una cadena lineal de residuos de xilosa con numerosas ramificaciones, siendo el principal componente de la hemicelulosa. Una de las principales enzimas encargadas en el proceso de hidrólisis del xilano son la endo-1,4- β xilanasas, encargada de romper los enlaces glucosídicos de la cadena lineal produciendo oligómeros de β -D xilopiranosil. La siguiente enzima encargada de romper la matriz de la hemicelulosa es la β -xilosidasa, encargada de hidrolizar xilobiosa y xilano-oligosacáridos (Polizeli et al., 2005). Estas enzimas se han utilizado para mejorar la digestibilidad de los piensos para aves con altos contenidos en cereales (Gracia et al., 2003). El complejo enzimático **celulasa** se encarga de hidrolizar la **celulosa**, homopolisacárido compuesto de glucosa presente en la biomasa vegetal que constituye el biopolímero con mayor presencia en la naturaleza. Dicho complejo está constituido por cuatro enzimas: endo β -glucanasa, hidroliza la celulosa a glucooligosacáridos; exo β -glucanasa, encargada de liberar el monosacárido glucosa de la celulosa; celobiohidrolasa, actúa en regiones externas de celulosa liberando unidades de celobiosa (disacárido formado por dos glucosas); y la β -glucosidasa que es una exocelulasa que actúa sobre los enlaces β (1-4) encargados de unir dos moléculas de glucosa (Szijártó et al., 2004).

Las **ligninasas** son un grupo de enzimas capaces de degradar la lignina, el tercer componente del macropolímero lignocelulosa presente en la biomasa vegetal (Figura 1). La lignina es un polímero de naturaleza aromática cuyos monómeros constituyentes son derivados del fenil propano, principalmente, los ácidos coniferílico, sinapílico y cumarílico, que se unen entre sí mediante enlaces de diversos tipos dando lugar a una estructura muy compleja y de muy baja biodegradabilidad, es decir, muy recalcitrante. Las principales enzimas microbianas implicadas en la hidrólisis de la lignina son lacasas, lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, tirosinasas y polifenoloxidasas (Gunial et al., 2020). Debido a la complejidad estructural de la lignina, solo algunos microorganismos tienen capacidad enzimática para degradarla, generalmente hongos (Buswell y Odier, 1987). Algunos de los más destacados por la producción de este tipo de enzimas presentan también capacidad para eliminar compuestos tóxicos en procesos de biorremediación en suelos. Los microorganismos con dicha actividad están enmarcados en el grupo de los basidiomicetos, tales como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete*

chryso sporium, *Tyromyces palustris*, *Gloeophyllum trabeum* (Cameron et al., 2000; Rabinovich et al., 2004), ascomicetos como *Aspergillus* y zigomicetos como *Rhizopus* y *Amylomyces* (Jolivet et al., 1998; Nagarathama y Bajpai, 1999). La actividad ligninolítica está relacionada con la capacidad para la degradación de compuestos recalcitrantes, tales como diversos contaminantes orgánicos ambientales, y es por ello que se les atribuye una capacidad biorremediadora. Estos microorganismos y sus enzimas también se emplean en numerosas industrias, destacando la papelera y textil, producción de piensos y de bioplásticos (Couto y Toca-Herrera 2006; Maciel y Ribeiro, 2010).

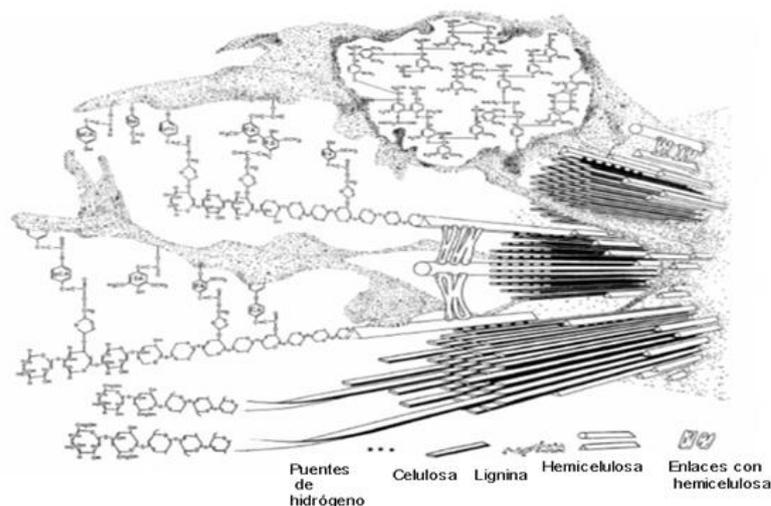


Figura 1. Estructura de la lignocelulosa (Bidlack et al., 1992).

Las **proteínas** son el grupo de moléculas orgánicas más abundantes en los seres vivos. Las **proteasas** hidrolizan enlaces peptídicos liberando aminoácidos y péptidos. Dichas enzimas constituyen uno de los grupos enzimáticos más importantes de la industria, encontrando aplicaciones en la fabricación de detergentes, procesado de alimentos, tratamiento de pieles y seda o elaboración de cervezas (Razzaq et al., 2019).

Los **lípidos** son un grupo de moléculas orgánicas ampliamente distribuidas en la biomasa, constituidas por cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas solubles en disolventes orgánicos y que cumplen diversas funciones en los organismos vivos tales como reserva energética (ácidos grasos y triacilglicéridos), estructural (fosfolípidos de la bicapa lipídica que compone las membranas celulares) o reguladoras como las hormonas esteroideas. Las enzimas lipolíticas o **lipasas** catalizan la hidrólisis de los enlaces tipo éster de los lípidos y se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales (Ruiz et al., 2007). Las lipasas tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas en distintas industrias como la alimentaria o química. Entre otras se emplean para la producción de grasas con propiedades físicas y químicas específicas, producción de aditivos alimentarios, mejora de propiedades de lácteos o pan, síntesis de ésteres con actividad antioxidante, fabricación de detergentes, tratamiento de aguas residuales o purificación en la industria de cosmética y farmacéutica (Kirana et al., 2016).

En la Tabla 1 se indican algunas especies microbianas productoras de las enzimas previamente descritas, así como las muestras a partir de las que fueron aisladas.

Tabla 1. Especies aisladas de diferentes ambientes con actividades enzimáticas de interés biotecnológico e industrial.

Enzimas		Especie	Ambientes de aislamiento	Referencia
Carbohidrasas	Pectinasa	<i>Aspergillus niger sp</i>	Frutos vegetales	Yayani et al., 2005
	Xilanasas	<i>Penicillium corylophilum, Aspergillus terreus y Streptomyces sp</i>	Alimentos en descomposición y suelo	Cortez, 2015
	Celulasa	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Restos vegetales	Diaz et al., 2014
	Amilasa	<i>Aspergillus niger y Nacardiopsis sp</i>	Suelo contaminado y sedimentos marinos	Vardhini et al., 2013; Chakraborty et al., 2014
Lipasa	Lipasa	<i>Pseudomonas sp, Aspergillus sp, Geotrichum sp y Rhizopus sp</i>	Residuos de aceites vegetales	Ertugrul et al., 2007
Proteasa	Proteasa	<i>Bacillus sp. y Bacillus stearothermophilus</i>	Compost y sedimentos de fuentes termales	Haki y Rakshit, 2003
Ligninasa	Ligninasa	<i>Caribena versicolor, Ganoderma lucidum y Schizophyllum commune</i>	Madera en descomposición	Arora et al., 2002; Litthauer et al., 2007
	Lacasas	<i>Pleurotus ostreatus y Trametes pubescens</i>	Restos vegetales	Berdugo, 2014
	Peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium y Caribena versicolor</i>	Madera en descomposición	Higuchi, 1993
	Tirosinasa	<i>Trichothecium roseum, Neurospora crassa y Bacillus thuringiensis</i>	Restos vegetales	Li et al., 2004; Seo, 2003
	Polifenoloxidasas	<i>Pleurotus ostreatus, Trametes pubescens y Gloeophyllum trabeum</i>	Restos vegetales	Cameron et al., 2000

1.2. Microorganismos de interés en biorremediación

A lo largo de la historia, numerosos contaminantes de origen natural o sintetizados por el hombre (xenobióticos) han sido liberados al medio ambiente provocando graves problemas. La biorremediación es un proceso que utiliza el potencial metabólico de animales, plantas y microorganismos, con capacidad biotransformadora para reducir la concentración y toxicidad de contaminantes (Valdes, 2012). La efectividad de esta técnica es evaluable según la erradicación del contaminante, sin embargo, hay que tener en cuenta que algunos productos del metabolismo de estos compuestos pueden presentar características más tóxicas que el compuesto de partida (Ganey y Boyd, 2004). La acción de los microorganismos sobre los agentes contaminantes da lugar a cambios menores de las moléculas orgánicas, fragmentación o una mineralización completa. Por tanto, los microorganismos de interés en biorremediación serán aquellos que, mediante su metabolismo, sean capaces de reducir la concentración de estos compuestos hasta umbrales no tóxicos de forma que eliminen la contaminación (Glazer y Nikaido, 2007). Los lugares contaminados presentan una amplia variedad de microorganismos indígenas que suelen ser los más indicados para llevar a cabo el proceso de biorremediación.

Los compuestos xenobióticos producidos en las actividades industriales tienen cada vez una mayor presencia en la naturaleza, diversidad y características recalcitrantes (García y Peralta, 2008). Están compuestos en su mayoría por cadenas alquílicas, anillos aromáticos o halógenos entre otros, lo que les confiere un carácter lipofílico. La mayoría de xenobióticos se emplean como herbicidas o pesticidas. Muchos de ellos producen daños directos en seres vivos, ya que tienden a acumularse en el tejido adiposo aumentando el riesgo de toxicidad, y su eliminación requiere de una biotransformación en metabolitos más solubles en agua (Waliszewski et al., 2008). Algunos de estos compuestos sintéticos presentan estructuras parecidas a compuestos orgánicos producidos en la naturaleza y pueden entrar a formar parte de los ciclos biogeoquímicos, pero otros con estructuras muy diferentes son de difícil biodegradación y tienden a acumularse en el medio ambiente. Al ser compuestos sintéticos, generalmente presentan cierta dificultad para ser biodegradados, aunque algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para ello (Finley et al., 2010). Un microorganismo con gran aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados por xenobióticos es *Pleurotus ostreatus*, hongo de la podredumbre blanca de la madera, capaz de degradar compuestos xenobióticos y recalcitrantes debido a que produce un gran abanico enzimático no específico que puede catalizar la oxidación de numerosos compuestos orgánicos. Una alternativa para abordar estos procesos de una forma más eficaz, es la utilización de consorcios microbianos para repartir la producción enzimática y abarcar todas las rutas de degradación requeridas (Singh et al., 2008). Algunos de los contaminantes de mayor impacto actual son los herbicidas e insecticidas y los plásticos derivados del petróleo.

Uno de los xenobióticos con mayor impacto ambiental y que fue empleado desde 1948 hasta 1972 para el control de la malaria, la fiebre amarilla, el tifus y otras enfermedades causadas por insectos vectores, es el pesticida 1,1,1-tricloro-2,2'-bis(p-clorofenil)etano (DDT). El DDT es un compuesto orgánico

clorado con efecto pesticida de amplio espectro que ha sido utilizado desde la segunda guerra mundial (Beard 2006). En su estructura molecular presenta anillos aromáticos que le confieren una gran toxicidad y estabilidad química, por lo que son altamente resistentes a la biodegradación (Corona-Cruz et al., 1999). Este pesticida provocó intoxicaciones, casos de mutagenicidad, alteraciones en el sistema inmune y tuvo un gran impacto por contaminación del ambiente provocada por su alta persistencia y bioacumulación (Walker et al., 2003), por lo que la OMS desaprobó su uso en espacios abiertos en 1971 y fue prohibido en muchos países (Franco 1985), además, los vientos transportan este pesticida a través de la atmósfera, llegando la contaminación hasta puntos tan recónditos como las regiones polares (Semeena et al., 2006). El DDT puede ser degradado tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Se sugirieron varias vías metabólicas (Quensen et al., 1998; Hay et al., 1998) donde actúan enzimas como deshidroclorinasas, dioxigenasas, deshalogenasas o hidrolasas. Algunos de los microorganismos estudiados con mayor éxito en la biodegradación del DDT en suelos son *Eubacterium limosum*, *Alcaligenes eutrophus*, *Boletus edulis*, *Fusarium solani* y *Phanerochaete chrysosporium* (Li et al., 2010). Las especies más eficaces en la degradación aerobia son *Alcaligenes eutrophus*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus varians* o *Lactobacillus plantarum*, que mediante la rotura del anillo en posición *meta*, dan lugar a ácido clorobenzoico (Ninnekar y Kamanavalli, 2004). *Phanerochaete chrysosporium* ha sido estudiado como una especie capaz de mineralizar el DDT dando lugar a diclorodifenildicloroetano (Domínguez et al., 2010).

Otro xenobiótico que resalta por su alta persistencia en el medio es el glifosato, un herbicida no selectivo utilizado en gran parte del mundo que puede acumularse en el medio ambiente gracias a su capacidad para adherirse a partículas del suelo en forma biodisponible y permanecer durante años (Medio Ambiente 2009). Algunos microorganismos como *Bacillus thuringiensis* cumplen una doble funcionalidad frente a esta problemática, produce toxinas con actividad insecticida, por lo que se utiliza como biopesticida, y adicionalmente tiene capacidad de degradar pesticidas, especialmente el glifosato (Accinelli et al., 2004).

Los carbamatos son otros compuestos empleados como insecticidas, derivan del ácido carbámico. Algunos de los efectos provocados por este insecticida, incluso aplicándolo en las cantidades recomendadas debido a su persistencia en el suelo, son la reducción y debilitamientos de la planta (Gafar, 2011). Algunos autores como Schuster y Schmoll, (2010) emplearon microorganismos autóctonos de la rizosfera de la planta para la degradación de dichos compuestos, por su demostrada adaptabilidad. Algunos de los microorganismos estudiados para la degradación de este xenobiótico es *Phenylobacterium sp.*, que tiene capacidad para degradar pesticidas de la familia de los carbamatos en suelos agrícolas, o *Trichoderma harzianum*, hongo filamentoso con demostradas ventajas en la agricultura debido a su potencial enzimático (Vallejo, 2014)

Los plásticos son moléculas poliméricas de origen antrópico producidos a partir de derivados del petróleo y empleados a escala global gracias a sus propiedades físicas o químicas como fuerza, durabilidad, ligereza, resistencia y bajo coste (Shah et al. 2008). Con el paso del tiempo, grandes cantidades de plásticos han sido introducidos en todos los ecosistemas del planeta, y dada su difícil

degradación, ya suponen uno de los primeros problemas mundiales en cuanto a contaminación ambiental (Emadian et al., 2016). Uno de los plásticos más utilizados en el mundo es el polietileno (PE), presentando diversas aplicaciones en prácticas agrícolas, destacando su empleo para la fabricación de invernaderos (Llop, 2011). Uno de los campos actuales más prometedores en relación con la problemática ambiental causada por estos compuestos es el incremento de su biodegradabilidad mediante la oxidación o hidrólisis de ciertas moléculas para mejorar su hidrofilia (Restrepo-Flórez et al., 2014). Esta modificación da lugar a polímeros de bajo peso molecular que lo hacen más susceptible a la actividad enzimática requerida para su eliminación (Albertsson y Karlsson, 1990). Algunas de las especies más estudiadas con estas capacidades pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus* o *Moraxella* en el caso de bacterias, y *Fusarium solani* o *Curvularia senegalensis* en el caso de hongos (Santo et al., 2013; Jun et al., 2014). En el trabajo realizado por Zhang et al., (2018), ensayan en placas Petri la biodegradación del polietileno con un análogo estructural, el alcohol de polivinilo, obteniendo un halo de degradación del 6,8% en 90 días por la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* "HK1". Otro plástico cuya degradación microbiana se está investigando es el tereftalato de polietileno (PET) (Wei et al., 2016). Uno de los microorganismos más prometedores para esta actividad es *Idionella sakaiensis*, bacteria aislada de un ambiente contaminado por plásticos (Yoshida et al., 2016) que produce una enzima llamada IsPETasa, responsable de la degradación del PET (Gong et al., 2018). Esta enzima cuenta con una estructura parecida a las cutinasas, por lo que se estudian ciertas enzimas lipolíticas como potenciales para la degradación de estos compuestos (Nikolaivits et al., 2018). Estas enzimas suelen actuar en conjunto con poliesterasas, por lo que también son objeto de estudio (Biundo et al., 2017). En el estudio llevado a cabo por Molitor et al. (2020), se describió un protocolo para la detección de cepas con capacidades degradativas de PET mediante un screening consistente en la siembra de una serie de microorganismos en diferentes medios de cultivo emulsificables que permitían la identificación de cepas productoras de poliesterasas. El pre-screening se realizó por medio del cultivo de microorganismos en placas Petri con tributirina, un triglicérido de cadena corta que permite detectar la actividad esterasa mediante la generación de halos. Además, se realizó otro ensayo con aceite de coco y rodamina B, que permitía observar mediante fluorescencia los halos de aclaramiento causados por la degradación de este ácido graso de cadena larga. Las cepas positivas fueron ensayadas en un medio de cultivo que contenían sustratos inductores emulsificables: Impranil® DNS, un poliéster de poliuretano alifático sintético que se utiliza para recubrimientos textiles, de cuero y tejidos de aviones. La lectura de la actividad poliesterasa y esterasa fue medida mediante la generación de halos de aclaramiento. Estos ensayos arrojaron una serie de cepas capaces de degradar estos sustratos como *Parachernes litoralis* o *Pseudomonas oceani*.

1.3. Fuentes y estrategias para el aislamiento de microorganismos

La búsqueda de microorganismos con potencial biotecnológico, bien sean productores de enzimas o con alguna actividad de interés en biorremediación, requiere en primera instancia de una buena selección

de la muestra a partir de la que se van a obtener. Los ambientes colonizados por estos microorganismos suelen contener compuestos moleculares susceptibles de ser degradados por la actividad enzimática que se pretende estudiar. Las fuentes potenciales para la obtención de microorganismos de interés biotecnológico e industrial variarán dependiendo de la actividad que se pretenda encontrar. Uno de los ambientes más utilizados para encontrar microorganismos con actividad ligninolítica, celulolítica y xilanolítica suele ser madera en condiciones de podredumbre y el tracto intestinal de los insectos que se alimentan de esta (Gómez-Martínez et al., 2019), aunque también hay estudios que utilizan residuos vegetales producidos en la agricultura (Félix et al., 2014). Un ambiente de especial interés para la búsqueda de dichas actividades es el material sometido a compostaje. Este es un proceso biológico aeróbico y termófilo en el cual la materia orgánica es transformada por una gran variedad de microorganismos dando como resultado un producto estable denominado compost, que mejora las características del suelo y que actúa como fertilizante. Este proceso se lleva a cabo en diferentes etapas, caracterizadas por cambios en los parámetros ambientales como pueden ser la temperatura, el pH o la humedad (Moreno y Mormeneo, 2008) Estas características, además de hacer del compostaje un ambiente selectivo, promueven una gran biodiversidad, siendo un excelente ecosistema para la obtención de microorganismos de interés biotecnológico y biorremediador.

Otra muestra a partir de las que se suelen obtener este tipo de microorganismos es el suelo (Khan et al., 2011). Este ambiente puede presentar un amplio abanico de características según en el estado en el que se encuentre. Morales et al. (2014) utilizaron el suelo de un humedal, para la obtención de microorganismos con actividad amilolítica, celulolítica y ligninolítica que contiene una gran diversidad de nutrientes y por lo que es susceptible de contener un gran abanico de microorganismos con actividades enzimáticas diferentes, encontrando hasta 51 cepas con actividad ligninasa, celulasa y amilasa. Un suelo impactado presenta unas características que lo hacen selectivo para la proliferación de microorganismos con capacidades singulares. Así, por ejemplo, suelos contaminados con sedimentos de alpechín o por aguas de lavado procedentes de la industria olivarera pueden contener una población microbiana singular (Khannous et al., 2014). El aceite es extraído a partir de la aceituna en las almazaras mediante distintos sistemas que han ido cambiando con el tiempo como consecuencia de la incorporación de nueva tecnología (Souilem et al., 2017). En la década de los 70-80 se generalizó, al menos en España, el empleo de un decantador horizontal, denominado centrífuga a 3 fases (3F), que separaba los tres componentes de la pasta de aceituna, fase sólida u orujo, aceite y fase líquida acuosa o alpechín (1 – 1,6 L/kg de aceituna). Con el objetivo de mitigar estos problemas, se desarrolló un nuevo tipo de centrífuga a dos fases (2F) que se implantaría en la mayor parte de Europa y que contribuyó a reducir la producción de residuos (0,5L/kg de aceituna), eliminando la salida del alpechín dando lugar a dos fracciones a partir de la pasta de aceituna constituida por una mezcla de los sólidos (orujo) y la fracción acuosa de la aceituna (alpechín), que recibe el nombre de alpeorujo (Calvo Fernández, 2013). El alpechín es el residuo acuoso producido en el proceso de extracción de aceite de oliva cuya forma de gestión consistía en su almacenamiento en balsas de evaporación, en las que sedimentaba dando lugar a un fango que presenta unas características altamente selectivas para la microbiota. Este residuo presenta un elevado contenido

en polifenoles y le confieren una elevada toxicidad y efecto antimicrobiano (Dermeche y col., 2013), aunque su composición es muy variable dependiendo de factores ambientales y de cultivo (Niaounakis y Halvadakis, 2004). Presenta un mayor poder contaminante que las aguas de lavado 2F debido a su mayor concentración de polifenoles y Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Tabla 2), produciéndose además en mucha más cantidad.

Tabla 2. Características de los efluentes líquidos de sistemas de producción de alpechín de dos (2F) y tres fases (3F) (Hermoso et al., 1991)

Parámetros	Aguas de lavado 2F	Alpechín 3F
Producción (L/100 kg de aceituna)	25	120
Humedad %	99	90
Grasa %	0,04	0,45
Azúcares %	-	2,8
Polifenoles (p.p.m)	2.500	10.000
DQO (p.p.m)	10.000	80.000

Entre la gran cantidad de polifenoles presentes en los sedimentos de alpechín destacan algunos como son el ácido p-cumárico, luteolina, oleuropeina, siendo mayoritarios el tirosol e hidroxitirosol (Cabrera et al., 1997) los cuales son análogos estructurales de la lignina (Figura 2), por lo que este ambiente se destaca como una fuente potencial de obtención de microorganismos con dicha actividad. Martínez-Gallardo et al. (2020) utilizaron este ambiente para la obtención de microorganismos con el objetivo de biorremediar un suelo impactado por sedimentos de alpechín mediante técnicas como el compostaje o la fitorremediación, utilizando las cepas obtenidas para bioaumentar esas técnicas (Crawford y Rosenberg, 2013). Abd El-Aziz et al. (2015) también utilizaron este ambiente para aislar y seleccionar del alpechín microorganismos con capacidad para degradar los compuestos fenólicos según los parámetros que más afectan a la capacidad biodegradativa de estos compuestos (pH, temperatura, concentración de compuestos y adaptación microbiana), siendo los hongos los que mostraron mayor capacidad degradativa.

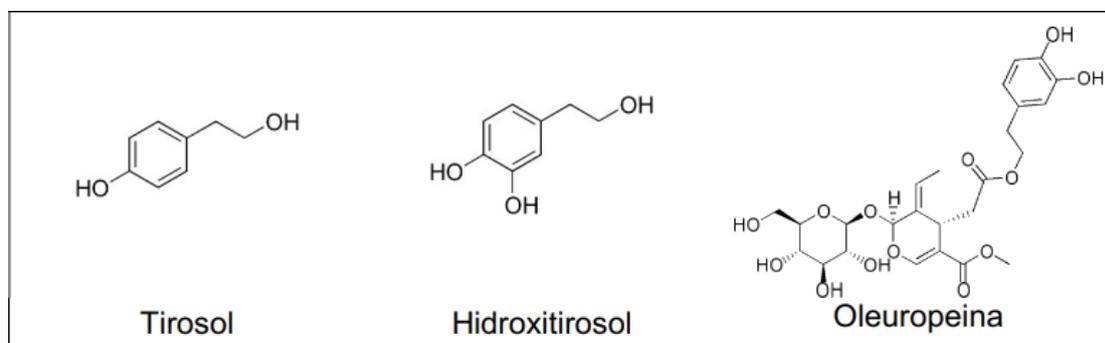


Figura 2: Estructura de los principales polifenoles del alpechín.

Además de la selección de la muestra, es importante el abordaje o estrategia mediante el cual se pretenden obtener los microorganismos. Existen diferentes opciones que abarcan desde complejas técnicas genéticas hasta técnicas cultivares convencionales.

Los métodos basados en técnicas cultivares utilizan sustratos inductores en medios de cultivo que revelan la actividad enzimática diana mediante la aparición de un halo translúcido producido por la degradación de ese compuesto (Jurado et al., 2014). Estos medios identificadores de actividades enzimáticas también pueden utilizar un reactivo específico para cada actividad (Falcón et al., 1995)

Uno de los métodos no cultivares utilizados que se basa en metatranscriptómica es el EST (Expression Sequence Tags). Este método busca purificar los mRNA contenidos en una muestra ambiental, convertirlos a cDNA de doble cadena, secuenciarlo, clonarlo y compararlo (Joshi y Pathak, 2019). Esta técnica presenta un problema que reside en la complejidad de analizar una enorme cantidad de clones que contienen los numerosos fragmentos de ARN que puede contener una muestra. Por esta razón este método se encuentra obsoleto y en la actualidad, se aplica otro método para la obtención de información de la actividad expresada por una población en una muestra concreta y la búsqueda de genes de interés. Este método se basa en aislar el ARN, pasar a cDNA monocatenario, secuenciar y compararlo con una biblioteca genómica. La ventaja principal de este método frente al anterior reside en la eliminación del paso de clonación, permitiendo una gran reproducibilidad y la obtención de información fiable cualitativa y cuantitativa de expresión génica, aunque para su realización son necesarias herramientas bioinformáticas (Sedano et al., 2012).

2. Justificación y objetivos

Tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, aunque existe un gran avance en el elenco de microorganismos actualmente disponibles para distintas aplicaciones biotecnológicas, ya sea para la producción de enzimas o con actividad descontaminante, la gran diversidad de usos y requerimientos para estos microorganismos y sus productos hace necesario continuar con la búsqueda de microorganismos de interés biotecnológico. Se requieren microorganismos productores de nuevas enzimas más robustas capaces de actuar en un amplio abanico de aplicaciones y en unas condiciones cada vez más exigentes (Eş et al., 2015). Además, dada la actual y reconocida preocupación de la sociedad, ya iniciada en los años 60 (Carson, 1962), causada por la degradación y contaminación ambiental a escala mundial, y la aparición de nuevos agentes contaminantes, es preciso contar con un amplio arsenal de capacidades que permitan afrontar los retos asociados mediante un enfoque amigable como es la biorremediación.

Para abordar el estudio se parte de la hipótesis de que, para garantizar el éxito en la búsqueda y obtención de microorganismos con las capacidades metabólicas requeridas, es necesaria la correcta

selección del ambiente o muestra a partir de la que se efectúa el rastreo. Así, se considera que existe mayor probabilidad de éxito en entornos donde se encuentre el compuesto diana de las actividades metabólicas de interés.

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda y selección de microorganismos con potencial biotecnológico y biorremediador, capaces producir enzimas de interés industrial y de degradar compuestos recalcitrantes, y la identificación del ambiente más adecuado para efectuar dicha búsqueda.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecimiento de una colección de microorganismos aislados de diferentes ambientes.
2. Determinación del ambiente más idóneo para la búsqueda de microorganismos con las actividades deseadas.
3. Selección de microorganismos productores de enzimas de interés biotecnológico y validación de su actividad.
4. Selección de microorganismos de interés en biorremediación y validación de su actividad.
5. Identificación de las cepas con mayor potencial

3. Material y métodos

Para abordar los objetivos previamente planteados, en este trabajo se obtuvo una colección de microorganismos a partir de tres ambientes distintos (compost, suelo rizosférico de azufaifo y sedimentos de alpechín) y se analizó su capacidad para producir un amplio abanico de enzimas con aplicación en sectores industrial, alimentario y ambiental (biorremediación). Una vez demostrada la actividad concreta se cuantificó la producción y se identificaron las cepas productoras. En este apartado se describen los métodos empleados para la obtención de la colección de microorganismos, el análisis de sus capacidades para la producción de enzimas, la cuantificación de dichas actividades y la identificación de las cepas. Finalmente se describen los métodos y software empleados para el análisis de datos.

3.1. Colección de cepas: aislamiento y mantenimiento

Para el desarrollo del trabajo se emplearon colecciones de microorganismos aislados a partir de tres ambientes: material sometido a compostaje, suelo rizosférico de azufaifo y sedimentos de alpechín. El objetivo para cada muestra era conseguir 5 aislados bacterianos y 5 aislados fúngicos para el estudio.

Las cepas de compostaje se escogieron entre una colección de cepas aisladas en un estudio previo a partir de material vegetal sometido a compostaje en distintas fases del mismo (Jurado y col., 2014). Las cepas procedentes de sedimentos de balsas de alpechín fueron seleccionadas a partir de una colección aisladas en un trabajo previo (Martínez-Gallardo y col., 2020). En ambos casos se seleccionaron aquellas cepas fúngicas y bacterianas que, de acuerdo con los estudios indicados, demostraron un mayor dominio.

Las cepas de suelo se aislaron en el contexto de este trabajo. Las muestras para aislamiento se obtuvieron a partir de suelo rizosférico de un azufaifar (*Ziziphus lotus*) ubicado en los alrededores de la playa Torregarcía (36°49'45.06"N, 2°17'15.89"W), en el extremo occidental del parque natural de a Cabo de Gata-Níjar (Almería) (Figura 3).



Figura 3. Distribución de *Ziziphus lotus* en el parque natural Cabo de Gata-Níjar (Imagen de Google).

Para el aislamiento de los microorganismos a partir del suelo se realizó una suspensión 1/10 de la muestra, añadiendo en condiciones estériles 5 g de suelo a 45 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v) en un frasco ISO de 100 mL. La suspensión se mantuvo en agitación durante 30 min a 90 rpm. A partir de dicha suspensión se realizaron diluciones decimales seriadas hasta obtener la dilución 10^{-5} , mediante transferencia de 1 mL en condiciones de esterilidad a tubos que contenían 9 mL de solución salina. Cada una de las diluciones (100 μ L) se sembró en placas Petri con APHA (para bacterias) o Rosa de Bengala (para hongos) (Panreac) que se incubaron durante 3 y 5 días para bacterias y hongos, respectivamente. Los morfotipos coloniales mayoritarios de bacterias y hongos se aislaron hasta obtener cultivos puros de cinco representantes de cada grupo. Los cultivos puros se preservaron conservados a 4 °C en placas y tubos inclinados de APHA o PDA (Panreac) para bacterias y hongos, respectivamente. Para el mantenimiento a largo plazo, se criogenizaron a -80 °C en crioviales (Deltalab®).

En total se contó con una colección de 30 cepas, constituida por 5 bacterias y 5 hongos para cada tipo de muestra origen (compost, suelo azufaifo, sedimentos alpechín) (Tabla 3).

Tabla 3. Colección de cepas empleadas en el estudio: origen, grupo y códigos.

Muestra	Grupo microbiano	Cepa
SEDIMENTOS DE ALPECHÍN	Hongo	HSA 21
	Hongo	HSA 2
	Hongo	HSA 6
	Hongo	HSA 16
	Hongo	HSA 10
	Actinobacteria	ASA 3
	Actinobacteria	ASA 4
	Bacteria	BSA 23
	Bacteria	BSA 14
	Bacteria	BSA 18
COMPOST	Hongo	HC 4424
	Hongo	HC 4839
	Hongo	HC 4993
	Hongo	HC 4995
	Hongo	HC 4521
	Bacteria	BC 2815
	Bacteria	BC 1983
	Bacteria	BC 1958
	Bacteria	BC 2155
	Bacteria	BC 2867
SUELO RIZOSFÉRICO	Hongo	HAZ 1
	Hongo	HAZ 2
	Hongo	HAZ 3
	Hongo	HAZ 4
	Hongo	HAZ 5
	Bacteria	BAZ 1
	Bacteria	BAZ2
	Bacteria	BAZ3
	Bacteria	BAZ 4
	Bacteria	BAZ 6

3.2 Análisis de la expresión de actividades enzimáticas

La colección de microorganismos fue sometida a distintas pruebas para determinar la presencia de las siguientes actividades enzimáticas que tienen interés biotecnológico en general, y algunas de ellas, útiles específicamente para biorremediación:

- Proteasa
- Amilasa
- Pectinasa
- Celulasa
- Xilanasa
- Lipasa
- Polifenoloxidasa
- Ligninasa y actividades relacionadas (lacasa, peroxidasa y tirosinasa)

Todas las pruebas se realizaron en placa Petri con medios de cultivo diferentes dependiendo de la actividad a evaluar. Los medios se sembraron en el caso de los hongos con un plug recogido con sacabocados (1 cm) de un cultivo del hongo en PDA incubado durante 5 días, y en el caso de las bacterias,

con asa o hilo de siembra tomado de una colonia de cultivo fresco (<48h) de la bacteria en APHA. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 – 48 h las bacterias y 3-5 días los hongos, tras lo cual se procedió a realizar la lectura correspondiente para determinar la presencia de la actividad. A continuación, se especifica para cada actividad el medio de cultivo empleado y la lectura.

La **actividad proteasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por Geok et al. (2003) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 4 que contiene leche descremada como fuente de proteína (caseína). Tras el período de incubación, las colonias con actividad proteolítica presentaron alrededor halos de aclaramiento del medio originalmente turbio, indicando hidrólisis de la caseína (Figura 4).

Tabla 4. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad proteolítica.

Componente	g/L
Peptona	5
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Leche descremada	10
Agar bacteriológico	20

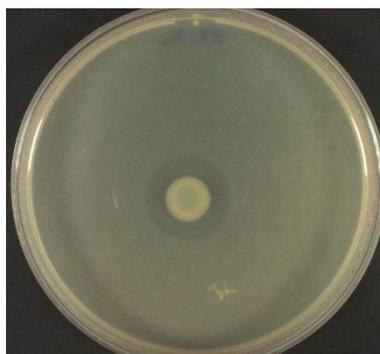


Figura 4. Lectura de la prueba de actividad proteolítica (halo de aclaramiento del medio turbio)

La **actividad amilasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por Hankin y Anagnostakis (1975) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 5 que contiene almidón. Tras el período de incubación, se incorporó una solución de lugol (I₂ al 1% mezclado con KI al 2% en agua) a toda la superficie de la placa y tras contacto durante 1 min se realizó la lectura. El lugol tiñe de azul el almidón, las colonias que presentaron actividad amilolítica mostraron un halo no teñido alrededor (Figura 5).

Tabla 5. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad amilolítica.

Componente	g/L
Peptona	5
Extracto de carne	4
Cloruro sódico	5
Almidón	10
Agar	20

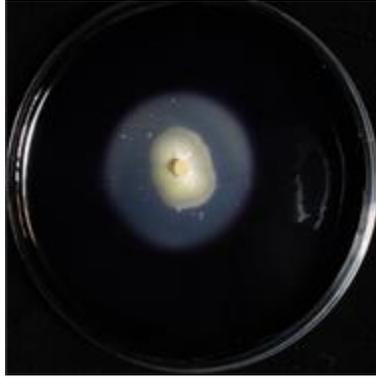


Figura 5. Lectura de la prueba de actividad amilolítica (halo no teñido de azul).

La **actividad lipasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por Carrasco et al., (2012) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 6 que contiene tributirina (Sigma) como fuente lipídica. Tras el período de incubación, las colonias que presentaron actividad lipolítica presentaron alrededor halos de aclaramiento del medio originalmente turbio, indicando hidrólisis de la tributirina (Figura 6).

Tabla 6. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad lipolítica.

Componente	g/L
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Tributirina	10
Agar bacteriológico	20

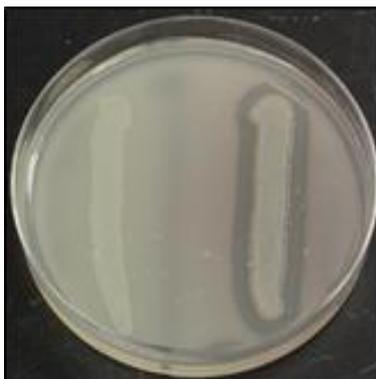


Figura 6. Lectura de la prueba de actividad lipolítica (halo de aclaramiento).

La **actividad pectinasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por McKay (1988) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 7 que contiene ácido poligalacturónico (Sigma) como sustrato pectídico. Tras el período de incubación, las colonias que presentaron actividad pectinolítica presentaron alrededor halos de aclaramiento del medio originalmente turbio, indicando hidrólisis de la pectina modelo, ácido poligalacturónico (Figura 7).

Tabla 7. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad pectinolítica.

Componente	g/L
Ácido poligalacturónico	10
Extracto de levadura	5
Triptona	10
Cloruro sódico	10
Agar	20



Figura 7. Lectura de la prueba de actividad pectinolítica (halo de aclaramiento)

La **actividad celulosa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por Falcón et al. (1995) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 8 que contiene carboximetilcelulosa (Sigma) como sustrato análogo a la celulosa junto con el colorante anilina blue black (Sigma) que facilita la lectura. Tras el período de incubación, las colonias con actividad celulolítica presentaron alrededor halos de aclaramiento del medio originalmente azul, indicando hidrólisis de la celulosa (Figura 8).

Tabla 8. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad celulolítica.

Componente	g/L
Carboximetil celulosa	5
Medio mínimo de sales*, volumen de cada sal	100 mL
Anilina Blue Black	0,05
Agar	20
Agua destilada	700 mL

*Medio mínimo de sales (Janshekar et al., 1982)

Solución A:	Cantidad	Solución B:	Cantidad	Solución C:	Cantidad
K_2HPO_4	16 g	NaCl	2,5 g	$(NH_4)_2SO_4$	12,5 g
KH_2PO_4	5 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,8 g	$(NH_4)NO_3$	10 g
Agua Destilada c.s.p.	1000 mL	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,13 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,025 g
		Agua Destilada c.s.p.	1000 mL	Agua Destilada c.s.p.	1000 mL

c.s.p. Cantidad suficiente para

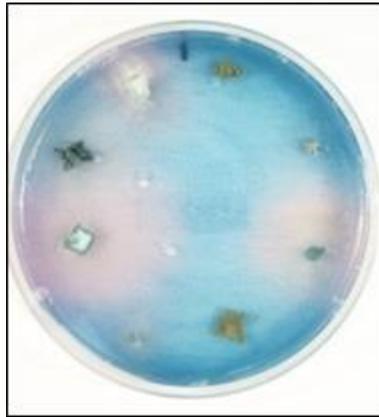


Figura 8. Lectura de la prueba de actividad celulolítica (halo de aclaramiento)

La **actividad xilanasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por He et al. (1993) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 9 que contiene xilano (Sigma) como sustrato. Tras el período de incubación, las colonias con actividad xilanolítica presentaron alrededor halos de aclaramiento del medio originalmente turbio, indicando hidrólisis del xilano, principal componente de la hemicelulosa (Figura 9).

Tabla 9. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad xilanolítica.

Componente	g/L
Xilano	5
Medio mínimo de sales*, volumen de cada sal	100 mL
Agar	20
Agua destilada	700 mL

* Medio mínimo de sales (ver Tabla 7)

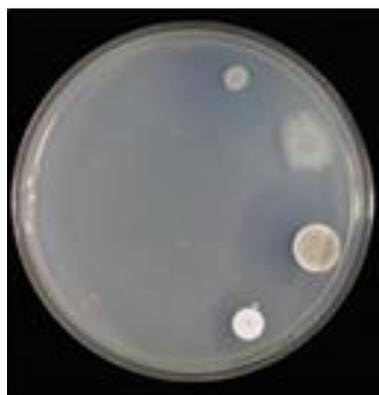


Figura 9. Lectura de la prueba de actividad xilanolítica (halo de aclaramiento)

La **actividad polifenoloxidasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por (López et al., 2006) empleando el medio de cultivo indicado en la Tabla 10 que contiene ácido tánico (Sigma) como polifenol modelo. Tras el período de incubación, las colonias con actividad polifenoloxidasa presentaron alrededor coloración marrón debido a la oxidación del ácido tánico provocada por la enzima (Figura 10).

Tabla 10. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad polifenoloxidasas.

Componente	g/L
APHA (bacterias) PDA (hongos)	Según instrucciones
Ácido tánico	5
Agar	5

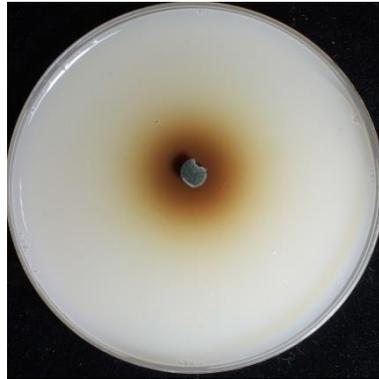


Figura 10. Lectura de la prueba de actividad polifenoloxidasas (coloración marrón alrededor)

La **actividad ligninasa** se determinó de acuerdo con el método propuesto por Sundman y Näse (1972), también conocido como Test de Sundman. Para ello se empleó el medio de cultivo indicado en la Tabla 11 que contiene lignina (Sigma). La incubación fue prolongada hasta la obtención de colonias visibles y se adicionó hasta cubrir la superficie del medio de cultivo una mezcla a partes iguales de una solución acuosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1%, p/v) y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%, p/v). Tras 5-10 minutos, este reactivo tiñe el medio de verde debido a la presencia de ácidos fenólicos presentes en la lignina que compone el medio. Las colonias con actividad ligninolítica presentan un halo de aclaramiento (Figura 11).

Tabla 11. Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad ligninolítica.

Componente	g/L
Lignina	1
Medio mínimo de sales, volumen de cada sal	100 mL
Agar	20
Agua destilada	700 mL

* Medio mínimo de sales (ver Tabla 7)

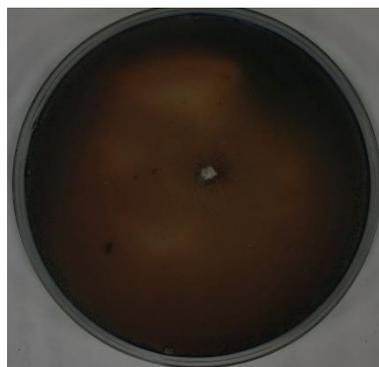


Figura 11. Lectura de la prueba de actividad ligninasa-Sundman (aclaramiento)

Se analizaron las siguientes actividades relacionadas con el metabolismo de la lignina: **lacasa**, **peroxidasa** y **tirosinasa**. Para ello se empleó el método propuesto por Rayner y Boddy (1988). Estas pruebas se realizaron sembrando los microorganismos en APHA (bacterias) o PDA (hongos) y tras su incubación, sobre las colonias crecidas se incorporaron unas gotas de los reactivos indicados en la Tabla 12, específicos para la detección de cada actividad. La interpretación de las lecturas y el tiempo necesario para efectuarlas, aparecen detallados en la Tabla 12. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de revelado de estas pruebas.

Tabla 12. Reactivo y lectura de actividades Lacasa, Tirosinasa y Peroxidasa.

ACTIVIDAD	REACTIVO	LECTURA	
		Tiempo	Colonia +
LACASA 1	1,44 g de α -naftol/100 ml de etanol (96%)	4-24 horas	Púrpura
LACASA 2	1,24 g de guaiacol/100 ml de etanol (96%)	4-24 horas	Púrpura
TIROSINASA	1,08 g de p-cresol/100 ml de etanol (96%)	4-48 horas	Rosáceo, anaranjado
PEROXIDASA	Mezcla extemporánea (1:1) de solución acuosa de pirogalol al 1% (p/v) con solución de peróxido de hidrógeno de 10 v al 13,3% (v/v)	4-24 horas	Marrón

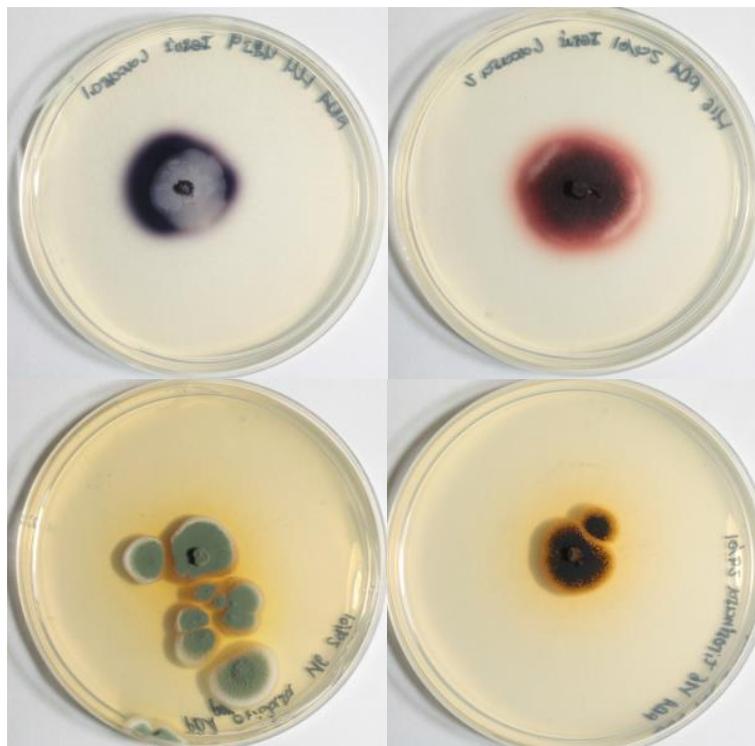


Figura 12. Lectura de las pruebas de actividades lacasa 1 (arriba izquierda), lacasa 2 (arriba derecha) peroxidasa (abajo izquierda) y tirosinasa (abajo derecha).

3.3. Cuantificación de la producción de enzimas

Las cepas de interés para la cuantificación enzimática se cultivaron en medios líquidos en los que se estimuló la producción de la enzima deseada. A partir de estos medios se obtuvieron los denominados extractos enzimáticos mediante centrifugación, que se emplearon para medir la actividad enzimática mediante el desarrollo de la reacción con sustrato específico y finalmente medida de los productos de reacción. De modo que todos los protocolos incluyeron tres fases, producción y obtención de extractos enzimáticos, desarrollo de la reacción enzimática y determinación de los productos de reacción, los cuales se describen a continuación.

Para la **fase de producción**, se prepararon primero preinóculos. En el caso de los hongos, los preinóculos fueron cultivos en placas de PDA incubados durante 5 días a 30 °C. Para las bacterias se obtuvieron cultivos líquidos en matraces de 250 mL que contenían 25 mL Caldo Nutritivo (CN) incubados de 18 a 24 h a 30 °C. Se prepararon 20 mL de medios de cultivo específicos para cada enzima según la fuente carbonada inductora empleada (Tabla 13). Estos medios se inocularon con 1 mL de preinóculo bacteriano o con un plug de 1 cm²Ø obtenido con sacabocados del preinóculo fúngico. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 días en agitación (100 rpm) para bacterias y en estático para hongos.

Tabla 13. Componentes de los medios de cultivo líquido para producción enzimática.

Componente	g/L
Xilano, Carboximetilcelulosa, Almidón, Peptona o Tributirina*	5
Extracto de levadura	1
Medio mínimo de sales, volumen de cada sal**	100 mL

*Los distintos sustratos son utilizados como única fuente de carbono según el extracto enzimático deseado: Xilano para xilanasas, Carboximetilcelulosa para celulasas, Almidón para amilasas, peptona para proteasas, Tributirina para lipasas.

**Medio mínimo de sales de Janshekar (ver Tabla 7).

Los **extractos enzimáticos** se obtuvieron a partir de los cultivos mediante retirada de la biomasa celular tras centrifugar a 10.000 rpm / 4 °C / 10 minutos. El sobrenadante (1mL) se recogió y almacenó en tubos Falcon de 15 mL para la medida de la actividad enzimática y proteínas. Estas últimas se determinaron mediante el método de Bradford modificado por Kruger, (2009).

La **fase de reacción enzimática** se llevó a cabo empleando distintos sustratos y tampones dependiendo de la enzima a cuantificar (Tabla 14). En todos los casos la reacción se llevó a cabo en eppendorf de 2 mL en los que se incorporaron 250 µL del sustrato diana en el tampón correspondiente y 250 µL del extracto enzimático problema producido por la cepa en estudio. Además, para cada extracto se incorporó un control con el extracto enzimático con la enzima inactivada que se empleó para hacer el cálculo de producto liberado exclusivamente por la acción de la enzima y no presente en el propio extracto enzimático. Las mezclas de reacción se incubaron a 80 rpm en las condiciones específicas para cada enzima (Tabla 14) y, transcurrido el tiempo correspondiente, se paró la reacción introduciendo los eppendorf en hielo.

Tabla 14. Sustratos y condiciones para el desarrollo de las reacciones enzimáticas.

Enzima	Sustrato	Condiciones de reacción
Amilasa	Solución de almidón al 1% en tampón fosfato 0,5M (pH 5,5)	37 °C – 1 h
Celulasa	Solución de caboximetil celulosa sódica al 1% en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5,5)	40 °C – 2 h
Xilanasa	Solución de xilano al 1% en tampón de citrato-fosfato 50mM (pH 6,5)	40 °C – 1 h
Pectinasa	Solución de ácido poligalacturónico al 0.1% en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5,5)	37 °C – 30 min
Lipasa	Solución p-nitrofenil-laurato 10mM en heptano	37 °C – 2 h
Proteasa	Solución caseinato sódico (0,65%, p/v) en tampón fosfato sódico pH 7,5	37 °C – 30 min

Para cuantificar los **productos de reacción** de amilasa, xilanasa, pectinasa y celulasa se empleó el protocolo descrito por Miller et al. (1959) mediante incorporación de DNS, calentamiento a 100 °C durante 5 min, que da lugar al desarrollo de color marrón en presencia de los grupos reductores de los azúcares o el ácido urónico correspondientes (glucosa para amilasa y celulasa, xilosa para xilanasa y ácido galacturónico para petinasa) que se midió a 550 nm. Para la lipasa se cuantificó el P-nitrofenol liberado que desarrolla color amarillo en presencia de NaOH 0,1M y se midió a 400 nm (Farnet et al., 2010). Para la proteasa se midieron los aminoácidos liberados según el protocolo descrito por Geok et al. (2003) empleando el reactivo Folin Ciocalteau 0,5N en presencia de carbonato sódico 0,5M y tras 30 min se midió el color azul a 660nm. Todas las medidas se realizaron en espectrofotómetro de microplacas EON Biotek y se obtuvo la concentración de producto correspondiente mediante el software Gen5 empleando rectas patrón específicas para cada producto de reacción cuantificado. Para calcular la actividad enzimática (AE) se utilizó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Cf - Ci) \times Vr}{(VEE \times T)}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática (µg/mL min)

Cf: Cantidad final de producto (µg/mL)

Ci: Cantidad inicial de producto (µg/mL)

VEE: volumen del extracto enzimático (mL)

T: tiempo de reacción (min)

Adicionalmente se determinó la Actividad Enzimática por peso de proteínas o actividad específica (AEp=µg/µg prot min) dividiendo AE por la concentración de proteínas del extracto enzimático

3.4. Cuantificación de la actividad degradativa de compuestos recalcitrantes

Como modelo de molécula recalcitrante para determinar la eficacia degradativa de las cepas se empleó un polifenol, el tirosol. Para cuantificar la capacidad de degradación de este compuesto, cada uno de los aislados fue sembrado en un medio de cultivo con tirosol al 0,05 % (p/v) en medio mínimo de sales

(Tabla 7) como única fuente de carbono y energía y, tras el período de incubación, se determinó la concentración remanente de tirosol.

El ensayo se realizó en microplacas estériles de 48 pocillos (Thermo Scientific) (Figura 13) con 500 μL de medio TIR que se inoculó con asa de platino con 2-3 colonias o con un plug cortado con un sacabocados de 4 mm de diámetro. Las microplacas se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

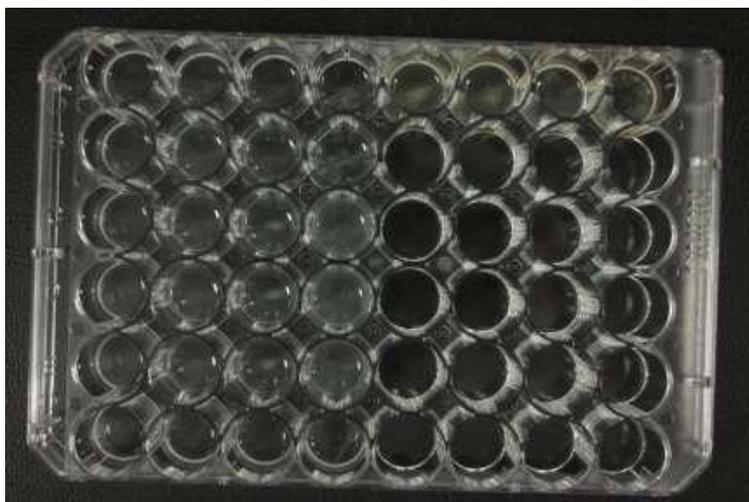


Figura 13. Cultivo de las cepas en microplacas con medio con tirosol.

Pasado el tiempo de incubación, se cuantificó la concentración de tirosol mediante el empleo del reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo con el protocolo Sánchez-Rangel et al. (2013) modificado. Para ello, se recogieron 300 μL de cada pocillo que fueron transferidos a un eppendorf en el que se incorporaron 180 μL de H_2O_2 , la mezcla se agitó vigorosamente con vortex. Este paso permite eliminar azúcares reductores y otras sustancias que interfieren en la medida de polifenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). A continuación, se recogieron 255 μL evitando recoger precipitado, que fueron transferidos a una microplaca de 96 pocillos (Fisher Scientific), a los que se incorporó 15 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) y 30 μL de Na_2CO_3 1N. La reacción del Folin-Ciocalteu con el tirosol en medio alcalino da lugar a la generación de color azul tras mantener 1h en oscuridad. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas EON (Biotek, USA) a 765 nm, obteniéndose la concentración de tirosol mediante comparación con una curva patrón de tirosol con un rango de 0 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de este ensayo se expresaron como porcentaje de degradación del tirosol (% Degr. Tirosol), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Degr. Tirosol} = \frac{[\text{Tirosol inicial}] - [\text{Tirosol final}]}{[\text{Tirosol inicial}]} \times 100$$

Donde:

- [Tirosol inicial]: Concentración de tirosol en el medio de cultivo.
- [Tirosol final]: Concentración de tirosol tras 7 días de incubación.

3.5. Identificación de cepas

Para la identificación molecular de las cepas se empleó el protocolo establecido por Jurado et al. (2014). Para la extracción del ADN bacteriano, la biomasa celular procedente de un cultivo fresco en placa de cada bacteria (24h) fue suspendida en 500 µL de agua destilada estéril contenida en eppendorf de 1 mL. Para favorecer la rotura de la pared celular y la salida del ADN de la célula, se aplicó un choque térmico. Para ello, la suspensión celular se sometió a 97 °C durante 5 min en un bloque térmico SBH130D (Stuart), seguido de inmersión en hielo durante 5 min. El ADN fúngico fue extraído mediante el kit PlantDNAzol® Reagent (Invitrogen) según las normas del fabricante. En ambos casos, para verificar la presencia de ADN y su concentración se utilizó Qubit™ Assays fluorometer (Invitrogen). Se prepararon 2 estándares para calibración con 0 y 10 ng/µL de ADN y las muestras problema, consistentes en 198 µL de agua destilada estéril + 2 µL de ADN problema en eppendorfs específicos (BioSpectrometer® fluorescence).

Las muestras de ADN extraídas fueron amplificadas por PCR. En el caso de los hongos se amplificó la región 5.8-ITS empleando los cebadores universales ITS1/ITS4. Para las bacterias se amplificó el gen 16S ARNr mediante los cebadores universales 27F/907R. La mezcla de la reacción para la amplificación contenía aprox 2 µL de la muestra problema que se ajustó dependiendo de la concentración de ADN (25 y 30 ng/µL para una correcta amplificación), 10µL de mix PCR BioMix Red (Bioline), 0,4 µL de cada cebador y agua estéril hasta 20 µL. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler (Bioraid, California, EE.UU) en las condiciones especificadas en las Tablas 15 y 16. Tras la amplificación, la longitud de los fragmentos obtenidos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) (Sigma-Aldrich) adicionado de 0,002% de GelRed (Biotium, Hayward, EEUU) que permite la visualización de las bandas con luz ultravioleta en transiluminador y comparados con marcador DNA ladder (50-10.000pb DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, Sigma-Aldrich, EEUU).

Tabla 15. Cebadores y programa de amplificación de la región 5.8-ITS para hongos

Cebadores para la amplificación de la región 5.8-ITS		
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTCATATGC-3'	
Programa de identificación	Temperatura y tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C – 10 min	35
Desnaturalización	94 °C – 1 min	
Anillamiento	51 °C – 1 min	
Elongación	72 °C – 3 min	
Elongación final	72 °C – 10 min	

Tabla 16. Cebadores y programa de amplificación del gen 16 ARNr de bacterias

Cebadores para la amplificación de la región 27F/907R		
27F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	
907R	5'- CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'	
Programa de identificación	Temperatura y tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C – 2 min	35
Desnaturalización	94 °C – 1 min	
Anillamiento	55 °C – 1 min	
Elongación	72 °C – 1'5 min	
Elongación final	72 °C – 10 min	

Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit comercial Megaquick-spin™ plus (Intron Biotechnology) según las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue llevada a cabo por los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería y fueron analizadas por una batería de programas informáticos: Sequence scanner v1.0 (disponible en www.appliedbiosystems.com) para visualizar y copiar las secuencias Forward y Reverse; Reverse complement (disponible en www.bioinformatics.org) para obtener el reverso complementario del fragmento antisentido; ClustalX v2.0.11 (disponible en www.clustal.org) con el objetivo de alinear la secuencia Forward y el reverso complementario; Mega 5.05 (www.megasoftware.net) para editar las secuencias alineadas y construir el fragmento completo y la base de datos online del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar los fragmentos obtenidos con secuencias depositadas en la base de datos.

3.6. Análisis de datos

El análisis estadístico descriptivo de los datos y la elaboración de la mayoría de las representaciones gráficas se llevó a cabo empleando mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se representan como la media y la desviación estándar de los mismos. Los datos fueron normalizados mediante transformación arcoseno para aplicar análisis estadísticos paramétricos. Para el análisis comparativo de la actividad biodegradativa entre cepas y su selección de acuerdo con ellas se aplicó un Análisis de la Varianza (ANOVA) y posterior comparación de rangos múltiple empleando el estadístico LSD de Fisher (Fisher's least significant difference). Para aplicar este análisis, los datos de porcentaje de degradación fueron transformados en arcoseno para aplicar análisis estadísticos paramétricos. Estos análisis fueron efectuados empleando el programa Statgraphics Centurión 18 (versión 18.1.13-64 bits).

4. Resultados y discusión

En este trabajo se ha abordado la búsqueda y selección de microorganismos que produzcan enzimas con numerosas aplicaciones y que desarrollen actividades metabólicas de utilidad en procesos de biorremediación. A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados. En el primer lugar se relaciona la presencia de las actividades enzimáticas de interés con la muestra origen a partir de la que fueron aislados los microorganismos objeto de análisis. Seguidamente se realiza una selección de las cepas microbianas de acuerdo a su potencial utilidad y se aportan los resultados de la identificación molecular de las mismas. Finalmente, los dos últimos apartados se centran en un estudio detallado de las capacidades destacadas de las cepas para su potencial aplicación como herramienta biotecnológica para la producción de enzimas o como agentes útiles para biorremediación.

4.1. Comparación de las actividades de la colección según entorno de origen

La colección de microorganismos a partir de la que se efectuó la búsqueda de las cepas de interés procedía de tres ambientes diferentes: suelo rizosférico, material sometido a compostaje y sedimentos de alpechín. Diversos estudios han demostrado que las condiciones prevalentes en un determinado ambiente influyen en la diversidad y funcionalidad de la microbiota (Chen et al., 2019; Thakur et al., 2019). Por esta razón se espera que ciertas actividades microbianas estén más representadas en unas muestras que en otras. De hecho, la selección de una muestra adecuada es prerequisite para una búsqueda exitosa de una actividad microbiana concreta.

En la Figura 15 se muestra el porcentaje de cepas de cada colección, según muestra de aislamiento, que expresaron actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de polímeros y que fueron seleccionadas por su interés biotecnológico. Estas actividades se agruparon en cuatro clases: lipasas, proteasas, carbohidrasas (amilasas, celulasa, xilanasas y pectinasas) y ligninasas. Todas las actividades enzimáticas analizadas estuvieron presentes en las cepas procedentes de compost y sedimentos de alpechín, mientras que la actividad lipasa no se detectó en las cepas de suelo. La actividad mayoritaria en todos los casos fue la proteolítica. En concreto, el 90% de las cepas de compost, el 70% de las cepas de sedimentos de alpechín y el 50% de cepas de suelo mostraron actividad proteasa. Las carbohidrasas estuvieron presentes en alrededor del 40% de las cepas de los tres orígenes y la actividad ligninolítica fue mayoritaria en cepas de sedimentos de alpechín. El 50% de las cepas procedentes de dicha muestra presentaron actividad ligninasa frente al 30% de las cepas de las otras dos muestras. Este hecho no resulta sorprendente dada la riqueza de la muestra origen en polifenoles, tal y como se discute con posterioridad. Por el contrario, fue sorprendente detectar mayor número de microorganismos con actividad lipasa en cepas de compost (40%) que en cepas de sedimentos de alpechín (20%), un entorno, este último bastante hidrofóbico y en el que se esperaba una mayor presencia de cepas lipolíticas. En general, las cepas procedentes de suelo fueron las que exhibieron menor número de actividades, mientras que las de compost destacaron por presentar un amplio abanico de actividades. Estos resultados muestran que las pilas de compostaje constituyen una excelente fuente de microorganismos con interés biotecnológico. Esto puede explicarse por la gran variedad de sustratos y constantes cambios que se producen durante el proceso de compostaje, que promocionan la proliferación de microorganismos con una amplia diversidad metabólica necesaria para degradar materia orgánica (Moreno y Moral, 2008). Entre las actividades dominantes durante el compostaje destacan las que permiten la degradación de la lignocelulosa, que implican la intervención de carbohidrasas (celulasas y xilanasas) y ligninasas, ambas ampliamente representadas en la colección de aislados de muestras de compost.

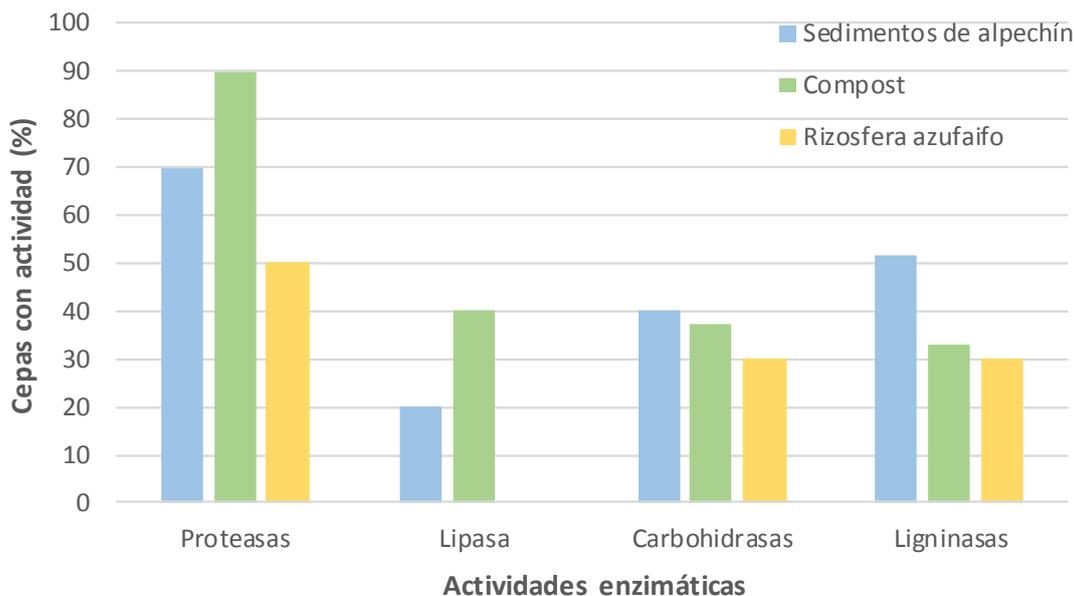


Figura 15. Comparación de la presencia de actividades enzimáticas en cepas aisladas a partir de compost, sedimentos de alpechín y rizosfera de azufaifo. Se muestra el porcentaje de cepas de cada colección que presentaron las actividades correspondientes.

La Figura 16 muestra el porcentaje de microorganismos de cada ambiente que expresaron actividades enzimáticas del grupo ligninasas. La presencia de esta actividad está relacionada con la capacidad para degradar compuestos altamente recalcitrantes y, por consiguiente, con aplicación en biorremediación. Entre otras, se asocian con la degradación de compuestos fenólicos. Destacaron las cepas aisladas a partir de sedimentos de alpechín, dado que el 100% de estas cepas presentaron actividad peroxidasa y exclusivamente las cepas procedentes de este ambiente expresaron actividad ligninasa según el test de Sundman (40%). Estos resultados concuerdan con las características de la muestra origen. El alpechín presenta compuestos análogos estructuralmente a la lignina en su composición, tales como taninos y distintos polifenoles como tirosol, ácido p-cumárico, luteolina, oleuropeína e hidroxitirosol (Cabrera et al., 1997). Estos compuestos, por su carácter antimicrobiano, ejercen una presión selectiva en las comunidades microbianas capaces de proliferar en sedimentos de alpechín (Martínez-Gallardo y col., 2020), por lo que es lógico que las especies estudiadas en este ambiente tengan una mayor capacidad para degradar dichos compuestos recalcitrantes y por ende un mayor potencial como agentes con aplicación en biorremediación.

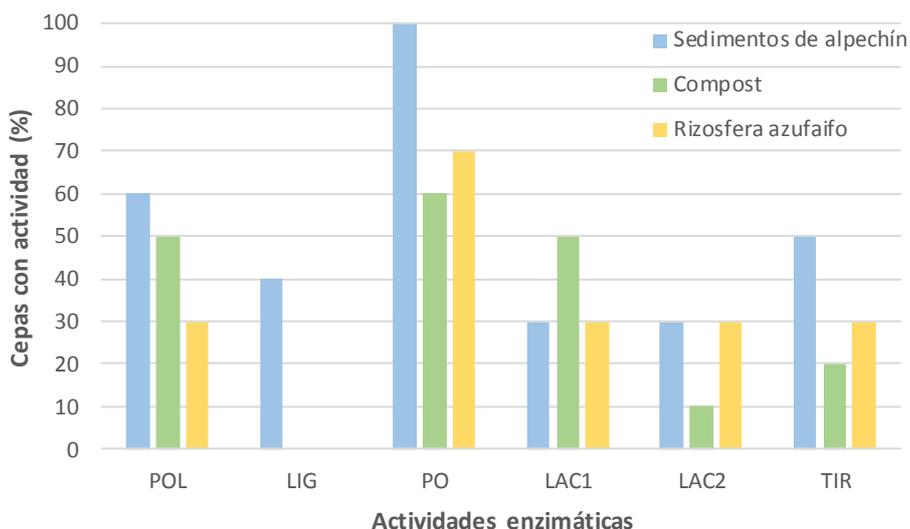


Figura 16. Comparación de la presencia de actividades enzimáticas de interés para biorremediación en cepas aisladas a partir de compost, sedimentos de alpechín y rizosfera de azufaifo. Se muestra el porcentaje de cepas de cada colección que presentaron las actividades correspondientes. POL: Polifenoloxidasas; LIG: Ligninasa; PO: Peroxidasas; LAC1 y LAC2: Lacasa 1; TIR: Tirosinasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el compost parece el entorno más adecuado para la búsqueda de microorganismos con actividades enzimáticas que se han catalogado en este trabajo como de interés biotecnológico, mientras que los sedimentos de alpechín constituyen un ambiente idóneo para obtener microorganismos de interés en biorremediación por la presencia de actividad ligninolítica. El suelo rizosférico de azufaifo, por el contrario, alberga menos microorganismos con actividades degradadoras de polímeros orgánicos, lo que podría estar relacionado con una actividad degradadora de la materia orgánica compleja menos intensa debido a un menor acceso de detritus en dicho entorno.

4.2. Selección e identificación de cepas en función de sus capacidades enzimáticas

El análisis de las actividades enzimáticas exhibidas por la colección de cepas en estudio permitió seleccionar cepas de acuerdo al perfil enzimático. Las cepas que expresaron al menos dos actividades enzimáticas preferentemente dentro del grupo de carbohidrasas, lipasas y proteasas se catalogaron como de interés biotecnológico, mientras que las cepas con amplio rango de actividades relacionadas con la degradación de la lignina fueron seleccionadas como cepas de interés en biorremediación. Cuando se cumplieron ambos criterios, las cepas se incluyeron en los dos grupos. En la Tabla 17 se muestran las cepas que se seleccionaron para cada tipo, así como los resultados de su identificación y su perfil enzimático. Se seleccionaron un total de 12 cepas de interés biotecnológico (5 bacterias, 5 hongos y 2 actinomicetos), 6 de interés en biorremediación (1 bacteria y 5 hongos) y 2 cepas (1 bacteria y 1 actinomiceto) mostraron actividades con potencial aplicación en ambos. Todas las cepas procedieron de la colección de aislados de sedimentos de alpechín o compost, ya que ninguna cepa aislada de suelo rizosférico cumplió con los requisitos establecidos.

Tabla 17. Identificación de cepas seleccionadas por actividades enzimáticas e interés biotecnológico y en biorremediación

Especie	Código de cepa*	Grupo	Nº de acceso	Pares de bases	Porcentaje de similitud (%)	Actividades enzimáticas**	Selección***
<i>Bacillus smithii</i>	BC 1958	Bacteria	EU652724.1	1348	99	PR, AMI, PO	BT
<i>Bacillus licheniformis</i>	BC 2867	Bacteria	HM753634.1	1389	99	PR, AMI, PO	
<i>Cladosporium lignicola</i>	HC 4424	Hongo	GU721592.1	597	99	PR, AMI, POL	
<i>Hongo no cultivado</i>	HC 4839	Hongo	FN397262.1	599	99	PR, AMI, LI, PEC, XI, POL, PO, LAC1	
<i>Fusarium delphinoides</i>	HC 4993	Hongo	EU926231.1	602	99	PR, LI, PEC, XI, POL, TIR	
<i>Fusarium delphinoides</i>	HC 4995	Hongo	EU926231.1	602	100	PR, LI, PEC, XI, POL, TIR	
<i>Streptomyces koyangensis</i>	ASA 3	Actinobacteria	CP031742.1	864	100	PR, AMI, PEC, XIL, LI, PO	
<i>Streptomyces koyangensis</i>	ASA 4	Actinobacteria	KM678242.1	869	99	PR, AMI, PO	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	BSA 14	Bacteria	MT065791.1	850	100	PR, LI, PO	
<i>Bacillus flexus</i>	BSA 18	Bacteria	LC512760.1	866	100	PR, LI, POL, LI, PO	
<i>Erwinia billingiae</i>	BSA 23	Bacteria	MK072688.1	1380	100	PR, PO	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	HSA 21	Hongo	KT803068.1	581	100	AMI, PEC, XIL, CEL, POL, PO, TIR	
<i>Bacillus altitudinis</i>	BC 1983	Bacteria	KC441789.1	1373	100	PR, PO, LAC1	BR
<i>Aspergillus protuberus</i>	HSA 6	Hongo	KX894661.1	603	100	PR, AMI, XIL, POL, POL, LAC1, LAC2, TIR	
<i>Pleurostoma richardsiae</i>	HSA 10	Hongo	MG966406.1	380	100	PR, AMI, LI, XIL, POL, PO, LAC1, LAC2, TIR	
<i>Scedosporium apiospermum</i>	HSA 16	Hongo	KP132631.1	593	100	PEC, XIL, POL, PO, LAC1, LAC2, TIR	
<i>Cosmospora viridescens</i>	HSA 21	Hongo	MF782760.1	-	100	PEC, POL, LI, PO, TIR	
<i>Pyrenochaeta unguis-hominis</i>	HC 4521	Hongo	KC785563.1	588	98	LI, CEL, POL, LAC1, LAC2, TIR	
<i>Bacillus subtilis</i>	BC 2155	Bacteria	JX042467.1	1494	99	PR, AMI, PEC, PO, LAC1	BT y BR
<i>Streptomyces albus</i>	AC 2815	Actinobacteria	JN400097.1	1439	99	PR, PEC, PO, LAC1	

*Códigos de cepas según Tabla 3. BC-bacteria de compost; HC-hongo de compost; AC-actinomiceto de compost; ASA-actinomiceto de sedimentos de alpechín; BSA-bacteria de sedimentos de alpechín; HSA-hongo de sedimentos de alpechín

** PR: proteasa; AMI: amilasa; PO: Lignina peroxidasa ; POL: Polifenol oxidasa; LI: lipasa; PEC: Pectinasa; XI: Xilanasas; LAC1: Lacasa; LAC2: Lacasa ; TIR: Tirosinasa; CEL: Celulasa

*** BT: cepas de interés biotecnológico; BR: cepas de interés para biorremediación

Entre las cepas seleccionadas destacaron por su amplio perfil enzimático la bacteria *Bacillus subtilis* BC 2155, el actinomiceto *Streptomyces albus* AC 2815 y el hongo *Fusarium delphinoides* HC 4993. El género *Bacillus* ha sido empleado históricamente para la producción de proteasas, aunque muchas cepas presentan un rendimiento limitado. Pastor et al., (2001) optimizaron la producción de esta enzima utilizando altas concentraciones de harina de semillas de amaranto en el medio de cultivo como inductor, y variando parámetros como la aireación, obteniendo unos incrementos en la producción de enzima de hasta el 400% respecto del medio de cultivo de referencia. Otros trabajos también han confirmado la producción de pectinasas por *Fusarium delphinoides*. Así, Gómez et al. (2005) que pusieron de manifiesto que el género *Fusarium* es un gran productor de pectinasas reportando la presencia de pectatoliasas y endopoligalacturonasas. Así mismo, Mitola et al., (2001) demostraron que hongos del género *Fusarium* aislados de un matadero de Venezuela eran los causantes mayoritarios de alteración de la carne debido a su elevada producción de proteasas.

Otras especies seleccionadas en este trabajo y que presentan interés para su aplicación en biorremediación tales como los hongos *Aspergillus ochraceus* HSA 21, *Scedosporium apiospermum* HSA 16 y *Cosmospora viridescens* HSA 21 han sido descritas también en estudios previos con capacidades similares. Así, Martínez-Gallardo et al. (2020) demostraron que un consorcio compuesto por los hongos *Aspergillus ochraceus* y *Scedosporium apiospermum* fue eficaz para la biorremediación de suelos contaminados por alpechín, aplicando técnicas de compostaje y landfarming bioaumentadas con dicho consorcio, confirmando así el interés en biorremediación de dichos hongos. Así mismo, Duarte et al., (2018) detectaron la producción de enzimas en cepas del género *Cosmospora* aisladas a partir de un ambiente tan selectivo como suelos de la Antártida. Dichas cepas presentaban capaces de producir ligninasas adaptadas al frío, lo que representa un gran potencial para la descontaminación de suelos u otros ambientes con bajas temperaturas.

4.3. Microorganismos de interés biotecnológico: producción de enzimas

En las cepas que mostraron un mayor rango de actividades enzimáticas de interés biotecnológico o cuya actividad enzimática, de acuerdo con la lectura de las pruebas de rastreo en medios sólidos, fue destacable, se cuantificó la producción de las enzimas. En la primera categoría se incluyó *Fusarium delphinoides* HC 4993, en el cual se analizó la producción de lipasa, proteasa, pectinasa, xilanasas y celulasas. En la segunda categoría se incluyeron la bacteria *Bacillus smithii* BC 1958, que mostró el mayor halo de aclaramiento de los medios para la detección de las actividades amilasa y proteasa, y el actinomiceto *Streptomyces albus* AC 2815, que también demostró una elevada actividad proteasa en el medio de cultivo para dicha actividad. En la Tabla 18 se muestran los resultados de la cuantificación de la producción de las enzimas para cada una de las cepas indicadas, que se expresan en actividad enzimática relativa (AE) y específica (AEp) de los extractos enzimáticos obtenidos tras el cultivo de las mismas en medios líquidos con inductores de la actividad concreta.

Tabla 18. Producción de enzimas de interés biotecnológico por cepas seleccionadas

Especie	Enzima	AE* ($\mu\text{g}/\text{mL min}$)*	AEp** ($\mu\text{g}/\mu\text{g proteínas min}$)
<i>Fusarium delphinoides</i> HC 4993	Lipasa	0,041	0,01
	Proteasa	10,08	0,13
	Pectinasa	43,25	1,12
	Xilanasa	60,45	2,52
	Celulasa	1,90	0,29
<i>Bacillus smithii</i> BC 1958	Amilasa	2,75	0,39
	Proteasa	14,49	0,17
<i>Streptomyces albus</i> AC 2815	Proteasa	14,05	0,20

AE: Actividad enzimática relativa (producto liberado por volumen y tiempo)

AEp: Actividad enzimática específica (producto liberado por peso de proteínas y tiempo)

Fusarium delphinoides HC 4993 fue la especie con un mayor rango de actividades enzimáticas cuantificadas, alcanzando unos niveles elevados de producción de proteasa (10 $\mu\text{g}/\text{mL min}$), pectinasa (43 $\mu\text{g}/\text{mL min}$) y principalmente de xilanasa (60 $\mu\text{g}/\text{mL min}$). En numerosos trabajos indica que el género *Fusarium* constituye una “caja de herramientas” prometedora para la biotecnología industrial, no solo por su amplio abanico enzimático, especialmente proteasa, lipasa, celulasa y xilanasa, sino también por su demostrada capacidad para producir biocombustibles, biosaborizantes, pigmentos y otros metabolitos secundarios activos (Ferreira et al., 2016; Pessôa, 2017; Sarsaiya et al., 2019). Así por ejemplo, Indira et al. (2016) utilizaron el agua de un arrozal que contenía restos vegetales para la búsqueda y selección de cepas fúngicas con actividad celulasa. En este estudio se purificó y caracterizó una celulasa producida por una cepa de *Fusarium subglutinans* en un medio con paja de arroz como fuente de carbono, que además presentaba una mayor actividad enzimática que las demás cepas estudiadas. Por su parte, Panagiotou et al. (2011) estudiaron la capacidad de *Fusarium oxysporum* y una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* como consorcio microbiano para la hidrólisis y fermentación alcohólica simultáneos de la paja de trigo, obteniendo elevados rendimientos de conversión en etanol debidos a la producción de xilanasas por parte de este hongo. Además, *Fusarium oxysporum* es una especie fitopatógena que provoca marchitez vascular en diversos cultivos. La actividad patógena está relacionada con la capacidad del hongo para penetrar y colonizar el sistema vascular de la planta mediante la producción de enzimas extracelulares que rompen la pared vegetal, siendo el xilano uno de los componentes de las paredes celulares (hemicelulosa). Es por esto que, para superar las barreras estructurales del hospedador, dicho patógeno produce un complejo enzimático de xilanasas. En el trabajo desarrollado por Gómez (2001) realizaron una caracterización molecular de los genes XYL14 y XYL15 que codifican para la producción de endoxilanasas en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Además, hay otra barrera física entre el patógeno y el contenido interno de las células de las plantas llamada lámina media, cuyo compuesto principal es la pectina, que supone una importante fuente nutricional para los microorganismos. García y Martínez (2005) trabajaron sobre el análisis de la inducción de dos enzimas pectinolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*-Clavel, obteniendo resultados relevantes que muestran la inducción de la

expresión de las enzimas endopoligalacturonasas en presencia de ácido poligalacturónico y pectina, compuestos presentes en la estructura vegetal.

Bacillus smithii BC 1958 produjo una cantidad relevante de proteasa (14,5 µg/mL min) y menor de amilasa (2,7 µg/mL min)). La mayoría de las proteasas del género *Bacillus* son muy activas y estables a diferentes rangos de temperatura y pH, además de ofrecer ciertas facilidades para su purificación con un coste económico reducido (Jellouli et al., 2009). En el trabajo realizado por Solorzano, (2018) se aislaron 34 cepas de *Bacillus* de suelo y se cuantificó la producción de enzimas, obteniendo hasta 11 especies capaces de producir tanto amilasa como proteasa. Otros autores también reportan la actividad amilasa por el género *Bacillus*, Así, Vaikundamoorthy et al. (2018) trabajaron con una amilasa termoestable producida por *Bacillus cereus* con potencial actividad antibiofilm con excelentes resultados en la inhibición de la formación completa de biofilms por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

En el caso de *Streptomyces albus* AC 2815, la producción de proteasa fue de 14 µg/mL min. El género *Streptomyces* ha sido estudiado por diferentes autores como excelente productor de amilasa, enzima ampliamente utilizada en numerosas industrias con aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo la mejora de la calidad y vida útil del pan de trigo (Ashwini y Kumar 2016; Zhang et al., 2019).

Cabe destacar que los resultados de producción de enzimas obtenidos para las cepas seleccionadas son potencialmente mejorables mediante la optimización de los medios de cultivo y las condiciones de operación, con el objeto de minimizar los costes de producción y maximizar la eficiencia (Kennedy et al., 2009). Para ello, se analizan y varían parámetros que influyen en el crecimiento y producción de estas enzimas, tales como los requerimientos nutricionales, temperatura, inductores, tiempo de incubación o pH, entre otros (Kalpana et al., 2008). Así por ejemplo, Asha y Palaniswamy (2018) optimizaron la producción de una proteasa alcalina por *Bacillus cereus*, e identificaron el período de incubación, la presencia de surfactantes, el pH y las fuentes de carbono y nitrógeno como los parámetros más relevantes para obtener un mayor rendimiento en la producción de esta enzima, cuyos resultados de producción enzimática mejoraron respecto de las condiciones iniciales de cultivo. Por su parte, Simair et al. (2017) optimizaron las condiciones para la producción de amilasa por una cepa termófila de *Bacillus*, probando los efectos que producían la variación de pH, velocidad de agitación, el tamaño del inóculo, y de las fuentes de carbono y nitrógeno, obteniendo mejores resultados en el caso de la melaza y el extracto de carne de res, respectivamente, y con unas condiciones de cultivo de 60 h de incubación con agitación (150 rpm) a 50 ° C y pH 8.

4.4. Microorganismos de interés en biorremediación: degradación del tirosol

Para el análisis de la eficacia de cepas para su potencial empleo en biorremediación se empleó la colección íntegra de cepas procedentes de sedimentos de alpechín, dado que, como se indicó previamente, en general mostraron actividades relacionadas con el metabolismo de la lignina, que se relaciona con uso indicado. La eficacia se evaluó mediante la medida de la degradación de una molécula

recalcitrante modelo, el polifenol tirosol, como un indicador de interés en biorremediación. En la Figura 17 se muestran los resultados de dicho análisis. Las cepas fúngicas y los actinomicetos fueron más eficientes en la degradación de tirosol que las bacterias. Cabe destacar que todas las cepas estudiadas en este ambiente presentan cierto grado de degradación de tirosol. Esto puede ser debido a que el alpechín presenta dicho compuesto que le proporciona un efecto antimicrobiano (Cabrera et al., 1997). De este modo, actuaría ocasionando una presión selectiva que promueve el dominio de las cepas que puedan colonizar dicho ambiente por especies que, al menos toleren la presencia de dicho compuesto, o incluso tener la capacidad de utilizarlo como fuente de carbono y energía. Esta última actividad es la que se demostró en los hongos *Scedosporium apiospermum* HSA 16, *Cosmospora viridescens* HSA 21 y *Aspergillus protuberus* HSA 6 y las dos cepas del actinomiceto *Streptomyces koyangensis*, ASA 3 y ASA 4, cuyos niveles de degradación o consumo del tirosol estuvieron cercanos al 100%, es decir fueron capaces de eliminar completamente dicho compuesto del medio de cultivo, en el que estuvo incorporado como única fuente de carbono.

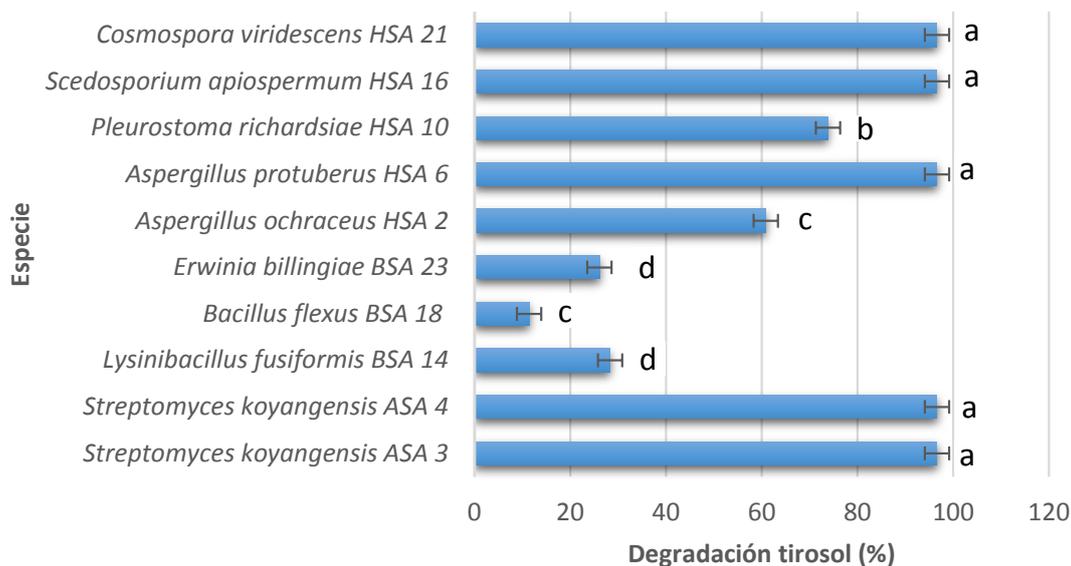


Figura 17. Degradación de tirosol por las cepas aisladas de sedimentos de alpechín. Los resultados son la media (n=3), las barras de error corresponden al valor del intervalo LSD de Fisher ($p < 0,05$). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron obtener las siguientes conclusiones

1. Los microorganismos procedentes de material sometido a compostaje presentan un amplio rango de actividades enzimáticas de interés biotecnológico y las correspondientes a sedimentos de alpechín tienen unas capacidades idóneas para su uso en biorremediación.

2. El hongo *Fusarium delphinooides* HC 4993, la bacteria *Bacillus smithii* BC 1958, y el actinomiceto *Streptomyces albus* AC 2815 se proponen como las mejores cepas para la producción de enzimas de utilidad para diversas aplicaciones.
3. Los hongos *Scedosporium apiospermum* HSA 16, *Cosmospora viridescens* HSA 21 y *Aspergillus protuberus* HSA 6 y las dos cepas del actinomiceto *Streptomyces koyangensis*, ASA 3 y ASA 4, son capaces de eliminar completamente el compuesto recalcitrante tirosol, por lo que se podrían emplear para biorremediación.

6. Bibliografía

- Abd EL, Aziz ABED, Awad AAEN, Zaki GH (2015). Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. Trends in Industrial Biotechnology Research 1, 1-9.
- Accinelli C, Screpanti C, Vicari A, Catizone P (2004). Influence of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on the degradation of glyphosate and glufosinate-ammonium in soil samples. Agriculture, Ecosystems & Environment 103, 497-507.
- Albertsson AC, Karlsson S (1990). The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. Progress in Polymer Science 15, 177-192.
- Arora DS, Chander M, Gill PK (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. International Biodeterioration & Biodegradation 50, 115-120.
- Asha B, Palaniswamy M (2018). Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. Journal of Applied Pharmaceutical Science 8, 119-127.
- Ashwini, K, Kumar S (2016). Partial purification of alpha-amylase from marine *Streptomyces gancidicus*-ASD_KT852565. Research Journal of Pharmacy and Technology 9, 731-734.
- Beard J (2006). DDT and human health. The Science of the Total Environment 355, 78-89.
- Berdugo DC (2014). Producción de lacasa a través de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes pubescens*, en cultivos sólidos y semisólidos de desechos agro-industriales. Memoria de Tesis. Uniandes. Bogotá.
- Bidlack J, (1992). Molecular structure and integration of components of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science 72, 51-56.
- Biundo A, Ribitsch D, Steinkellner G, Gruber K, Guebitz GM (2017). Polyester hydrolysis is enhanced by a truncated esterase: less is more. Biotechnology Journal 12, 8.
- Buswell JA, Odier O (1987). Lignin biodegradation. Critical Reviews in Biotechnology 6, 1-60.
- Cabrera F, López R, Martín P, Murillo JM (1997). Aprovechamiento agronómico de compost de alpechín. Fruticultura Profesional 88, 94-105.
- Calvo Fernández Á (2013). Gestión integral de residuos de almazara mediante combinación de procesos físico-químicos. Memoria de Tesis. Universidad de Valladolid. Valladolid.
- Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Applied Microbiology and Biotechnology 54, 751-758.
- Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. BMC Microbiology 12, 251.
- Carson R. (1962). Silent Spring. Mifflin Company. Boston, Houghton.
- Chakraborty S, Ghosh M, Chakraborti S, Jana S, Sen KK, Kokare C, Zhang L (2015). Biosurfactant produced from *Actinomyces nocardioformis* A17: characterization and its biological evaluation. International Journal of Biological Macromolecules 79, 405-412.
- Chen J, McIlroy SE, Archana A, Baker DM, Panagiotou G (2019). A pollution gradient contributes to the taxonomic, functional, and resistome diversity of microbial communities in marine sediments. Microbiome 7, 104.

- Choubane S, Khelil O, Cheba BA (2015). *Bacillus* sp. R2 α -amylase production optimization: Pasta cooking water as medium of amylase production. *African Journal of Biotechnology* 14, 3184-9.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 3240-3244.
- Corona-Cruz A., Gold G, Gutierrez M, Monroy O, Favela E (1999). Anaerobic-aerobic biodegradation of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 219-225.
- Cortez IA (2015). Obtención de xilanasa con micelios de *Penicillium corylophilum* y *Aspergillus terreus* fermentados en desechos de piña y maracuyá. Memoria de Tesis. Universidad del Este. Quito.
- Couto SR, Toca-Herrera JL (2006). Lacasses en la industria textil. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 1, 115-120.
- Crawford RL, Rosenberg E (2013). Bioremediation. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson FL (Eds.). *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. Springer. Berlin, Germany.
- Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48, 1532-1552.
- Diaz R, Sánchez C, Días G (2014). Laccase gene expression of *Pleurotus ostreatus* grown at different pH of the liquid culture medium. In: Singh M (Ed). *Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*; New Delhi. 238-242.
- Domínguez O, Ramos-Leal M, Manzano AM., Sánchez MI, Sánchez A, Torres G, Guerra G (2010). Biodegradación de DDT por dos cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca. *CENIC. Ciencias Biológicas* 41, 1-12.
- Emadian SM, Onay TT, Demirel B (2016). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management* 59, 526–536.
- Ertugrul S, Donmez G, Takac S (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials* 149, 720-724.
- Eş I, Vieira JDG, Amaral AC (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2065-2082.
- Falcón MA, Rodríguez A, Carnicero A. (1995). Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife Island. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 121-126.
- Farnet AM, Qasemian L, Goujard L, Gil G, Guiral D, Ruaudel F, Ferre E (2010). A modified method based on p-nitrophenol assay to quantify hydrolysis activities of lipases in litters. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 386-389.
- Félix NFE, Vaca M, Izurieta B (2014). Obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz. *Revista Politécnica* 33.
- Ferreira JA, Mahboubi A, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. *Bioresource Technology* 215, 334-345.
- Finley SL, Broadbelt V, Hatzimanikatis V (2010). In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1,2,4-trichlorobenzene. *BMC Systems Biology* 4, 7.
- Franco S (1985). La apoteosis del DDT y el problema de la erradicación del paludismo en América Latina. *Nueva Antropología* 7, 129-152.
- Gafar MO, Dagash MI, Elhag AZ, Hassan YO (2011). Residual Effect of Malathion (Organophosphate) and Sevin (Carbamate) application on potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Experimental Agriculture* 226-230.
- Ganey PE, Boyd SA (2005). An approach to evaluation of the effect of bioremediation on biological activity of environmental contaminants: dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Environmental Health Perspectives* 113, 180-185.
- García LG, Martínez ST (2005). Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*-Clavel. *Revista Colombiana de Química* 34, 25-34.
- García, R, Peralta P. (2008). Cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1-12.
- Geok LP, Razak, CNA, Abd Rahman RNZ, Basri M, Salleh AB (2003). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical Engineering Journal* 13, 73-77.
- Glazer AN, Nikaido H (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Second edition. Cambridge University Press. Berkley, California.

- Gómez L, Martínez ST (2005). Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* - Clavel. Revista Colombiana de Química 34, 25-34.
- Gómez, EDRG (2001). Caracterización molecular de xy14 y xy15, dos genes responsables de endoxilanasas en *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; estudio de su expresión e implicación en patogénesis Memoria de Tesis. Universidad de Córdoba). Córdoba, España.
- Gómez-Martínez C, Láinez-González M, Martínez-Hernández S (2019). Aislamiento de microorganismos celulolíticos del sistema digestivo de *Ptichopus angulatus* Leach, 1815 (*Coleoptera: passalidae*) con potencial aplicación para biocombustibles. Entomología Mexicana 6, 396–400.
- Gong J, Kong T, Li Y, Li Q, Li Z, Zhang J (2018). Biodegradation of microplastic derived from poly(ethylene terephthalate) with bacterial whole-cell biocatalysts. Polymers 10, 1326.
- Guisado G, (2008). Aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial y/o ambiental a partir de materiales sometidos a compostaje. Memoria de Tesis. Universidad de Almería. Almería, España.
- Haki G, Rakshit S (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. Bioresource Technology 89, 17-34.
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycología 67, 597-607.
- Hay AG, Focht, DD (1998). Cometabolism of 1, 1-dichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. Applied and Environmental Microbiology 64, 2141-2146
- He L, Bickerstaff GF, Paterson A, Buswell JA (1993). Purification and partial characterization of two xylanases that differ in the hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. Enzyme and Microbial Technology 15, 13–18
- Hermoso M, Uceda M, García A, Morales B, Prías ML, Fernández A, (1991). Elaboración del Aceite de oliva de calidad. Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera (Ed). Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Primera edición. Sevilla, España.
- Higuchi T (1993). Mechanism of biodegradation of lignin by white rot basidiomycetes. Journal of Biotechnology 30, 1-8.
- Indira D, Sharmila D, Balasubramanian P, Thirugnanam A, Jayabalan R (2016). Utilization of sea water based media for the production and characterization of cellulase by *Fusarium subglutinans* MTCC 11891. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 7, 187–192.
- Janshekar H, Haltmeier T, Brown C, (1982). Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 14, 174-181.
- Jellouli K, Bougatef A, Manni L, Agrebi R., Siala R, Younes I, Nasri M (2009). Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 36, 939-948.
- Jolivet S, Arpin N, Wichers HJ, Pellon G (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. Mycological Research 102, 1459-1483.
- Joshi AG, Pathak AR (2019). EST (Expressed Sequence Tag): A Technique for Identification of Plant Secondary Metabolite Genes. In: Plant and Human Health, Vol 2, 207-225. Springer, Switzerland
- Jun Y, Yu Y, Wei-Min W, Jiao Z, Lei J (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. Environmental Science & Technology 48, 13776–13784.
- Jurado M, López MJ, Suárez-Estrella F, Vargas-García MC, López-González JA, Moreno J (2014). Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. Bioresource Technology 162, 283-293.
- Kalpana DM, Rasheedha BA, Gnanaprabhai GR, Pradeep BV, Palaniswamy M (2008) Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Journal of Science and Technology 1, 1-6.
- Kennedy MJ, Reader SL, Krouse D, Hinkley, S (2009). Process optimization strategies for biotechnology products: from discovery to production. Fundamentals in Biotechnology. First edition. Vol 4 4, 131. Discovery to Production, New Zeland.
- Khan JA, Briscoe S (2011). A study on partial purification and characterization of extracellular alkaline amylases from *Bacillus megaterium* by solid state fermentation. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 2, 37-46.
- Khannous L, Jrad M, Dammak M, Miladi R, Chaaben N, Khemakhem B, Néji G, Fendri I (2014). Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. Lipids in Health and Disease 13, 9.

- Kirana S, Arshada Z, Nosheenb S, Kamala S, Gulzara T, Majeeda MS, Rafiquec MA (2016). Microbial lipases: production and applications: a review. *Journal of Biochemistry Biotechnology and Biomaterials* 1, 7-20.
- Kruger NJ (2009). *The Bradford method for protein quantitation*. First edition. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Li DC, Zhang SH, Liu KQ, Lu J (2004). Purification and partial characterization of a chitinase from the mycoparasitic fungus *Trichothecium roseum*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 50, 35-39.
- Li FX, Li S, Zhoua L, Zhuanga F, Caoa D, Huanga W, Xua T (2010). Enhanced reductive dechlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide. *Environmental Pollution* 158, 1733-1740.
- Litthauer D, van Vuuren MJ, van Tonder A, Wolfaardt, FW (2007) Purification and kinetics of a thermostable laccase of *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology* 40, 563-568.
- Llop C, Pérez A (2011) Technology available for recycling agricultural mulch film. *Makromolekulare Chemie Macromolecular Symposia* 57, 115–121
- López MJ, Guisado G, Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Moreno J (2006). Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 42-45.
- MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A, Ramón D (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*: a review. *Journal of Biotechnology* 96, 43-54.
- Maciel MJM, Ribeiro HCT (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology* 13, 14-15.
- Mageswari A, Subramanian P, Chandrasekaran S, Sivashanmugam K, Babu S, Gothandam KM (2012). Optimization and immobilization of amylase obtained from halotolerant bacteria isolated from solar salterns. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 10, 201-208.
- Martínez-Gallardo MR, López MJ, Jurado MM, Suárez-Estrella F, López-González JA Sáez, JA, Moreno, J (2020). Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of The Total Environment* 703, 135537.
- McKay AM (1988) A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiology Letters* 56, 355–358.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Mishra PC, Mohanty RK, Dash MC (1979). Enzyme activity in subtropical surface soils under pasture. *Indian Journal of Agricultural Chemistry* 12, 19–24.
- Mitola G, Escalona F, Ledesma A (2001). Queratinolisis causada por hongos no dermatofitos aislados de una tenería y un matadero en Maracaibo-Venezuela: revisión de la expresión morfológica. *Kasmera*, 209-226.
- Molitor R, Bollinger A, Kubicki S, Loeschcke A, Jaeger KE, Thies S (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology* 13, 274-284.
- Morales SMB, Castelblanco EMS, Suárez HJG (2014). Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Sennova* 1, 148-155.
- Moreno JC, Mormeneo SC (2008). *Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje*. Compostaje, 112-citation_lastpage.
- Nagarathamma R, Bajpai P (1999). Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chloride bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1078-1082.
- Niaounakis M, Halvadakis CP (2003). *Olive-Mill Waste Management: Literature review and Patent Survey*. First edition. George Dardanos Publications. Athens, Greece.
- Nikolaivits E, Kanelli M, Dimarogona M, Topakas E, Nikolaivits E, Kanelli M (2018) A middle-aged enzyme still in its prime: recent advances in the field of cutinases. *Catalysts* 8, 612.
- Ninnekar H, C Kamanavalli (2004). Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* Species. *Current Microbiology* 48, 10-13.
- Panagiotou G, Topakas E, Moukouli M, Christakopoulos P, Olsson L (2011). Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 35, 3727-3732.

- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35, 1153-1169.
- Pastor MD, Lorda GS, Balatti A (2001). Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 6-9.
- Pessôa MG, Paulino BN, Mano MCR, Neri-Numa IA, Molina G, Pastore GM (2017). *Fusarium* species - a promising tool box for industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 3493-3511.
- Polizeli ML, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67,577-591.
- Quensen JF, Mueller SA, Jain MK, Tiedje JM (1998). Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms. *Science* 280, 722-724.
- Rabinovich ML, Boloboba AV, Vasil'chenko LG (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 5-23.
- Rayner ADM, Boddy L (1988). *Fungal decomposition of wood. Its Biology and Ecology*. First edition. John Wiley & Sons Ltd, Bath, United Kingdom
- Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, 110.
- Restrepo-Flórez J, Bassi A, Thompson MR (2014) Microbial degradation and deterioration of polyethylene: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 88, 83–90.
- Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FI, Saso L, Díaz P (2007). *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated. *Applied Biochemistry and Microbiology* 73, 2423-2431.
- Ryan SM, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2006) Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Applied Biochemistry and Microbiology* 72, 5289-5296.
- Saini R, Saini HS, Dahiya A (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6, 1865-1871.
- Samanta S (2019). Microbial pectinases: a review on molecular and biotechnological perspectives. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9, 248-266.
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* 5, 5990-5999.
- Sankari D, Divagar M (2014) Comparative analysis of amylase production by *Proteus* sp from different soil habitat. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7, 322-325.
- Santo M, Weitsman R, Sivan A (2013) The role of the copper-binding enzyme—laccase—in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 84, 204–210.
- Sarsaiya S, Jain A, Awasthi SK, Duan Y, Awasthi MK, Shi J (2019). Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology* 291, 121905.
- Schuster A, Schmoll M, (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology & Biotechnology* 87, 787–799.
- Sedano JCS, Carrascal CEL (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad* 16, 101-113.
- Semeena VJ, Feichter G, Lammel. 2006. Impact of the regional climate and substance properties on the fate and atmospheric long-range transport of persistent organic pollutants - Examples of DDT and γ -HCH. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 1231-1248.
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2837-2853.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: a review. *Biotechnology Advances* 26, 246–265.
- Simair AA, Qureshi AS, Khushk I, Ali CH, Lashari S, Bhutto, MA, Lu, C (2017). Production and partial characterization of the α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International* 9.
- Singh S, S Hyun Kang A, Mulchandani W, Chen (2008). Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 437-444.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Singleton VL, Orthofer R,

- LamuelaRaventós, RM (Eds.). *Methods in Enzymology*, Vol 299, 152-178. Elsevier Ltd., London, United Kingdom.
- Solorzano PLI (2018). Producción de amilasas y proteasas por *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo. Memoria de Tesis. Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú.
- Souilem S, El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A, Sayadi S, Galanakis CM (2017). Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges. Galanakis CM (Ed). *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*, Vol 1, 1-28. Academic Press, Chania, Greece
- Sundman V, Näse L (1972). The synergistic ability of some wood-degrading fungi to transform lignins and lignosulfonates on various media. *Archiv für Mikrobiologie* 86, 339-348.
- Szijarto N, Szengyel Z, Lidén G, Réczey, K 2004 Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, 115-124
- Tanyildizi MS, Ozer D, Elibol M (2007). Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Journal Engineering* 37, 294–297
- Thakur MP, van der Putten, WH, Cobben MM, van Kleunen M, Geisen S (2019). Microbial invasions in terrestrial ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 17, 621-631.
- Thieman WJ, Palladino MA (2010). *Introduction to Biotechnology*. Pearson Education. Edinburgh, Scotland.
- Vaikundamoorthy R, Rajendran R, Selvaraju A, Moorthy K, Perumal S (2018). Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. *Bioorganic Chemistry* 77, 494-506.
- Valdes JJ (2012). *Bioremediation*. First edition. Springer Science & Business Media. Berlín, Germany.
- Vallejo MT (2014). Caracterización y Clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. Memoria de Tesis. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
- Vardhini RS, Naik BR, Neelima M, Ramesh B, (2013) Screening and production of α -amylase from *Aspergillus niger* using zero, value material for solid state fermentation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 55-60.
- Waliszewski SM, Mercado MH, Martínez PCC (2008). Tejido adiposo: indicador de la contaminación por plaguicidas organoclorados. *Revista Salud Pública y Nutrición* 9.
- Walker KR, Ricciardone MD, Jensen J (2003). Developing an international consensus on DDT: a balance of environmental protection and disease control. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206, 423-435.
- Wei R, Oeser T, Schmidt J, Meier R, Barth M, Then J, Zimmermann W (2016) Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 113, 1658–1665
- Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196–1199
- Zhang DC, Liu HC, Zhou YG, Schinner F, Margesin R (2011) *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2333–2337.
- Zhang J, Chen J, Jia R, Dun Z, Wang B, Hu X, Wang Y (2018). Selection and evaluation of microorganisms for biodegradation of agricultural plastic film. *3 Biotech* 8, 308.
- Zhang L, Li Z, Qiao Y, Zhang Y, Zheng W, Zhao Y, Cui Z (2019). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by a maltohexose-producing α -amylase. *Journal of Cereal Science* 87, 165-171.