

## AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS DEL SISTEMA DIGESTIVO DE *Ptichopus angulatus* Leach, 1815 (COLEOPTERA: PASSALIDAE) CON POTENCIAL APLICACIÓN PARA BIOCOMBUSTIBLES

Christian Gómez-Martínez<sup>1</sup>✉, Magdiel Láinez-González<sup>2</sup>, Sergio Martínez-Hernández<sup>2</sup> y Hugo de Jesús Suárez-Hernández<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla, Carretera a Acuaco-Zacapoaxtla Kilómetro 8, Totoltepec. C. P. 73680. Puebla, México.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Sin nombre No. 868 121, Zona Universitaria. C. P. 91090. Xalapa Enríquez, Veracruz, México.

✉ Autor de correspondencia: [gomezchristian.83@gmail.com](mailto:gomezchristian.83@gmail.com)

**RESUMEN.** La hidrólisis enzimática (sacarificación) de la celulosa por celulasas es uno de los principales pasos limitantes para la conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol. Esfuerzos de investigación están en proceso para identificar nuevas celulasas y aplicarlas para la obtención de bioetanol. El uso principal de las disoluciones procedentes de la hidrólisis es como sustrato fermentable para obtener alcoholes, mediante los microorganismos adecuados. El insecto *Ptichopus angulatus* (Leach, 1815) es un coleóptero saproxilófago por excelencia, que vive y se nutre de los troncos de árboles que han alcanzado un estado medio de descomposición, esto determina una alta actividad celulósica dentro de la microbiota de estos Pasálidos. Se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 3.000 m de altitud. En este estudio se evalúa la existencia de actividad celulolítica por microorganismos extraídos del intestino de *P. angulatus*. Para ello se realizaron pruebas con papel Whatman No.1, colocados en incubadora a 37 °C a 100 rpm durante dos semanas; en medio de sal basal para la selección de microorganismos capaces de utilizar la celulosa como única fuente de carbono. Posteriormente se tomaron muestras de los tubos donde se observó actividad degradadora y se inocularon en cajas Petri con medio CMC y Congo Red durante siete días a 30 °C. Después de seis días se notaron halos alrededor de las colonias, lo que demuestra un resultado positivo a la existencia de microorganismos celulolíticos dentro del intestino de *Ptichopus angulatus*.

**Palabras clave:** Carboximetil-celulosa, celulolítico, biocombustibles, sacarificación, saproxilófago.

### Isolation of cellulolytic microorganisms from the gut of *Ptichopus angulatus* Leach, 1815 (Coleoptera: Passalidae) with application potential on biofuels

**ABSTRACT.** The enzymatic hydrolysis (saccharification) of cellulose by cellulases is one of the main limiting steps for the conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. Research efforts are underway to identify new cellulases and apply them to obtain bioethanol. The main use of the solutions coming from the hydrolysis is as a fermentable substrate to obtain alcohols, by means of the suitable microorganisms. The insect *Ptichopus angulatus* is a saproxylphagous coleopter par excellence, lives and feeds on the trunks of trees that have reached a state of decomposition, this determines a high cellulose activity within the microbiota of these Pasálidos. They are distributed from sea level to the 3 000 m of altitude. In this study, the existence of cellulolytic activity by microorganisms extracted from the gut of *P. angulatus* is evaluated. To do this, tests were carried out with Whatman No.1 paper, placed in an incubator at 37 °C at 100 rpm for two weeks, in the basal salt media for the selection of microorganisms capable of utilizing cellulose as sole source of carbon. Subsequently, samples were taken from the tubes where degrading activity was observed and inoculated in Petri dishes with CMC & Congo Red media for seven days at 30°C. After six days halos were noted around the colonies, which shows a positive result to the existence of cellulolytic microorganisms within gut of *Ptichopus angulatus*.

**Key words:** Carboxymethyl cellulose, cellulolytic, biofuels, saccharification, saproxylphage.

## INTRODUCCIÓN

En el último siglo los humanos casi han cuadruplicado su población, del año 1900 al 2000 hubo un incremento de 1,600 millones a 6,100 millones de habitantes, así mismo se estima que para el año 2030 el consumo energético *per capital* incrementara 35 % en comparación al año 2010

(Awad, 2011). Aunado a esto, el uso de combustibles fósiles es una de las principales causas del cambio climático, de acuerdo con la Agencia Internacional de Energía (IEA) durante el año 2011, las emisiones de CO<sup>2</sup> a la atmósfera, originadas por la combustión de estos combustibles alcanzaron las 31,342 toneladas.

Ante este escenario, la mayoría de los gobiernos han emprendido la búsqueda de nuevas fuentes de energía, que sean renovables y menos contaminantes. En México se ha establecido como objetivo que para el año 2024 el 35 % de la energía debe provenir de fuentes limpias y para el año 2050 se debe alcanzar la meta del 50 %. En este sentido, la celulosa y la hemicelulosa ocupan un importante lugar, debido a que es la biomasa más abundante del planeta, pudiendo satisfacer la demanda de energéticos, a bajos costos económicos y ambientales (Huang *et al.*, 2012).

Para convertir la biomasa lignocelulósica a bioetanol, es necesario realizar un proceso de hidrólisis seguido de una fermentación, sin embargo, procesos de hidrólisis basados en ácido, dejan restos de Sulfato de Calcio (CaSO<sub>4</sub>), causando efectos negativos al ambiente. Otra opción para la producción de bioetanol son los procesos termoquímicos, que no generan gran cantidad de contaminantes, pero son poco rentables. En la actualidad se han desarrollado técnicas ambientalmente racionales y a costos viables, tal es el caso de la hidrólisis enzimática, en la cual la conversión de celulosa, eficiencia de fermentación y recuperación, así como el costo dependen fuertemente de la eficiencia de los microorganismos empleados (Huang *et al.*, 2012).

Diversos insectos que se alimentan de madera, se ven beneficiados por la simbiosis con microorganismos degradadores de celulosa, que son sustratos lignocelulósicos que facilitan la degradación de la celulosa a glucosa. Este es el caso de los escarabajos de la familia Passalidae, los cuales se alimentan de madera podrida húmeda, que poseen dentro del tracto digestivo posterior, ácidos grasos producidos por la fermentación microbiana, donde organismos simbióticos aminolíticos y celulolíticos favorecen el bolo alimenticio (Reyes-Castillo, 2015). Hasta la fecha no se ha comprobado que dentro de los intestinos de larvas y adultos de pasálidos exista la presencia de microorganismos capaces de degradar la celulosa (Reyes-Castillo, 1984).

Este grupo de escarabajos está compuesto por cerca de 1000 especies, con la mayor diversidad en los trópicos (Boucher, 2005), el hábitat de estos escarabajos es dentro de troncos de diversas especies maderables, en un sistema familiar de túneles donde se pueden encontrar todos los estadios: huevos, larvas, prepupas y pupas. Los padres adultos, adultos tenerales, colaboran asistiendo a las prepupas en la reparación de la cámara pupal (Reyes-Castillo, 1984; Valenzuela, 1993; Schuster y Schuster 1997).

Este trabajo tuvo como objetivo principal comprobar la presencia de microorganismos degradadores de material lignocelulósico dentro del intestino de *Ptichopus angulatus*, con el propósito de aportar información en pasálidos y sus microorganismos asociados a la degradación de azúcares como la celulosa lo que conlleva a su posible uso en la producción de bioetanol.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Área de estudio.** La colecta de *P. angulatus* se realizó en la región de Zacapoaxtla, Puebla, México. (19° 99' 47.46" N 97° 34' 17.61" O, 2135 msnm) localizada en la zona de transición entre el bosque templado de la Sierra Norte y los cálidos del declive del Golfo. Su clima es templado subhúmedo, con una temperatura media anual de 16.1 °C y un promedio de precipitación anual de 1467 mm.

**Obtención de los escarabajos.** La colecta se hizo durante la época de lluvias de la zona (verano) realizando un esfuerzo de muestreo, cuya técnica es utilizada en la colecta de organismos. Se seleccionaron troncos en descomposición, que fueron cortados para la extracción de los

escarabajos. Posteriormente los ejemplares fueron colocados dentro de frascos herméticos para ser trasladados al laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla.

**Pruebas de actividad celulolítica en papel Whatman.** A seis ejemplares se les extrajeron los intestinos haciéndoles un corte transversal en el pronoto y un corte longitudinal de los intestinos de caeca a caeca (lugar en donde se lleva a cabo la actividad microbiana y fermentativa) (Reyes-Castillo, 1984). Los intestinos fueron macerados y colocados en tubos de 15 ml, previamente esterilizados, se preparó un medio de sal basal de acuerdo a Gupta *et al.*, 2012, ver cuadro 1. Los tubos contenían papel filtro (papel Whatman no.1 con dimensiones de 1 × 6 cm), se realizaron 3 disoluciones seriadas de cada intestino y un control. Fueron colocados en una incubadora a 37 °C con una agitación de 100 rpm para el aislamiento de microorganismos celulolíticos. Las muestras se mantuvieron durante dos semanas en temperatura controlada.

**Pruebas de actividad celulolítica en CMC.** Los microorganismos capaces de utilizar la celulosa como única fuente de carbono se aislaron de los tubos que contenían medio de solución salina basal en medios de agar de celulosa (ver cuadro 2) con un pH 7.

Compuesto	gr/litro
Cloruro de Sodio	0.2 gr
Nitrato de Sodio	2.5 gr
Fosfato monopotásico	2 gr
Sulfato de Magnesio	0.2 gr
Cloruro de Calcio	0.1 gr
10 ml de solución salina al 0.9%	

Compuesto	Cantidad
Celulosa	2 gr
Agar	15 gr
Fosfato monopotásico	0.5 gr
Sulfato de Magnesio	0.25 gr
Agua destilada	1 litro

Para la confirmación de que los aislamientos anteriores degradan la celulosa se tomaron alícuotas con la ayuda de un asa bacteriológica y se realizaron estriados en el medio de cultivo carboximetil-celulosa (CMC) y Congo Red Test, formulados como se muestra en el cuadro 3.

Compuesto	Cantidad
Carboximetil-celulosa	4.5 gr
NaNO <sub>3</sub>	0.9 gr
Fosfato monopotásico	0.5 gr
Cloruro de potasio	0.9 gr
Sulfato de Magnesio	0.25 gr
Extracto de levadura	0.45 gr
Agar	15 gr
Congo Red	0.2 gr
Agua destilada	1 litro

Estas cajas sembradas se llevaron a la incubadora Thermo Scientific a 30 °C durante siete días. De acuerdo a Gupta *et al.*, 2012 el uso de Congo Red en estudios como este, funciona como indicador de la degradación de la celulosa en el medio CMC, es una prueba de detección rápida y sensible para microorganismos celulolíticos. Así las colonias en el medio que mostraron decoloración de Congo-Red se tomaron como colonias de degradación de celulosa positivas ver fig. 1. Se realizó un recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se tomaron las cajas Petri con un total de entre 30 y 300 colonias ya que este número es estadísticamente representativo (Camacho, 2009) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{\text{No. de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tratamientos con medio de sal basal se observó un macerado parcial del papel Whatman No. 1 (ver fig. 1). Nuestros resultados son similares al trabajo realizado por Book *et al.*, (2014) en donde se aislaron cepas de *Streptomyces* asociadas con insectos herbívoros como *Sirex noctilio*, *Dendroctonus frontalis* y *Dendroctonus ponderosae* utilizando este método de identificación de degradación de celulosa.



Figura 1 Se muestra la degradación de papel filtro en medio de sal basal que contenía intestinos macerados. C es el control para este paso experimental que no mostró degradación del papel filtro.

De los microorganismos aislados en el medio agar de celulosa que tuvo la función de filtro para que sólo crecieran microorganismos que utilizan únicamente la celulosa como fuente de carbono se tomaron pequeñas alícuotas las cuales fueron sembradas en CMC y Congo Red, las colonias que crecieron en este medio mostraron decoloración del Congo Red en el agar (ver fig. 2).

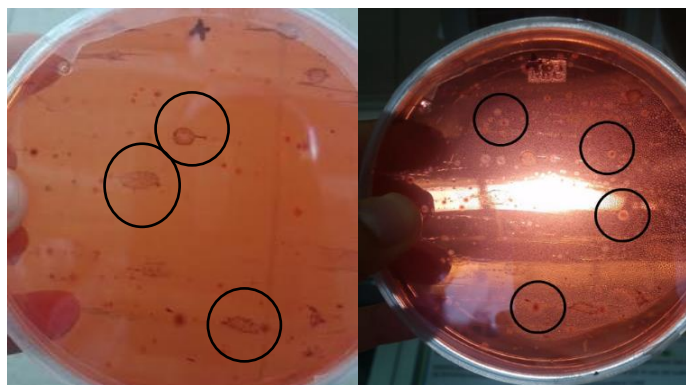


Fig. 2 Zonas en las placas de carboximetilcelulosa y Congo red en donde se muestran halos alrededor de las colonias. La formación de estos halos confirma la capacidad de los microorganismos de degradar celulosa.

Los microorganismos con actividad celulolítica fueron abundantes ( $2.5 \pm 0.13 \times 10^4$  UFC/ml). Estos resultados son similares a los del insecto *Holotrichia parallela* reportados por Huang *et al.*, 2012.

## CONCLUSION

Este estudio demuestra que el insecto *P. angulatus* tiene poblaciones de microorganismos celulolíticos dentro de su intestino, los cuales juegan un papel importante en la degradación de troncos en descomposición de los cuales se alimenta. Al demostrar que este insecto contiene microorganismos celulolíticos se informa que el intestino de *P. angulatus* tiene un gran potencial para ser una fuente de nuevos microorganismos celulolíticos útiles para la producción de biocombustibles. Nuestro futuro trabajo de investigación será la identificación de los microorganismos aislados en este estudio y la evaluación de su porcentaje de degradación.

## Agradecimientos

Se agradece a Sadot Mora Ortigoza, técnico de laboratorio de biología del Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla por su ayuda en la preparación del equipo.

## Literatura Citada

- Awad, S. 2011. *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca*. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. 76 pp.
- Book, A., Lewin, G., McDonald, B., Takasuka, T., Doering, D., Adams, A., Blodgett, J., Clardy, J., Raffa, K., Fox, B. and C. Currie. 2014. Cellulolytic Streptomyces strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15): 4692–4701. DOI: [10.1128/AEM.01133-14](https://doi.org/10.1128/AEM.01133-14).
- Boucher, S. 2005. Évolution et phylogénie des coléoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille la tribu néotropical des Proculini et son complexe Veturius. *Annales de la Société entomologique de France*, 41(3-4): 239–604.
- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B. y O. Velázquez, O. 2009. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 9 pp.
- Gupta, P., Samant, K. and A. Sahu, A. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, ID 578925. <http://dx.doi.org/10.155/2012/578925>.
- Huang, S., Sheng, P. and H. Zhang. 2012. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3): 2563–2577. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms13032563>.
- Reyes-Castillo, P. 1984. La estructura social de los Passalidae (Coleoptera: Lamellicornia). *Folia Entomológica Mexicana*, 61: 49–72.
- Schuster, J. C. and L. B. Schuster. 1997. The evolution of social behavior in Passalidae (Coleoptera). *The evolution of social behavior in insects and arachnids*. Cambridge University Press. 542 pp.
- Valenzuela-González, J. 1993. Pupal cell-building behavior in passalid beetles (Coleoptera: Passalidae). *Journal of Insect Behavior*, 6(1): 33–41.
- Reyes-Castillo, P., Asiain, J. y J. Márquez. 2015. Nueva especie mexicana de *Heliscus* Zang, 1906 (Coleoptera: Scarabaeoidea: Passalidae). *Dugesiana*, 22(2): 209–213.