

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DE MICROORGANISMOS ENDOGENOS BIOAUMENTADOS QUE ACELEREN EL PROCESO DE COMPOSTAJE, DE LA INDUSTRIA DE PALMA DE ACEITE.**Ana cristina Carrillo<sup>1</sup> ✉, Luisa Fernanda Daza<sup>2</sup>, Yenni Carolina Barraza<sup>3</sup>

1,2,3SENA

[criscarrilloana@ho@mail.com](mailto:criscarrilloana@ho@mail.com)**Palabras****Claves:***Actinomicetos, raquis, biotecnología, celulolíticos, autóctonos***RESUMEN**

*El compostaje en la industria de la palma de aceite es de suma importancia debido a la gran cantidad de residuos sólidos generados en su explotación ya que solo es utilizado el 9% del total de la materia prima, situación que exige la búsqueda de soluciones biotecnológicas que permitan el aprovechamiento de estos volúmenes de residuos, que generan grandes costos en la movilización y problemas medioambientales. Una de las características de estos residuos es que son ricos en celulosa siendo uno de los principales el raquis, el problema en la generación de este tipo de compost es el tiempo de degradación y que al final del proceso quedan fibras enteras o parcialmente degradadas; en este sentido es importante promover el crecimiento de microorganismos nativos y eficientes como los actinomicetos los cuales metabolizan muy bien este tipo de compuestos. Se desarrollo un protocolo para la obtención de microorganismos endógenos bioaumentados que aceleren el proceso de compostaje de los residuos sólidos, de la industria de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*). Logrando aislar 11 cepas de actinomicetos celulolíticos Las especies de actinomicetos que más prevalencia tuvieron en las muestras estudiadas fueron especies del genero *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp y *Nocardia* sp., seguida de otras especies en menor proporción. Se evaluó la actividad endoglucanasa, exoglucanasa y b-glucoSIDasa de 11 cepas de actinomicetos celulolíticos. Entre éstas la cepa de *Streptomyces* sp. M3 Y M 7 mostraron los mayores niveles de actividad.*

**DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR THE OBTAINING OF BIOAUMENTED ENDOGENOUS MICROORGANISMS THAT ACCELERATE THE PROCESS OF COMPOSTING, OF THE INDUSTRY OF PALM OF OIL.****Key words:***Actinomycetes, rachis, biotechnology, cellulolytics, autochthonous.***SUELOS ECUATORIALES**  
48 (1 y 2): 32-40  
ISSN 0562-5351**ABSTRACT**

*Composting in the oil palm industry is of great importance due to the large amount of solid waste generated in its exploitation since only 9% of the total raw material is used, a situation that requires the search for biotechnological solutions that allow the use of these volumes of waste, which generate large costs in the mobilization and environmental problems. One of the characteristics of these residues is that they are rich in cellulose, one of the main ones being the rachis, the problem in the generation of this type of compost is the time of degradation and that at the end of the process remain whole or partially degraded fibers; In this sense it is important to promote the growth of native and efficient microorganisms such as actinomycetes which metabolize this type of compounds very well. A protocol was developed to obtain bioaugmented endogenous microorganisms that accelerate the composting process of solid waste, from the oil palm industry (*Elaeis guineensis*). Achieving isolating 11 strains of actinomycetes cellulolytics The species of actinomycetes that had the highest prevalence in the studied samples were species of the genus *Streptomyces* sp., *Thermomonospora* sp and *Nocardia* sp., Followed by other species in smaller proportion. The endoglucanase, exoglucanase and b-glucoSIDase activity of 11 cellulolytic actinomycete strains was evaluated. Among these, the strain of *Streptomyces* sp. M3 and M 7 showed the highest levels of activity.*

Rec.: 04.05.2018

Acep.: 07.06.2018

## INTRODUCCIÓN

Colombia es el quinto país productor de aceite crudo de palma en el mundo, con una producción acumulada de 753.000 t en 2010 (Fedepalma, 2011). El proceso de elaboración de aceite de palma deja como principales subproductos los racimos vacíos (RV), la fibra de fruto (FF) y los efluentes. Los racimos de fruto fresco (RFF), provenientes del campo, son procesados en la planta de beneficio, donde se esterilizan y se desfrutan para extraer el aceite, dejando así 20 kg de RV y 14 kg de FF por cada 100 kg de RFF que ingresan al proceso (García et ál., 2010). La esterilización de los RFF, la extracción del aceite y sus subsecuentes pasos de decantación y purificación, así como el procesamiento de la almendra del fruto, de la cual se extrae el aceite de palmiste, generan entre 65 y 85 kg de efluentes por cada 100 kg de RFF. Algunas empresas palmicultoras en Colombia han defendido el uso del proceso de compostaje como una forma viable de retorno de nutrientes al agroecosistema, así como una solución de disposición de subproductos. No obstante, son muchos los detractores del uso de este proceso, resaltando las desventajas que éste pueda tener. (Boletín técnico de cenipalma 2012). sin embargo la preparación del compost con raquis ofrece una muy buena alternativa para la cobertura del suelo (Daza, Maestre, 2004). Según trabajos realizados por Faure (1991) y Vargas-García (2007), se ha probado la producción de inoculantes a partir de un cultivo formado por una mezcla de microorganismos endógenos seleccionados de pilas de compostaje y, por lo tanto, mejor adaptados a esas condiciones. El inoculo constituyó un agregado significativo en número para producir una bioaumentación y la reducción del tiempo de formación y maduración del compost (De Carlo et al., 2001). En investigación realizada por Usuga Osorio (2008), los resultados permitieron reforzar la idea de utilizar inóculos nativos en los procesos de fertilización y acumulación de biomasa en la planta de banano, seleccionando una mezcla de microorganismos autóctonos donde la planta de interés es cultivada. Para que las especies existentes en la mezcla del

inoculo expresen su potencial deben combinarse el manejo agronómico con la aplicación de abonos orgánicos. El manejo racional y sustentable de la fertilidad de los suelos busca indispensablemente aumentar la eficiencia de su utilización la que no depende de mayores de tasas de aplicación de fertilizantes, si no de fomentar procesos de reciclaje y eficiencia en la absorción de nutrientes, donde la integración de la inoculación a los sistemas agronómicos, serian una forma de aprovechamiento de su funcionalidad.

El objetivo de esta investigación, es desarrollar un protocolo para la obtención de microorganismos endógenos bioaumentados que aceleren el proceso de compostaje de los residuos sólidos, de la industria de la palma de aceite (*Elaeis guireensis*), lo cual se realizó a través de la caracterización morfológica, que es un procedimiento diferencial de la identificación de microorganismos, por el cual se reúnen datos acerca de una especie y se comparan con los resultados obtenidos por diferentes técnicas. Las referencias se agrupan y forman un concepto generalizado que preliminarmente pueden guiar el reconocimiento de la especie con la que se trabaja.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Toma de muestras

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de agroindustria del centro Biotecnológico del caribe, ubicado en la ciudad de Valledupar. Las muestras de raquis procedían de la Hacienda las Flores (N 10°03.51.9 ubicada en el municipio de Agustín Codazzi, Cesar. Para la obtención de los microorganismos autóctonos se realizó de manera previa una caracterización de las pilas de compostaje de raquis en las etapas (termofilicas y de maduración) de las cuales se tomaron un total de 50 muestras representativas para su posterior análisis físico-químicos y microbiológicos como lo sugiere la Norma Técnica Colombiana NTC 5167.

**Tabla1.** Caracterización de las pilas de compostajes muestreadas.

<b>RECETA COMPOSTAJE</b>		
<b>RAQUIS</b>	0,70%	1400,36 Ton
<b>TONSIL</b>	0,05%	100,03 Ton
<b>FIBRA</b>	0,05%	100,03 Ton
<b>T. PALMIS</b>	0,05%	100,03 Ton
<b>CACHAZA</b>	0,05%	100,03 Ton
<b>LODOS T</b>	0,05%	100,03 Ton
<b>R. BIODIES</b>	0,03%	50,01 Ton
<b>CENIZAS</b>	0,03%	50,01 Ton

Se seleccionaron 30 pilas de compostaje, tomando 10 submuestras para formar una compuesta de 50gr por cada muestra, a una profundidad de 15 cm cada una.

### **Aislamiento primario**

Se aislaron 11 cepas de actinomicetos celulíticos de la etapa termofílica y de maduración, mediante un aislamiento primario en agar czapek-Dox más nistatina por la técnica de diluciones seriadas dilución hasta  $10^{-8}$  los cultivos fueron incubados a 37°C por diez días.

### **Aislamiento secundario**

Luego del tiempo de incubación se realizó una segunda siembra en agar zapec dox más nistatina para purificar las cepas de actinomicetos presentes en el aislamiento primario, la identificación se realizó mediante caracterización macroscópica y microscópica de las colonias (Fig.1) y las pruebas bioquímicas utilizando los kits de identificación BBL Crystal para gram positivos y gram negativos para ampliar la variedad de azúcares en la conformación de los perfiles metabólicos de cada una de las especies escogidas

Posteriormente se realizó la crioconservación de las cepas aisladas en crioviales a -20°C. Se efectuaron pruebas de evaluación enzimática cualitativa y cuantitativamente en medios de cultivos específicos a cada uno de los microorganismos aislados.

Se optimizó un medio de cultivo a partir de residuos de raquis puro en diferentes concentraciones, con la finalidad de evaluar el comportamiento de las cepas en este medio.

### **Extracción de ADN**

En función del tipo de análisis a realizar y de la necesidad de obtener un ADN puro, se aplicaron distintos protocolos de extracción hasta conseguir el más apropiado, logrando estandarizar un protocolo de extracción de ADN con fenol-cloroformo, la cuantificación se realizó mediante microdrop para determinar la pureza usando como indicador la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm y Electroforesis en gel de agarosa, para determinar la integridad y el tamaño de la molécula de ADN y/o productos de amplificación.

**Tabla2.** Protocolo de mejor rendimiento en la extracción de ADN de los morfotipos ensayados.

<b>Protocolo estandarizado de extracción de ADN para actinomicetos</b>
Tomar del medio con crecimiento y llevar a un eppendorf
Congelar -20° por 25`
Llevar a baño maría, 85° 15`
Repetir el ciclo de congelación- descongelación
Centrifugación a 10.000 rpm 10`
Agregar 5ml de las colonias para maceración.
Macerar las colonias en un mortero con 600 µl de Buffer de Lisis celular.
Recuperar 2ml del macerado
Agregar en 500 µl de Tampón TE
Agregar 10 µl de lisozima 0,66 mg/ml
Incubar a 37° 30`
Agregar 20 µl de Proteinasa K 20 µl de SDS 10%
Vortear
Incubar a 55° 30`
Atemperar
Agregar una proporción de 1:1 de fenol cloroformo 550 µl :550 µl
Centrifugar a 10.000rpm 5`
Recuperar sobrenadante
Agregar etanol al 90% 600 µl
Congelar -20° 30`
Centrifugar 10.000 rpm 10`
Descartar sobrenadante sobre papel Absorbente
Lavar 2 veces sedimento con etanol al 70% 300 µl y repetir proceso de centrifugación y descarte cada lavado.
Descartar sedimento
Agregar 50 µl buffer de rehidratación de DNA
Temperatura ambiente 24 horas, refrigerar en nevera de -20°.

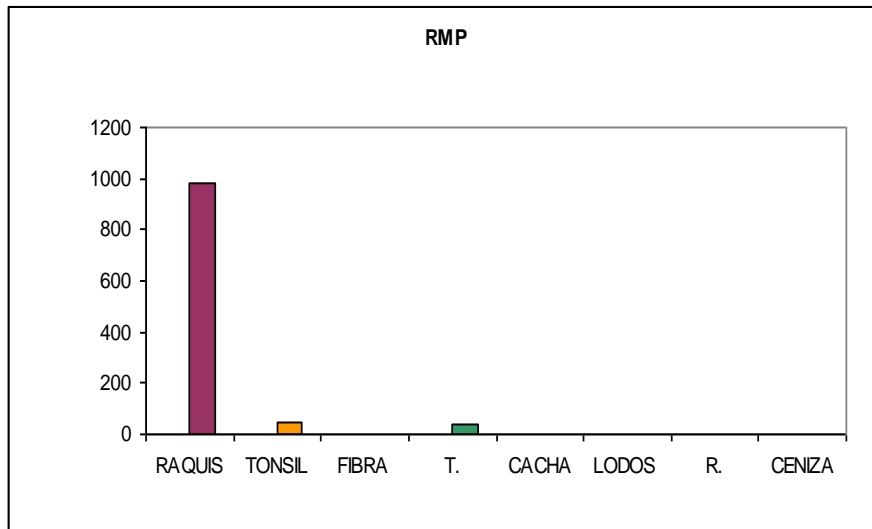
Próximamente se realizara la reacción en cadena de la polimerasa PCR, para obtener la identificación molecular de estas e implementar el protocolo de bioaumentación para la aplicación de estos microorganismos en el compost de raquis de palma para que aceleren su proceso de degradación y así adquirir un compost de óptima calidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características de las pilas de raquis

En la tabla 1 se observa la composición de Las pilas muestreadas con los mayores contenidos, en un 80% de raquis de palma, un porcentaje de

Tonsil proveniente de la refinación del aceite, un porcentaje de cachasa y ceniza y otros componentes que se usan en la planta de extracción.

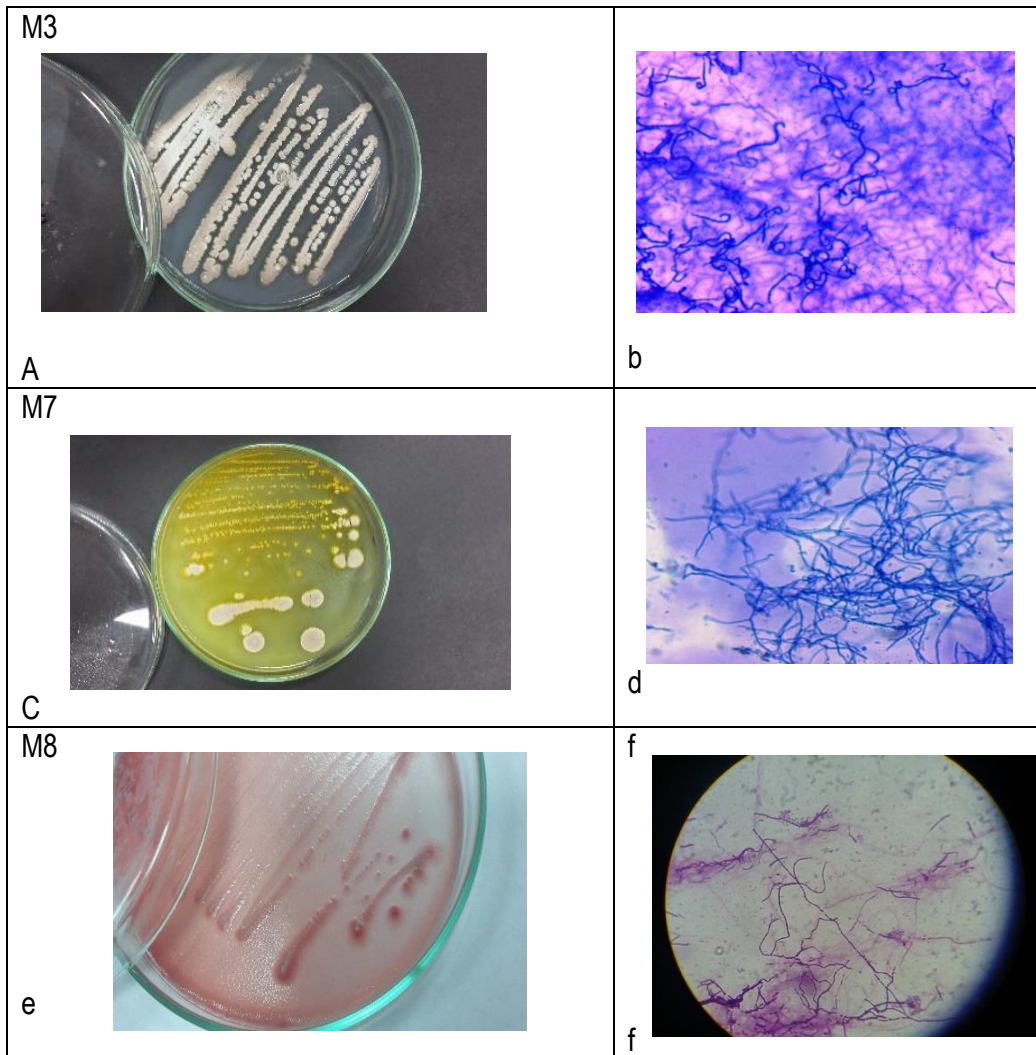


**Grafica 1.** Caracterización de las pilas de compostaje de raquis de palma.

### Identificación de actinomicetos:

De acuerdo a las características Macroscópicas de Actinomicetos, referenciadas en el libro *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Vol.3*, el cual describe los Actinomicetos

como colonias de crecimiento lento, de aspecto ceroso, polvoroso, adheridas al agar (figura 1a y b), de colores variantes entre blanco grisáceo, crema (figura 1 a), colores tierra y negro, se identifican un total de 11 posibles cepas de Actinomicetos.



**Figura 1.** Características Macroscópicas a,c,e. Microscópicas b,d,f de algunos Actinomicetos del compostaje de raquis de palma. M3. *Streptomyces* ; M7 *Nocardia*; M8 *Thermonospora* .Fuente autores.

De las cepas seleccionadas se realizaron repiques en agar avena más nistatina para evaluarlas microscópicamente teniendo en cuenta las recomendaciones realizadas en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [3] considerando su morfología con estructuras miceliales (figura b, d,f) esto con el fin de establecer cuáles de estas cepas son en verdad Actinomicetos. De las 15 cepas

Posteriormente se realizaron pruebas de evaluación enzimática cualitativa y cuantitativamente en medios de cultivos a base de raquis a cada uno de los microorganismos aislados, se observaron halos de

consideradas posibles Actinomicetos 4 fueron descartadas, ya que macroscópicamente no eran colonias secas de aspecto seroso, en su mayoría presentaron un aspecto cremoso; adicionalmente, microscópicamente no presentaban estructuras miceliales. Así, se determinó que 11 de las 15 cepas aisladas en Agar Avena podían ser posibles colonias de Actinomicetos.

degradación en todos los medios, lo cual nos permite suponer que estos microorganismos son un buen degradador raquis de la palma.



**Figura 2.** Evaluación celulolítica cualitativa y cuantitativa de las cepas M 11, M1 Y m7

En la optimización del cultivo a partir residuos de raquis puro en diferentes concentraciones, se observó como resultado una mejor expresión y

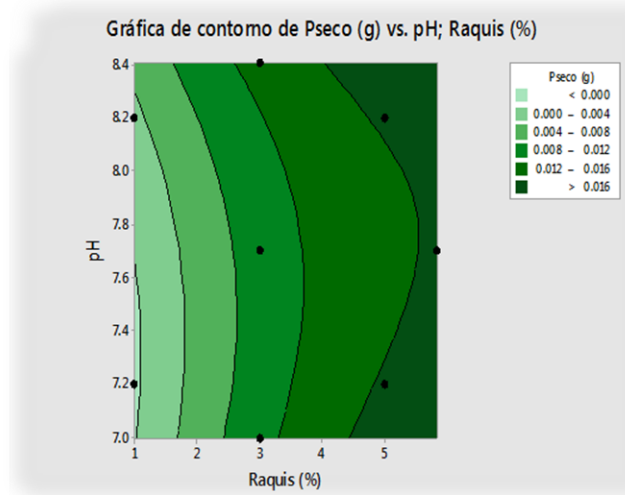
velocidad de crecimiento de las cepas M3 y M7 en la mayor concentración de raquis al 5 % tanto en medio sólido como medio líquido.



**Figura3.** Evaluación de medio de cultivo de raquis de palma en diferentes concentraciones.

Los resultados de la microscópica muestran que le mayor porcentaje de las cepas M 1, M2, M3, M4, M5, M6 se pueden identificar con claridad como pertenecientes al género de *Streptomyces*, el cual presenta características como la no fragmentación del micelio de sustrato, la fragmentación del micelio

aéreo y la formación de cadenas de conidias o bacilos en disposición de espiral. El resto de las cepas muestran las características microscópicas de actinomicetos pertenecientes a los géneros de *Nocardia* M7 y *Thermonospora* M8; que agrupa Actinomicetes termofilicos y celulolíticos.



**Grafica 2.** Resultados prueba de peso seco, cuantificación de la biomasa.

En la gráfica anterior se presentan los resultados obtenidos del análisis de superficie de respuesta para producción de biomasa a partir de raquis. Las variables analizadas pH, concentración de raquis vs peso seco arrojan una curva donde la concentración del raquis resulta como la variable predominante (VALOR P DEL 99,2%) mientras que el pH presenta altas producciones de peso seco a pH altos y bajos (pH 8,4 y 7,0 respectivamente). Los valores de pH cercanos a 7,8 resultan pocos beneficiosos para el crecimiento del microorganismo *Streptomyces* sp. Los valores óptimos arrojados del análisis superficie de respuesta son los pH 8,2 concentración de raquis al 5,0 %, podemos decir que la preparación previa del raquis contribuye a un aumento de la acción enzimática.

### Extracción de ADN

Los Actinomicetos filamentosos forman agrupaciones de hifas fuertemente unidas que es necesario disgregar para conseguir rendimientos adecuados en la extracción de DNA. Además, muchas especies crecen fuertemente adheridas al agar debido al micelio de sustrato que producen [3]. En este caso las cepas cultivadas en medio líquido de raquis se sometieron a dos ciclos de congelación y calentamiento adicionalmente se centrifuga y se macera el resultante con el buffer de lisis celular todo esto con el fin de ayudar a romper a la pared de estos microorganismo lo cual es de suma importancia para lograr obtener el ADN de los actinos a estudiar. La electroforesis muestra la presencia de bandas de ADN (Figura 4).



Bandas de ADN



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. de los aislados M1, M2, M3, M6, M8, MA, M10, MB Y M1dif.

Todas las diluciones mostraron la presencia de una banda de amplificación correspondiente al fragmento del gen, de 345 pb. Esto indica que las modificaciones introducidas al protocolo de extracción de DNA, resultaron exitosas, logrando obtenerse DNA en condiciones de pureza adecuadas (libre de inhibidores) como para permitir la reacción de amplificación por PCR.

## CONCLUSIONES

El aislamiento de actinomicetos a partir de muestras compost de raquis de palma presenta problemas debido a la microbiota de lento crecimiento. Los métodos de multiplicación a partir de un medio de cultivo natural hecho a base de raquis de palma el cual sirve como base para la extracción del ADN del mismo utilizado en este trabajo, facilitan la obtención de un ADN puro. Sin embargo la utilización de los métodos tradicionales combinados con un kit comercial de extracción (Promega) en muestras procedentes de compost buscan validar la extracción para los géneros más importantes con propiedades de degradación de celulosa.

La bibliografía consultada existen pocas referencias sobre aislamiento e identificación de actinomicetos de compost de raquis de palma, por lo tanto con este tipo de medios de cultivo se podría aumentar el aislamiento de *Streptomyces*, *Thermonospora* y *Nocardia* en compost de raquis para su posterior identificación molecular.

## REFERENCIAS

- Franco Correa, M. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos formadores de Micorrizas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de ciencias. Departamento de Fisiología. 2008.
- Galindo Castañeda T. Romero M. Compostaje de subproductos de la agroindustria de palma de aceite en Colombia: estado del arte y perspectivas de investigación. Boletín Técnico N.31.2012.
- Bergey. Manual of Systematic Bacteriology. 2005
- Rosenberg, Eugene; DeLong, E.F., Stackebrandt, E., Lory, S., Thompson, F The Prokaryotes; Prokaryotic Physiology and Biochemistry Vol. 3.2013. ISBN 978-3-642-30140-7.
- Piñero-Bonillaa, J\*, Díaz I. Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia* sp.a partir de residuos de naranja como sustrato. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2010; 30:102-108.
- G.Cuesta,- Amat. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de micolotas formadoras de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. 2004.