

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* DE DEGRADAR SUSTRATOS CELULÓSICOS

Adelantado C., Acero, X., Tusell, P., Corcuera, E., y Calvo, M.A.  
Microbiología. Departament de Sanitat i Anatomia Animals. Universitat Autònoma de Barcelona  
e-mail: mariangels.calvo@uab.es

## INTRODUCCIÓN

La ubicuidad de las especies del género *Bacillus* determina que puedan ser aisladas de los más diversos sustratos sin que ello pueda ser considerado como determinante en el momento de establecer su papel en la degradación de los mismos.

En los análisis microbiológicos llevados a cabo en los últimos años en el Departamento de Sanidad y Anatomía Animales de la Universidad Autónoma de Barcelona se ha constatado la reiterada presencia de cepas de *Bacillus subtilis* en soportes celulósicos entre los que podemos destacar: documentos de toda índole, libros, obras de arte así como en el medio ambiente en el que se hallan conservados. En la mayoría de los documentos analizados macroscópicamente se observa un claro deterioro de los mismos y zonas con manchas rojizas indelebles.

El principal objetivo del estudio que aportamos es establecer la posible relación causa-efecto entre las cepas de *Bacillus subtilis* aislados y las alteraciones detectadas en los sustratos de dónde han sido aislados.

## MATERIAL Y METODOS

Se ha llevado a cabo el análisis microbiológico de noventa soportes celulósicos que presentaban alteraciones observables a simple vista: coloraciones diversas, pérdida de consistencia del documento, corrosiones, entre otros.

Diversos fragmentos de las muestras se depositaron sobre medios de cultivo con el fin de proceder a la detección y aislamiento de los posibles microorganismos presentes en las muestras. Los medios de cultivo seleccionados fueron: Triptona Soja Agar para detección de bacterias (TSA) y Agar glucosado de Sabouraud adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina para aislamiento de cepas fúngicas (AS). Las condiciones de incubación fueron: 30°C 24-48h en el caso de las bacterias y 28°C durante 3 a 5 días para la detección de hongos.

A partir de las cepas desarrolladas, se procedió a su aislamiento y posterior identificación hasta nivel de género y especie.

Las cepas identificadas como *Bacillus subtilis* fueron seleccionadas y se procedió al estudio de su capacidad enzimática aplicando la metodología API ZYM® que permite establecer un total de diecinueve enzimas, según metodología modificada por Calvo, M.A. en 1985 y de forma específica al estudio de su posible capacidad

celulolítica mediante la técnica descrita por Das *et al.*, 1977; García-Kirchner, O. *et al.*, 2000.

El método API ZYM® consiste en preparar una suspensión en solución salina estéril de un cultivo reciente de la cepa en estudio. A partir de la suspensión se inocula la galería que contiene los sustratos para demostrar las actividades enzimáticas en estudio. La galería se incubó por espacio de 24h a 37°C. Transcurrido el período de incubación se añaden los reactivos API ZYM A y API ZYM B y se procede a la lectura de los resultados obtenidos que se expresan de forma semicuantitativa, siguiendo los patrones colorimétricos aportados por la metodología. La relación de enzimas evaluados se resume en la Tabla núm. 1.

Tabla núm. 1.- Relación de enzimas investigados

fosfatasa ácida	fosfatasa alcalina	esterasa
esterasa lipasa	lipasa	leucina arilamidasa
valina arilamidasa	cistina arilamidasa	tripsina
$\alpha$ -quimiotripsina	fosfohidrolasa	$\alpha$ y $\beta$ galactosidasa
$\beta$ -glucuronidasa	$\alpha$ -manosidasa	$\alpha$ y $\beta$ glucosidasa
$\alpha$ -fucosidasa	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	

Asimismo y con el fin de determinar la capacidad celulolítica de las cepas aisladas, se procedió a preparar medios de cultivo enriquecidos con un 3% de carboximetil-celulosa (CMC) de viscosidad media. Las cepas aisladas fueron sembradas en paralelo en medios de cultivo sin adición de CMC o con adición de un 3% de CMC. La capacidad celulolítica se puede evidenciar por la detección de un halo de clarificación o de hidrólisis alrededor de las colonias de los microorganismos ensayados.

Finalmente se procedió a una inoculación experimental de estas cepas en sustratos que no presentaban ningún tipo de alteración con el fin de verificar su directa implicación en las alteraciones de los soportes celulósicos.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Del total de muestras analizadas podemos indicar que en un 87% de las mismas se detectó la presencia de *Bacillus subtilis*. En la mayoría de estas muestras se observaban manchas rojizas.

En las cepas aisladas e identificadas como *Bacillus subtilis* pudo evidenciarse su capacidad celulolítica ya que todas, fueron capaces de degradar la CMC observándose un marcado desarrollo en las placas que contenían este producto frente a las placas que no lo presentaban.

Asimismo y a partir de los ensayos con API ZYM® se pudo evidenciar una variada actividad enzimática en función de la cepa evaluada, como puede deducirse en la Tabla núm. 2, en la que se indican los nanomoles de sustrato hidrolizados (nanomoles/s) por enzima.

Para la mejor interpretación de la Tabla debe tenerse en cuenta que:

0 = 0 nanomoles/s      1 = 5 nanomoles/s    2= 10nanomoles/s  
 3 = 20 nanomoles/s    4 =30 nanomoles/s      5 =  $\geq$  40 nanomoles/s

**Tabla núm. 2.- Actividades enzimáticas de *Bacillus subtilis***

<b>Enzima</b>	<b>Sustrato</b>	<b><i>Bacillus subtilis</i></b>
<b>Control</b>	-----	-----
<b>Fosfatasa alcalina</b>	<b>2-naftil fosfato</b>	<b>5</b>
<b>Esterasa</b>	<b>2-naftil butirato</b>	<b>1</b>
<b>Esterasa lipasa</b>	<b>2-naftil caprilato</b>	<b>2</b>
<b>Lipasa</b>	<b>2-naftilmiristato</b>	<b>1</b>
<b>Leucina arilamidasa</b>	<b>L-leucil-2-naftilamida</b>	<b>1</b>
<b>Valina arilamidasa</b>	<b>L-valil-2-naftilamida</b>	<b>2</b>
<b>Cistina arilmiadasa</b>	<b>L-cistil-2-naftilamida</b>	<b>1</b>
<b>Tripsina</b>	<b>N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida</b>	<b>0</b>
<b><math>\alpha</math>-Quimiotripsina</b>	<b>N-glutaril-fenilalanina-2-Naftilamida</b>	<b>0</b>
<b>Fosfatasa ácida</b>	<b>2-naftil fosfato</b>	<b>1</b>
<b>Naftol-A-S-BI-Fosfohidrolasa</b>	<b>Naftol-AS-BI-fosfato</b>	<b>1</b>
<b><math>\alpha</math>-Galactosidasa</b>	<b>6-BR-2-naftil-<math>\alpha</math>D-galactopiranosido</b>	<b>0</b>
<b><math>\beta</math>-Galactosidasa</b>	<b>2-naftil-<math>\beta</math>D-galactopiranosido</b>	<b>0</b>
<b><math>\beta</math>-Glucuronidasa</b>	<b>Naftol-AS-BI-<math>\beta</math>D-glucurónido</b>	<b>0</b>
<b><math>\alpha</math>-Glucosidasa</b>	<b>2-naftil-<math>\beta</math>D-glucopiranosido</b>	<b>0</b>
<b><math>\beta</math>-Glucosidasa</b>	<b>6-BR-2-naftil-<math>\beta</math>D-glucopiranosido</b>	<b>0</b>
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-glucosaminidasa</b>	<b>1-naftil-N-acetil-<math>\beta</math>D-glucosamínida</b>	<b>1</b>
<b><math>\alpha</math>-Manosidasa</b>	<b>6-BR-2-naftil-<math>\alpha</math>D-manopiranosido</b>	<b>0</b>
<b><math>\alpha</math>-Fucosidasa</b>	<b>2-naftil- <math>\alpha</math> L-fucopiranosido</b>	<b>0</b>

Las cepas aisladas e identificadas poseen actividades enzimáticas directamente relacionadas con su capacidad de degradar la celulosa, entre las que podemos destacar: N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa y fosfatasa ácida.

La actividad enzimática de *Bacillus subtilis*, es mucho más restringida que la de cepas fúngicas aisladas a partir de los mismos sustratos celulósicos.

Asimismo se detectó una marcada actividad celulolítica por el método de García-Kirchner, O. *et al.*, 2000 como puede observarse en la Figura 1

**(Figura 1)**

Finalmente podemos indicar que la inoculación experimental en los sustratos celulósicos evidenció la capacidad de las cepas de colonizar estos sustratos y de degradarlos, como puede observarse en la Figura 2.

**(Figura 2)**

## **CONCLUSION**

Los resultados obtenidos permiten aportar que las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de diversos sustratos celulósicos degradados se hallan implicadas directamente sobre las alteraciones detectadas, por lo que no pueden ser sólo consideradas como agentes contaminantes del medio ambiente sino que colaboran activamente en la alteración y degradación de los mismos.

## **BIBLIOGRAFIA**

CALVO, M. A. "Extracellular enzymatic activities of dermatophytes" *Mycopathologia* 92: 19-22. 1985.

DAS MK; PRASAD, JS, AHMAD, SK. "Endonuclease production by paper-degrading mycoflora". *Lett. Appl.Microbiol.* 25(5): 313-315. 1997.

GARCÍA-KIRCHNER O, SEGURA-GRANADOS, M., ROBLEDO-BAUTISTA, I. DURÁN PÁRAMO, E.- "Screening of potencial antibiotic action on cellulolytic fungi". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 769-778. 2000.

M.Àngels Calvo es Doctor en Farmacia y Veterinaria. Actualmente es Catedrática de Sanidad Animal en la Universitat Autònoma de Barcelona. Tiene una amplia experiencia en Micología, Microbiología Ambiental y en Edificio Enfermo. Su investigación actual se centra en encontrar métodos estratégicos para la prevención del daño microbiológico en papeles y documentos de Archivos.

Xavier Acero y Pablo Tusell son estudiantes de Ciencias Biológicas. Esther Corcuera es licenciada en Bellas Artes. Tiene una amplia experiencia en restauración. Carles Adelantado es licenciado en Veterinaria, y está realizando el Doctorado en Barcelona (Universitat Autònoma). Tiene una beca en Microbiología y centra su investigación en Microbiología Ambiental y Micología.