

CAMBIOS MORFOLÓGICOS PRODUCIDOS POR TRATAMIENTO QUÍMICO Y SACARIFICACIÓN EN RASTROJO DE MAÍZ

Facundo Felice (1), Joel Arneodo (2), Julia Sabio y García (3), Paola Talia (1).

(1) Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar. (2) Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, CICVyA, CNIA, INTA Castelar. Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. (3) Laboratorio Integral de Microscopía, CICVyA, INTA Castelar. Email: sabioygarcia.julia@inta.gob.ar

Los biocombustibles de segunda generación se obtienen de biomasa lignocelulósica. Su producción presenta gran potencial, debido a su amplia disponibilidad y el relativo bajo costo de estos materiales¹. El rastrojo de maíz es un gran candidato como fuente lignocelulósica debido, principalmente, a su abundancia en nuestro país. El paso crítico en la producción de este tipo de biocombustibles es la degradación de la celulosa a compuestos fermentables². La pared celular está compuesta fundamentalmente por lignina, hemicelulosa y celulosa. El principal objetivo del pretratamiento con ácido es remover la fracción de hemicelulosa y en menor medida la lignina y, de esta manera, favorecer la accesibilidad a la celulosa de la acción de las enzimas lignocelulolíticas las cuales hidrolizan los polímeros de la biomasa a compuestos fermentables. Por este motivo es importante la prospección y el estudio de organismos y enzimas capaces de catalizar esta reacción. En termitas superiores, la digestión de la lignocelulosa es llevada a cabo por la acción de enzimas endógenas y de endosimbiontes bacterianos³. El objetivo de este trabajo es analizar la acción del pretratamiento con ácido diluido y de tres aislamientos bacterianos del intestino de la termita nativa *Nasutitermes aquilinus* sobre el rastrojo de maíz (*Zea mays*), a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Los aislamientos se obtuvieron sembrando homogenatos de intestino de *Nasutitermes aquilinus* (casta obrera, colectada en la provincia de Corrientes, S 27°28'30''; W 58°46'59,43'') en medio mínimo (MM) ((g/l): K₂HPO₄, 1,67; KH₂PO₄, 0,87; NaCl, 0,05; MgSO₄·7H₂O, 0,1; CaCl₂, 0,04; FeCl₂, 0,04; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,005; biotina, 0,01; ácido nicotínico, 0,02; ácido pantoténico, 0,01; NH₄Cl, 1), suplementado con papel de filtro (Whatman N° 1, 2,5 cm²), como única fuente de carbono, para enriquecer el cultivo con bacterias celulolíticas. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del contenido del tubo (10⁻³ a 10⁻⁶) y se sembraron en la superficie de placas de MM agar suplementadas con carboximetilcelulosa (CMC) 1% y Trypan Blue (TB) 0,01% o 4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside (MUG) 0,001%. Las colonias que mostraron un halo de degradación fueron repicadas individualmente en placas de MM agar suplementadas con el mismo sustrato del cual provenían hasta obtener una línea pura. Los aislamientos fueron crecidos en MM con 2% de rastrojo de maíz pretratado con ácido sulfúrico diluido (1,5 %) a 37°C, 200 RPM durante 10 días. Luego, las muestras se centrifugaron a 10600 g, se lavaron para eliminar los restos de medio o bacterias y, finalmente, se secaron en una estufa a 40°C durante 16 h. Los aislamientos fueron identificados mediante la amplificación del gen 16S de ARN ribosomal, utilizando los primers fD1 y rD1 (fD1: 5'-CCG AAT CGT CGA CAA CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'; rD1: 5'-CCG GGA TCC AAG CTT AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'). Los amplicones obtenidos fueron ligados al vector PGEMt-easy, clonados en células competentes DH5α y secuenciados. Con el propósito de analizar modificaciones en la estructura de la pared celular, las siguientes muestras, sin ningún tratamiento previo, se observaron por SEM (FEI Quanta-250 FEI Co., Netherlands): I) Rastrojo de maíz molido sin pretratamiento químico, II) Rastrojo de maíz molido y pretratado con ácido diluido, III) Rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido y luego de la acción de las enzimas hidrolíticas de los aislamientos. El análisis de la secuencia del gen 16S de ARNr reveló que tres de los aislamientos obtenidos (NAMUG_18, NACMC_31 y NACMC_29) pertenecen a los géneros *Stenotrophomonas*, *Cohnella* y *Afipia*, respectivamente. Mediante microscopía se observaron modificaciones en la pared celular producidas por el pretratamiento y la acción de las enzimas hidrolíticas de los aislamientos (Figura 1). En la muestra pretratada químicamente (PTQ) los efectos del pretratamiento fueron débiles con respecto a la biomasa sin pretratar, apenas se descubrió el interior de los vasos (Figura 1B). Sin embargo, luego de la acción de las enzimas hidrolíticas presentes en *Stenotrophomonas* sp. se observó menos cohesión entre las fibras (F) y los ramilletes de celulosa fueron más evidentes, asimismo, las estructuras porosas (P) de la pared fueron degradadas (Figura 1C). En el caso de las enzimas del aislamiento identificado como *Cohnella* sp. los ramilletes de celulosa y la degradación de las estructuras porosas fueron

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

evidentes solo en algunas regiones (Figura 1D) la degradación más débil fue observada en *Afipia* sp. (Figura 1E). En conclusión, se demostró por SEM, que el pretratamiento químico degrada ligeramente el rastrojo de maíz y que, de los 3 aislamientos celulolíticos, el de *Stenotrophomonas* sería el de mayor potencialidad para la descomposición de la biomasa a compuestos fermentables. El uso de esta microscopía permitió reconocer las distintas estructuras de la pared celular vegetal y evaluar las modificaciones que los pretratamientos provocaron en ellas.

REFERENCIAS:

- [1] Kumar, S.R., Suman, M., Faozia Faleha, S., Myn, U., Dwaipayan, S. (2014). "Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of Three Phytophagus Insect Species". *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6).
 [2] Bellido, C., González-Benito, G., Coca, M., Lucas, S., García-Cubero, M.T. (2013). "Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipiti*". *Bioresource Technology*, 133: 7. [3] Scharf, M.E., Boucias, D.G. (2010). "Potential of termite-based biomass pre-treatment strategies for use in bioethanol production". *Insect Science*, 17: 166–174.

FIGURAS

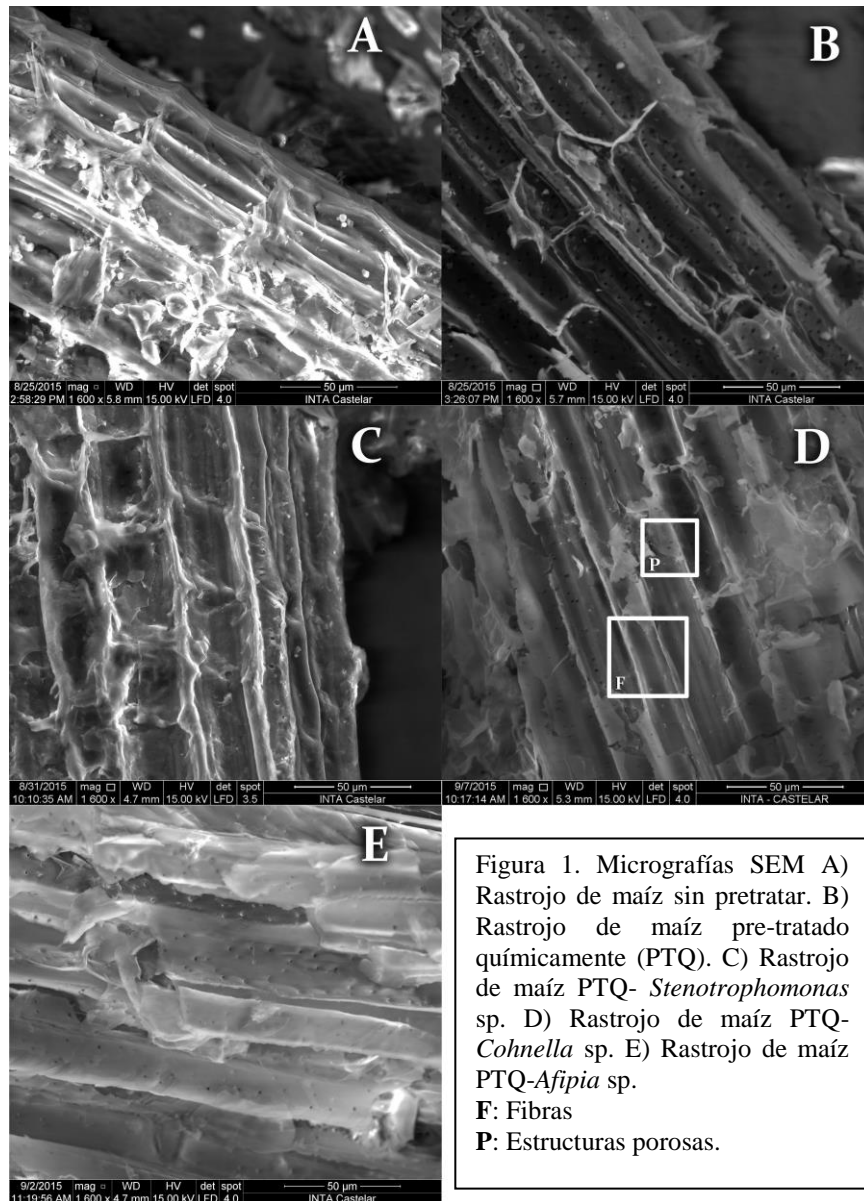


Figura 1. Micrografías SEM A) Rastrojo de maíz sin pretratar. B) Rastrojo de maíz pre-tratado químicamente (PTQ). C) Rastrojo de maíz PTQ- *Stenotrophomonas* sp. D) Rastrojo de maíz PTQ- *Cohnella* sp. E) Rastrojo de maíz PTQ-*Afipia* sp.
F: Fibras
P: Estructuras porosas.