

Termitas para las plantas de pulpa de celulosa

Por Elena Fabiano*

Para extraer la celulosa de la madera es necesario eliminar la lignina y la hemicelulosa, para lo cual industrialmente se emplean métodos químicos agresivos que a veces pueden generar gases de olor desagradable y efluentes contaminantes. Pero hay moléculas biológicas que pueden hacer el trabajo con más eficiencia como ciertas enzimas. Un grupo de investigadores del Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable se propuso buscar e identificar dichas enzimas en la comunidad bacteriana del intestino de las termitas.

Papel

La palabra papel deriva de papiro o papyrus, planta que utilizaban, hace unos 5000 años, los egipcios para producir "hojas" para escribir. La invención de papel, tal como lo conocemos hoy, se le adjudica a un empleado del gobierno chino llamado Ts'ai Lun quien en el año 105 lo elaboró, por primera vez y a gran escala, a partir de desperdicios de tela. A lo largo de la historia se ha elaborado el papel a partir de diversas materias primas como seda, lino, corteza de morera, cáñamo, trapos viejos de algodón u otras telas. Pero indudablemente, el proceso que ha resultado mejor tanto prácticamente como económicamente se basa en la obtención de pasta de celulosa a partir de la madera.

La madera está formada básicamente por una estructura química compleja denominada lignocelulosa, la cual contiene un 28-50% de **celulosa** (1), 18-30% de **lignina** (2), y un 20-30% de **hemicelulosa** (3) dependiendo las proporciones de la especie arbórea. Para extraer la celulosa de esta mezcla es necesario eliminar la lignina y la hemicelulosa, para lo cual normalmente se emplean métodos químicos que pueden generar gases de olor desagradable y, dependiendo de la tecnología, efluentes contaminantes.

Uno de los procesos industriales más utilizados para la obtención de celulosa es el denominado proceso Kraft (nombre de origen alemán que significa duro) el cual consiste en la cocción de los chips de madera en presencia de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio. Posteriormente se realiza una etapa de blanqueo para

eliminar totalmente las sustancias causantes del color como restos de lignina y sus productos de degradación, resinas y otras impurezas. Para ello se emplean sustancias que degradan, mediante reacciones de oxidación, los productos no deseados. Las tecnologías actuales utilizan dióxido de cloro o peróxido de hidrógeno como agentes oxidantes, son las llamadas tecnología ECF (*Elemental Chlorine Free*: libre de cloro elemental) y TCF (*Totally Chlorine Free*: libre de cloro total).

Para evitar o disminuir los impactos ambientales los marcos regulatorios para la producción de celulosa, a nivel mundial, son cada vez más estrictos y están forzando a la industria a desarrollar nuevas tecnologías y buscar alternativas al proceso.



Vanesa Amarelle, extrayendo termitas de troncos de perales infectados.

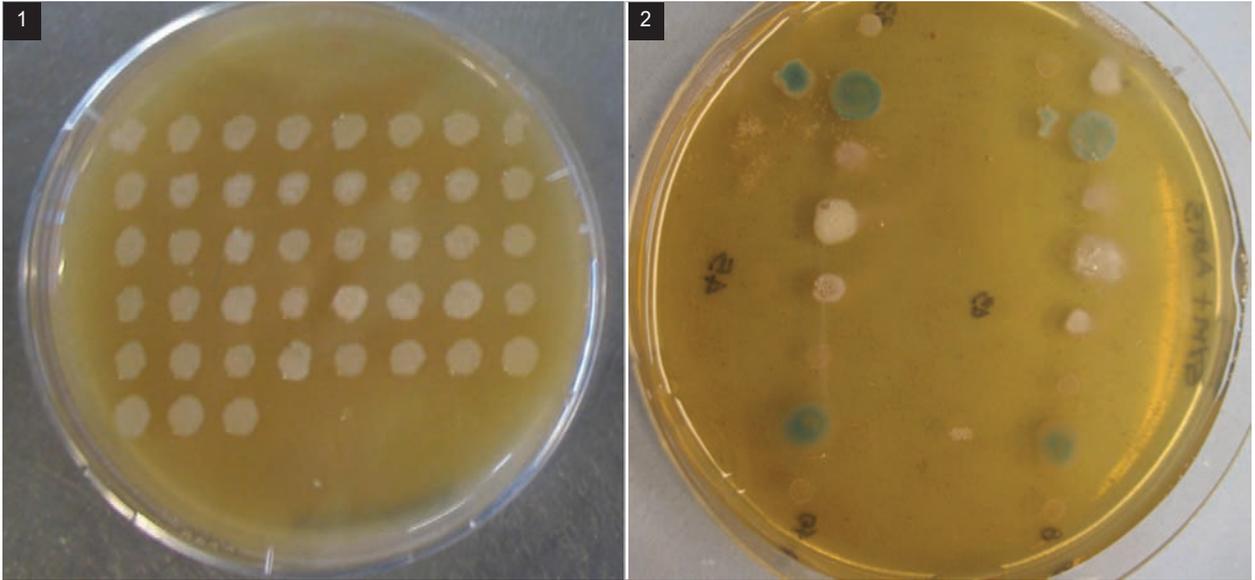


Foto 1. Clones bacterianos ubicados en forma organizada en una placa con medio de cultivo.

Foto 2. La coloración celeste de algunos clones indica que esas bacterias producen enzimas de tipo peroxidasa en ese medio.

Biopulpeo y bioblanqueo

Si bien la molécula de lignina es muy difícil de romper y degradar, se han descrito sustancias capaces de contribuir a su degradación como es el caso de ciertas enzimas, denominadas enzimas ligninolíticas (lignin-peroxidadas, Mn-peroxidadas y lacasas). La presencia de estas enzimas en hongos y bacterias hace que estos microorganismos sean valorados como importantes descomponedores naturales de la lignocelulosa. Basados en estas actividades biológicas, varios grupos de investigación de diversos países han venido trabajando en las últimas décadas en la implementación, a nivel industrial, de procesos biológicos alternativos a los procesos químicos. En tal sentido ya se dispone de productos patentados para su uso en las etapas de pulpeo y de blanqueo.

La técnica denominada biopulpeo, consiste en el tratamiento de los chips de madera ya sea con microorganismos degradadores de la madera (en particular se ha patentado el uso de hongos) o con enzimas ligninolíticas. Las astillas o chips biotratados pueden ser luego utilizados para el pulpeo tradicional ya sea por procesos mecánicos o químicos. La implementación de métodos biológicos en las etapas siguientes, como el pre-tratamiento de la pulpa antes de la etapa de blanqueo o directamente en la etapa de blanqueo (bioblanqueo) es también un tema objeto de numerosas investigaciones. Si bien estos tratamientos han mostrado ser eficientes, su uso no es aún difundido debido a que no se ha alcanzado la eficiencia esperada y fundamentalmente a que los costos del proceso son aún muy elevados.

Termitas

Algunos de los microorganismos capaces de digerir la celulosa se encuentran alojados en el aparato digestivo de las termitas, insectos que se alimentan de madera (xilófagos). Estos microorganismos digieren la celulosa,

la hemicelulosa y la lignina que las termitas no podrían digerir por sí solas. El intestino de las termitas es considerado como un bioreactor altamente eficiente en el cual los microorganismos catalizan la conversión de lignocelulosa en productos fermentables los que pueden ser luego empleados como nutrientes por la termita.

Mediante técnicas moleculares se ha estimado que la población microbiana presente en el intestino de las termitas comprende varios cientos de especies. Lamentablemente, la enorme mayoría de las bacterias que componen esta comunidad no pueden ser cultivadas en el laboratorio ya que en general se desconocen las condiciones necesarias para su crecimiento (normalmente, aún probando con diferentes medios de cultivo, se logra que solo un 10% del total de especies se desarrolle) y



Termitas obreras y soldados de *Rugitermes* sp.



Uriel Koziol y Daniella Senatore extrayendo intestinos de las termitas.

por lo tanto, sus posibles usos biotecnológicos no han podido ser estudiados. Recientemente se han comenzado a desarrollar nuevas herramientas tecnológicas que permiten sortear este problema, ya que mediante ellas se puede estudiar estas poblaciones microbianas sin necesidad de obtener los microorganismos en forma aislada y de cultivarlos en el laboratorio.

Metagenómica

Una de dichas herramientas es la metagenómica, también llamada multigenómica o genómica colectiva. Consiste en el estudio de la información genómica completa, metagenoma, de la población microbiana de un determinado habitat, es decir del material genético del conjunto de microorganismos sin diferenciar qué genes corresponden a qué microorganismo. Para ello se extraen muestras del ambiente de interés, se aísla de allí el ADN total, éste se fragmenta y cada fragmento se introduce en una bacteria de uso corriente en el laboratorio, que sí podemos cultivar y manipular fácilmente, como puede ser *Escherichia coli*.

Esta bacteria puede tomar el ADN bacteriano que se le ha introducido como si fuera propio y al duplicarse y reproducirse, duplicará tanto el ADN propio como el ADN introducido. Cada célula bacteriana dará así origen a una población bacteriana, que puede llegar a tener 10.000 millones de células iguales, portadora de un fragmento de ADN de la población microbiana de interés y se la conoce como "clon".

El conjunto de clones diferentes, cada uno de ellos portador de un fragmento diferente del ADN proveniente de la población microbiana de interés, es lo que se denomina "librería" o "biblioteca" metagenómica.

Las bibliotecas metagenómicas pueden ser luego estudiadas desde un enfoque genómico (secuenciación del ADN introducido y búsqueda de similitud con otros genes conocidos), o pueden ser utilizadas directamente para la búsqueda e identificación de funciones o actividades biológicas o enzimáticas (metagenómica funcional).

Ventajas

Considerando que en la actualidad se conocen unas tres mil especies cultivables de las cuales, hasta el presente, se ha logrado secuenciar aproximadamente cuatrocientos genomas y que éstas representan tan solo un porcentaje menor al 1% de las especies presumiblemente existentes, queda claro que sólo con el enfoque de la genómica clásica (la que estudia el genoma total de una especie por vez) apenas se tendría un pequeñísimo conocimiento de la complejidad microbiana. En cambio, a partir del estudio del metagenoma se puede acceder al ADN de especies no cultivables y se puede utilizar para descubrir nuevos productos de interés médico, industrial, agronómico, etc. sin la necesidad de tener que aislar y caracterizar previamente al organismo. Es decir se puede descubrir y reproducir a gran escala sustancias o enzimas que provienen de microorganismos desconocidos.



Pinza con intestino de una termita de la casta obrera.

Proyecto

En el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE, un grupo de investigadores, del cual formo parte, se propuso buscar e identificar, mediante una estrategia metagenómica, enzimas de potencial aplicación para la obtención de pulpa de celulosa, presentes en la comunidad bacteriana del intestino de las termitas.

Con esta finalidad se obtuvieron aproximadamente trescientos intestinos de termitas *Rugitermes sp.* recolectadas de perales infectados. Las bacterias se separaron de los intestinos homogeneizados por centrifugación en un medio con diferencias de densidad. Luego se extrajo y purificó el ADN bacteriano y con ese ADN se construyó una biblioteca metagenómica en *Escherichia coli* conteniendo fragmentos de entre 35 a 45 kilobases de ADN foráneo. Al presente el grupo cuenta con 17.000 clones los que cubren aproximadamente 680 megabases (Mb) de un total estimado de 800 Mb para el metagenoma (4).

En realidad para cubrir el genoma en su totalidad se necesitarían bibliotecas muchísimo más grandes ya que no todas las especies están presentes en igual proporción en el intestino de las termitas, o los fragmentos de ADN con que se trabaja pueden corresponder a las mismas regiones, etc. A fin de tener una estimación más precisa, actualmente se está evaluando la diversidad microbiana presente en la muestra empleada.

La biblioteca metagenómica es luego empleada para buscar enzimas con actividad celulolítica (celulasas y hemicelulasas) y ligninolítica (lignin-peroxidasas, mangano-peroxidasas y lacasas), lo que se hace cultivando los clones en condiciones adecuadas y enfrentándolos a compuestos químicos específicos para cada actividad enzimática. Los clones portadores de la actividad buscada son luego detectados ya sea por producir una coloración particular cuando reaccionan con los compuestos agregados (ver fotos 1 y 2), o por la capacidad de degradar un producto insoluble.

La originalidad del proyecto es entonces el empleo

de tecnologías de desarrollo nuevas, como es la metagenómica funcional, para la búsqueda de enzimas bacterianas con actividad ligninolítica presentes en comunidades aún poco conocidas.

Nota:

Este proyecto es financiado con fondos nacionales del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) y el Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) y se realiza en colaboración con Rafael Cantera del Departamento de Biología del Neurodesarrollo del IIBCE, Beatriz Garat del Laboratorio de Interacciones Moleculares de la Facultad de Ciencias y el asesoramiento de la termitóloga Ana Aber.

Los integrantes del equipo de investigación del Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE que trabajan en este proyecto son:

Francisco Noya (fnoya@geocom.com.uy), Daniella Senatore (dasen@iibce.edu.uy), Uriel Koziol (ukoziol@iibce.edu.uy), Vanesa Amarelle (amarelle@iibce.edu.uy) y Elena Fabiano (efabiano@iibce.edu.uy).

Referencias:

(1) La celulosa es un polímero, o un tipo de compuesto, formado exclusivamente de moléculas de un azúcar, la glucosa, unidas entre sí; es rígido, insoluble en agua, y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de glucosa. Es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre.

(2) La lignina es una sustancia intercelular incrustante o cementante que acompaña a la celulosa en las paredes celulares de los tejidos llamados lignificados por contener dicha materia. Funciona prácticamente como relleno para impartir rigidez al tallo de la planta. El segundo elemento en importancia de la composición vegetal. Forma hasta el 25% de la madera seca.

(3) La hemicelulosa es un polímero ramificado, compuesto primordialmente de moléculas de los azúcares D-xilosa, D-manosa, L-arabinosa y la D-galactosa.

(4) Haciendo un cálculo muy aproximativo, en el caso de que hubiese unas 150 especies bacterianas y considerando que el tamaño del genoma bacteriano varía entre unos 0,6 a 10 Mb, el metagenoma consistiría en unas 800 Mb.

**La Dra. Elena Fabiano es Química Farmacéutica, con un doctorado en Ciencias Biológicas (Universidad de la República-PEDECIBA). Actualmente es investigadora en el IIBCE.*



BIRIDEN
instrumental científico

Instrumental y equipos para su laboratorio.
Calidad y respaldo técnico de excelencia.

Telefax: 908 4918 / info@biriden.com / www.biriden.com