



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE FACTORES ABIÓTICOS EN
LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE AISLADOS
MARINOS DEL GOLFO DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

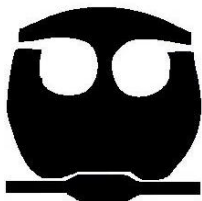
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MATILDE AIDÉE SOLARES ORTEGA

MÉXICO, D.F.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

VOCAL: **Profesor:** FRANCISCO RUIZ TERÁN

SECRETARIO: **Profesor:** LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ

2° SUPLENTE: **Profesor:** GLORÍA DÍAZ RUIZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad de Ecología Marina, Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana , Ciudad Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: MATILDE AIDÉE SOLARES ORTEGA

(nombre y firma)

Para Belo y Mamayo

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A mi asesor Dr. Luis Ángel Maldonado, por la oportunidad de realizar esta tesis y brindarme su apoyo en todo momento.

A la Dra. Ma. del Carmen Wachter por la revisión de la tesis, así como por darme la oportunidad de conocer el gran mundo de la microbiología.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por su orientación y revisión de este trabajo.

A la Dra. Erika Quintana por brindarme sus conocimientos y sostén para la realización de esta tesis.

A la Dra. Gloria Díaz por todo su apoyo a lo largo de mi carrera.

A mi familia por siempre estar junto a mí y brindarme su apoyo.

A mis amigos por acompañarme en este camino.

A mis amigos de la carrera por vivir esta experiencia conmigo (especialmente a ustedes 7)

Índice

	Página
1. Introducción	2
2. Antecedentes	
2.1 Esterasas	6
2.2 Lipasas y carboxilesterasas: diferencias y similitudes	7
2.3 Lipasas	8
2.4 Carboxilesterasas	14
2.5 Factores abióticos y la actividad lipolítica	15
2.6 La clase <i>Actinobacteria</i>	19
2.7 Sedimentos marinos	22
2.8 PCR e identificación molecular	23
2.9 Objetivo general	26
2.10 Objetivos particulares	26
2.11 Hipótesis	27
3. Metodología	
3.1 Resiembra y Resuspensión	29
3.2 Inoculación en medio sólido	29
3.3 Efecto del pH en la actividad lipolítica	29
3.4 Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica	30
3.5 Efecto de la concentración de sal marina en la actividad lipolítica	30
3.6 Determinación de la actividad lipolítica	31
3.7 Identificación molecular de las cepas	31
4. Resultados	
4.1 Actividad lipolítica con diferentes ácidos grasos y a diferentes pHs	39
4.2 Selección de resultados con mayor actividad lipolítica	47
4.3 Actividad lipolítica a diferentes temperaturas	49
4.4 Actividad lipolítica a diferentes concentraciones de sal marina	62
4.5 Condiciones óptimas de los aislados con mayor actividad lipolítica	69
4.6 Identificación molecular	71
5. Discusión de resultados	72
6. Conclusión	81
7. Recomendaciones	83
8. Bibliografía	84
9. Anexos	94

Resumen

Las enzimas lipolíticas constituyen el grupo más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas. En la industria de los alimentos, estas enzimas pueden ser utilizadas en la síntesis de ésteres de sabor, así como en la modificación de las propiedades fisicoquímicas de triglicéridos para grasas y aceites. La clase *Actinobacteria* comprende al grupo de bacterias Gram positivas las cuales se caracterizan por un alto contenido de Guanina y Citosina. Los actinomicetos (organismos de esta clase) son un componente importante de las comunidades microbianas tanto terrestres como marinas y algunos de ellos han sido reportados como productores prolíficos de lipasas. En el presente estudio, se evaluaron tres factores abióticos: 1) el pH, 2) la temperatura y 3) la concentración de sal marina sobre la actividad lipolítica de doce aislados de la clase *Actinobacteria* recuperadas de sedimentos marinos del Golfo de México. Se encontró que la actividad lipolítica es muy variable y depende directamente de las condiciones de cultivo y de los factores abióticos. Respecto al pH se determinó un rango óptimo de 6.0 a 8.0, para la concentración de sal de 0 a 3.5% y respecto a la temperatura una óptima de 30°C. La actividad lipolítica se investigó utilizando diferentes fuentes de lípidos encontrando una mayor actividad al utilizar Tween 20, 40 y 60. Adicionalmente se investigaron los ésteres de ácidos grasos con respecto a los tres diferentes factores abióticos pero en un medio oligotrófico al 33% del original. Se encontró que el medio oligotrófico puede sustituir al medio estándar ya que la actividad lipolítica fue similar. La presente propuesta indica que microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de ambientes marinos en México son capaces de producir enzimas lipolíticas en amplios rangos de concentración de sal, temperatura y pH, y que el estudio de estos factores son muy útiles para entender el verdadero potencial de estas enzimas y su aplicación industrial, particularmente en la industria de alimentos.

Palabras clave: Actinobacterias, actividad lipolítica, Golfo de México.

1. Introducción

Actualmente, sólo el 2% de los microorganismos cultivados en el mundo han sido estudiados como fuentes de enzimas, por lo que es importante investigar a nuevos microorganismos para la producción de estos compuestos (Hasan *et al.*, 2006). Las enzimas lipolíticas (esterasas) constituyen el grupo más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Hasan *et al.*, 2006). Por su gran uso en la biotecnología y alta demanda, tan sólo en el 2004 se estimó esta industria en dos billones de dólares con un crecimiento anual del 5% (Hasan *et al.*, 2006) esperando que para el año 2007 sea del 8%. Las enzimas constituyen una gran industria debido al amplio rango de aplicaciones, por lo que resulta necesario encontrar nuevas fuentes de éstas.

Las principales esterasas son lipasas y carboxilesterasas, las cuales difieren principalmente en el tipo de sustrato que utilizan. Las carboxilesterasas prefieren a los ésteres y triacilgliceroles pequeños, mientras que las lipasas prefieren sustratos como triacilgliceroles de cadena larga (Fojan *et al.*, 2000).

En la industria de los alimentos, las lipasas y las carboxilesterasas pueden ser utilizadas en la síntesis de ésteres de sabor, así como en la modificación de las propiedades fisicoquímicas de triglicéridos para grasas y aceites. También pueden utilizarse para la síntesis de compuestos ópticamente activos debido a su especificidad (Kademi *et al.*, 1999).

El empleo de enzimas de origen microbiano en la industria tiene varias ventajas pues en algunos casos su uso sustituye la utilización de químicos o el gasto de agua en los procesos. Esto puede ser posible al seleccionar adecuadamente la enzima para controlar los productos, lo que resulta en una minimización de las reacciones secundarias del proceso de estudio.

Lo anterior se ve reflejado en la disminución de los costos del proceso y de equipo, evitándose el empleo de sustancias químicas que pudiesen dañar el medio ambiente y/o que los residuos necesiten tratamientos posteriores (Hasan *et al.*, 2006).

Las enzimas microbianas son más útiles que aquellas obtenidas de plantas o animales debido a la gran variedad de actividades catalíticas que presentan. Una ventaja del estudio de las enzimas de origen microbiano es que se cuenta además con la posibilidad de su manipulación genética y que los medios de cultivo para su crecimiento resultan mucho más económicos que aquellos para la producción, estudio y/o desarrollo de hongos y plantas (Hasan *et al.*, 2006).

La clase *Actinobacteria* (Zhi *et al.*, 2009; Stackebrandt *et al.*, 1997) comprende un grupo amplio y vasto de bacterias Gram positivas caracterizadas por un alto contenido de Guanina y Citosina (G+C). El diverso rango de morfologías por muchos años hizo que se les considerara como el puente evolutivo entre las bacterias y los hongos (Hopwood, 2007), aunque estudios basados en la composición química de su pared celular y secuencias del gen del 16S ribosomal ahora los sitúa como un grupo distinto a los firmicutes o bacterias Gram positivas de bajo contenido de G+C (Madigan *et al.*, 2009). Los actinomicetos (un *orden* de esta clase) son un componente importante de las comunidades marinas y terrestres, llegando a ser dominantes en hábitats específicos (Ward & Bora, 2006). En sedimentos marinos se han aislado más de 13,000 diferentes microorganismos de esta clase (Bull & Stach, 2007) y estudios en muestras nacionales sugieren que la diversidad actinobacteriana es mayor a lo que se suponía (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2009).

Si bien gran parte del estudio de este grupo microbiano está concentrado en su innata producción de metabolitos secundarios, este grupo puede llegar a mostrar mayor actividad lipolítica que los hongos u otros grupos bacterianos como lo sugieren Ko y colegas en su estudio del 2004.

En la mayoría de los casos de muchos procesos industriales la actividad de una enzima no puede optimizarse ajustando las condiciones físicas o químicas a las cuales el proceso debe llevarse a cabo. Por consiguiente, la evaluación de diferentes factores abióticos (como el pH, la temperatura y la concentración de sal) para determinar su actividad óptima se convierten en temas de estudio de gran importancia (Giudice *et al.*, 2006).

En el presente proyecto se evaluó la actividad lipolítica de doce actinobacterias aisladas de origen marino nacional empleando como sustrato diferentes fuentes de lípidos. Los factores evaluados, (a) el pH, (b) la temperatura y (c) la concentración de sal marina se estudiaron con la finalidad de observar su efecto en la actividad lipolítica. Un estudio previo demostró que los doce aislados cuentan con actividad lipolítica (Maldonado & Quintana, 2009) pero la evaluación de esta actividad frente a los factores abióticos mencionada no había sido investigada aún. El estudio de los factores abióticos propuestos permitió establecer cómo esta actividad se ve afectada y si podrían ser utilizados en conjunto o no, además de generar conocimiento que estableciera el rango de pH, temperatura y la concentración de sal marina para la expresión de la actividad lipolítica, las condiciones óptimas para la producción de enzimas de este tipo y en un futuro determinar su potencialidad real de aplicación industrial para las industrias de alimentos o farmacéuticas, por citar dos ejemplos.

2. Antecedentes

La biotecnología se puede definir como el uso de organismos para hacer una tarea determinada. Es una ciencia que se basa en el descubrimiento y la explotación de productos de origen biológico culminando con el desarrollo de productos comerciales de utilidad para el ser humano (Bull *et al.*, 2000). Esta ciencia nos permite descubrir, obtener y procesar compuestos que algunos microorganismos producen naturalmente, los cuales tienen una importancia industrial muy notable (Demain, 2000).

En las últimas décadas, el ambiente marino ha demostrado ser una rica fuente de diversidad biológica y química, así como de microorganismos utilizables en la biotecnología capaces de producir una gran cantidad de compuestos para su uso en la industria cosmética, farmacéutica [ej. antibióticos] y de alimentos [ej. enzimas o ácidos grasos insaturados] (Sijtsma & Swaaf, 2003).

Debido a las condiciones extremas que caracterizan al ambiente marino como son una permanente temperatura baja y presión alta (especialmente en el fondo marino y sus sedimentos), la diversidad de bacterias presentes en ellos las hace aptos de poseer capacidades únicas frente a otros microorganismos de ambientes o ecosistemas distintos. De acuerdo con estudios basados en técnicas moleculares, solamente hemos logrado cultivar en el laboratorio entre el 0.1 y el 1% del mundo microbiano (Bull *et al.*, 2000). Algunas de las bacterias aisladas del ambiente marino muestran la capacidad de degradar hidrocarburos, lípidos y ésteres (Li & Qin, 2005; Yakimov *et al.*, 2007) lo que hace a este ecosistema un buen candidato de estudio.

Dentro de la gran diversidad de bacterias capaces de degradar grasas que se han aislado hasta hoy, menos de una cuarta parte se han obtenido de ambientes marinos, tanto de aquellas con un requerimiento de sal como sin éste. De acuerdo con el trabajo por Giudice y colaboradores en el 2006, bacterias marinas adaptadas a ambientes de la Antártica son capaces de degradar Tween

20, 40, 60, 80, 85 y tributirina. Además, algunas bacterias marinas tienen la ventaja de contar una gran especificidad por el sustrato, la cual suele ser mayor que en aquellas aisladas de suelo o de otras fuentes distintas al ambiente marino (Yakimov *et al.*, 2007).

En ambientes marinos únicos, como son los agregados orgánicos y los sedimentos del mar, las actinobacterias pueden llegar a ser dominantes y representar más del 50% de la población microbiana (Klausen *et al.*, 2005). A pesar de la “inhospitalidad” de estos ambientes, los ecosistemas marinos son exitosamente colonizados por numerosos organismos los cuales pueden resistir esta condición debido a la producción de enzimas (Gerday *et al.*, 2000).

2.1 Esterasas

Las esterazas (EC 3.1.1.x) son un grupo muy variado de hidrolasas, las cuales catalizan la ruptura de enlaces ésteres así como su formación. Están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos y constituyen el grupo más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Hasan *et al.*, 2006). El gran interés en este grupo enzimático se debe a que son altamente regioespecíficas y estereoespecíficas, en general son muy estables y activas en solventes orgánicos (Bornscheuer, 2002). Existen diferentes tipos de esterazas, sin embargo las más importantes son las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) y las esterazas “verdaderas”, también llamadas carboxilesterasas (EC 3.1.1.1 carboxil ester hidrolasa; Bornscheuer, 2002).

Las diferencias entre las lipasas y las carboxilesterasas han motivado una gran discusión en la comunidad científica por casi medio siglo. Anteriormente no se conocía la diferencia entre ellas y sólo se sabía que rompían grasas, pero actualmente se ha encontrado que tienen similitudes y diferencias importantes (Paiva *et al.*, 2000) las cuales se desglosan brevemente en la siguiente sección.

2.2. Lipasas y carboxilesterasas: diferencias y similitudes.

2.2.1 Diferencias

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1, carboxil ester hidrolasas) prefieren sustratos más solubles en agua, como ésteres y triacilgliceroles pequeños, mientras que las lipasas prefieren sustratos insolubles en agua, como lo son los triacilgliceroles grandes (Fojan *et al.*, 2000). Mientras que las carboxilesterasas presentan una cinética Michaeliana, las lipasas necesitan una concentración mínima de sustrato antes de presentar una gran actividad (Bornscheuer, 2002).

Las lipasas tienen un “loop” (del inglés) hidrofóbico que bloquea su sitio activo. Al estar la enzima en la interfase aceite-agua del medio, se da un cambio conformacional y el *loop* se reorienta exponiendo el sitio activo, como se indica en la Figura 1. A este fenómeno se le denomina *activación interfacial* y esta característica no está presente en las carboxilesterasas (Weete, 2002; Giudice *et al.*, 2006).

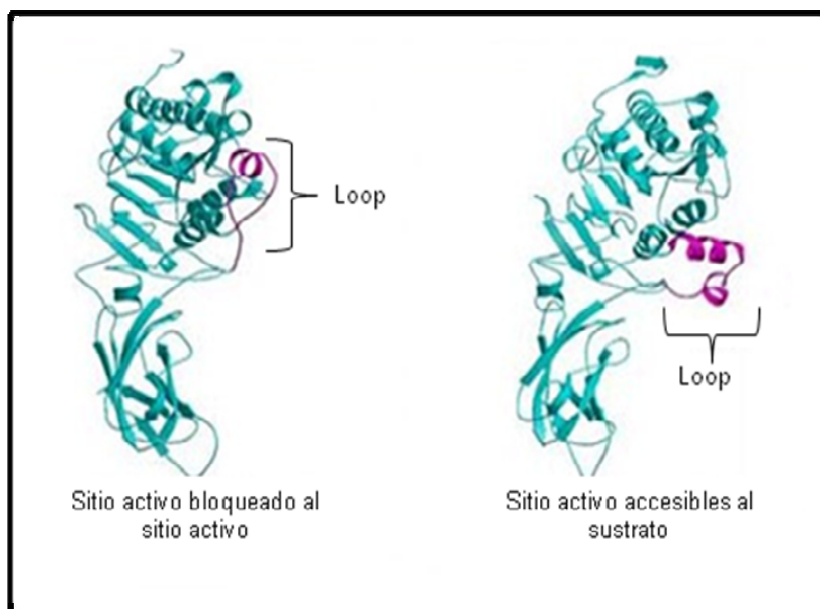


Figura 1. Activación interfacial y las diferentes conformaciones en las lipasas (Illanes *et al.*, 2008).

2.2.2 Similitudes

La estructura tridimensional tanto de las lipasas como de las carboxilesterasas tienen una serie definida y ordenada de α -hélice y β - plegada que las hace pertenecer grupo de las α/β hidrolasas (Bornscheuer, 2002). En el sitio activo se encuentra una triada catalítica compuesta por tres aminoácidos Serina-Asparagina-Histidina. Esta triada bacteriana es ligeramente diferente para las lipasas de hongos, en la cual el ácido aspártico es sustituido por el glutámico. El sitio activo normalmente está seguido de una secuencia de Glicina-x-Serina-x-Glicina, donde en lipasas bacterianas la glicina es sustituida por alanina (Weete, 2002).

El mecanismo para la hidrólisis de ésteres es esencialmente el mismo para lipasas y carboxilesterasas. En primer lugar, el sustrato es unido al sitio activo, después el alcohol es liberado para darse un ataque nucleofílico del agua y finalmente el producto es liberado quedando la enzima libre (Bornscheuer, 2002).

2.3. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) son enzimas que hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos en una interfase agua/aceite (Fennema, 1993). Debido a que las reacciones que catalizan son completamente reversibles, las lipasas se pueden emplear tanto para hidrolizar (con agua en exceso) como para reacciones de interesterificación (con limitante de agua). Esta propiedad permite que las lipasas realicen su acción dependiendo de la cantidad de agua que el sistema contenga lo que las hace sumamente versátiles (Figura 2).

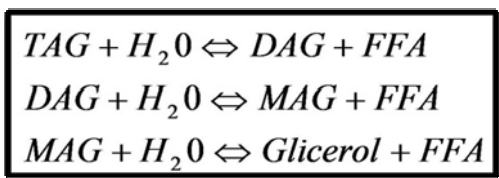


Figura 2. Reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas (el ejemplo muestra las reacciones con gliceroles).

Nota: TAG: Triglicérido; DAG: Diglicérido; MAG: Monoglicérido; FFA: Ácido graso libre (Maragoni, 2002).

Entre las reacciones de interesterificación de mayor interés comercial destacan: 1) *alcohólisis*, 2) *glicerólisis*, 3) *acidólisis* y 4) *transesterificación* (Figura 3). La *alcohólisis* es la reacción entre un alcohol y un éster; la *glicerólisis* es la reacción entre un éster y un glicerol; la *acidólisis* es la transferencia de un grupo acilo y un éster, y la *transesterificación* es el intercambio de grupos acil entre dos ésteres, principalmente entre dos triglicéridos o entre un triglicérido y un ácido graso (Maragoni, 2002; Figura 3).

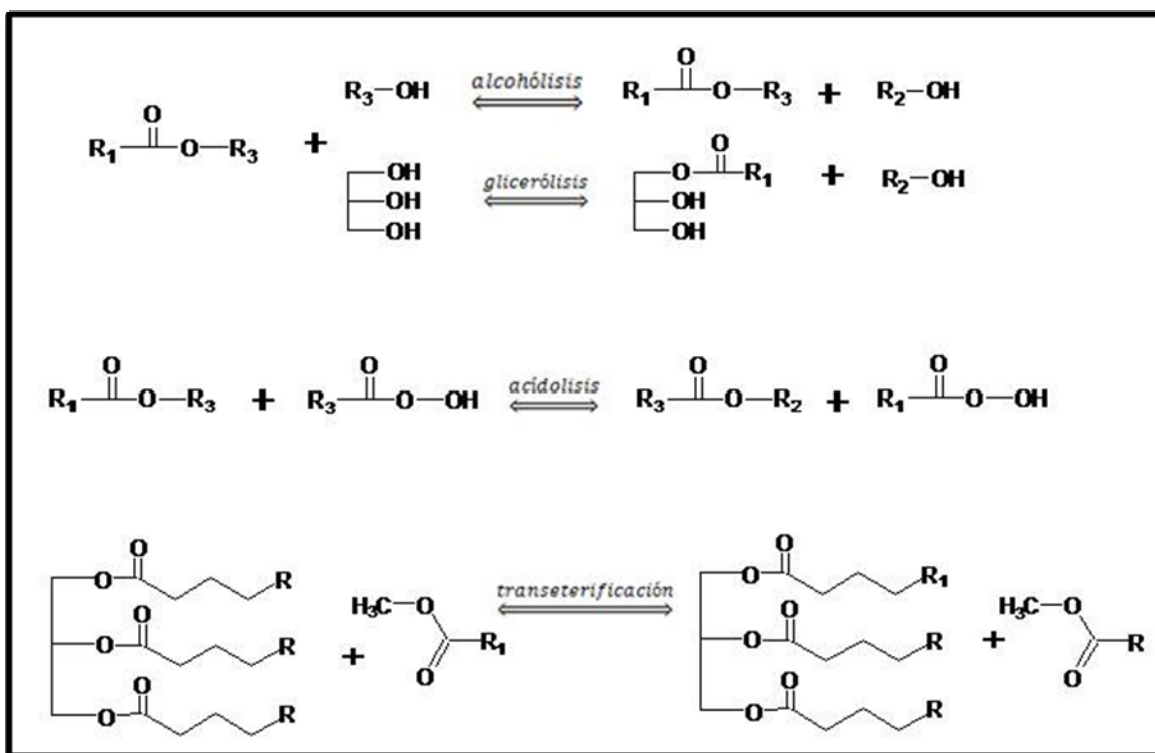


Figura 3. Reacciones de interesterificación catalizadas por las lipasas (Jaeger *et al.*, 1994).

Las lipasas pueden clasificarse de diferentes maneras, pero la clasificación más utilizada es aquella que se basa en la especificidad de la enzima por el sustrato. De acuerdo a su especificidad, existen tres diferentes tipos de lipasas cuyas características se describen a continuación.

- Lipasas no específicas al grupo acilo del glicerol o a la especificidad de la naturaleza del ácido graso. Por ello, existe una descomposición completa

del sustrato a glicerol y a ácido graso. Microorganismos con lipasas de estas características: *Candida rugosa* y *Staphylococcus aureus*.

- Lipasas que atacan específicamente las uniones en las posiciones 1 y 3 del sustrato, dando como mezcla diglicéridos y monoglicéridos. Debido a la inestabilidad del intermediario 1,2-diglicérido, 2,3-diglicéridos y 2-monoglicéridos estas lipasas pueden catalizar la descomposición completa del sustrato. La mayoría de las lipasas microbianas son de este tipo. Ejemplos microbianos: *Aspergillus niger* y *Rhizopus miehie*.
- Lipasas con preferencia por un ácido graso específico o por uno de cadena larga. *Geotrichum candidum* tiene especificidad por un ácido graso de cadena larga con una doble ligadura en la posición 9 (C-9). Este tipo de lipasas es de las menos comunes.

Existen algunas sustancias que pueden inhibir a las lipasas como son los iones metálicos, surfactantes aniónicos y los ácidos borónicos. Sin embargo, hay moléculas como el calcio que estimulan la actividad de las lipasas de tres formas: 1) uniéndose a la enzima dando como resultado un cambio conformacional, 2) facilitando la adsorción de la lipasa al sustrato y 3) removiendo ácidos grasos provenientes de la hidrólisis los cuáles a su vez pueden inhibir a la enzima (Weete, 2002).

2.3.1 Uso industrial de las lipasas

Las lipasas son enzimas muy importantes para la biotecnología, teniendo un amplio abanico de usos, especialmente en la industria de los alimentos, cosmética y de detergentes (Giudice *et al.*, 2006).

El valor de los lípidos depende del tipo de ácidos grasos que contengan. Por esta razón, las lipasas se pueden utilizar para transesterificar aceites baratos (como aceite de palma), a partir de los cuales se puede producir manteca de cacao (sustituto de grasa de leche), ácidos grasos poli-insaturados y lípidos de bajo contenido calórico (Hasan *et al.*, 2006).

Muchas lipasas se utilizan en la industria láctea para la aceleración en la maduración de quesos así como para la hidrólisis controlada de la grasa de la leche con el fin de utilizarse como aditivo en productos sabor queso: aderezos, sopas y salsas. Con este uso se logra un concentrado de sabor el cual tiene un costo mucho menor que si se utilizara queso puro (Paiva *et al.*, 2000).

En la industria de la panadería las lipasas se utilizan para alargar la vida de anaquel, incrementar la producción y mejorar la estructura de los panes. También pueden utilizarse en lugar de algunos emulsificadores e inclusive para incrementar el volumen del pan. En la industria de la confitería las lipasas son importantes para mejorar la textura de los caramelos suaves y los chiclosos debido a su impacto en la estructura de la mantequilla. En la elaboración de dulces de café, estas enzimas son utilizadas para aumentar la consistencia cremosa e intensificar el sabor (Hasan *et al.*, 2006).

Las lipasas pueden utilizarse también para la síntesis de compuestos ópticamente activos debido a la especificidad que llegan a tener. Por esta razón, pueden generar derivados de retinol (Vitamina A) los cuales tienen un gran uso en la industria farmacéutica y cosmética así como en la fabricación de cremas (Hasan *et al.*, 2006). Estas enzimas se han también empleado para el mejoramiento de sabores ya que remueven lípidos de productos lácteos, bebidas alcohólicas, carne y pescados. También pueden aplicarse para la degradación de lípidos en la piel de algunos animales lo que les ha dado uso en la industria de producción de pieles (Ko *et al.*, 2004).

Los esteroides vegetales, los estanoles y sus ésteres han demostrado ser eficaces en la reducción de la concentración plasmática del colesterol debido a que inhiben su absorción en el intestino delgado. Un uso reciente de estos compuestos ha sido al añadirlas a las margarinas que son comercializadas como alimentos funcionales para reducir tanto los niveles de colesterol total como las lipoproteínas de baja densidad o LDL (por sus siglas en inglés) que en niveles elevados en sangre son nocivas para la salud. La producción de estos esteroides

vegetales se pueden obtener con un mayor grado de eficiencia mediante la transesterificación con la ayuda de lipasas (Weber *et al.*, 2002).

Un nuevo uso de las lipasas es en la producción del biodiesel, denominado también diéster. Este es un combustible renovable sustituto del diesel que proviene del procesamiento de aceites vegetales tanto naturales como reciclados por ejemplo soya, girasol y palma así como de grasas animales. Se obtiene por un proceso de transesterificación de los aceites con el alcohol lo que se lleva a cabo con el uso de lipasas. En este proceso se forman ésteres grasos (biodiesel) y glicerina (OLADE, 2006).

Actualmente, el principal uso de las lipasas es en la fabricación de detergentes (tanto industrial como casero) ya que la degradación lipolítica mejora la remoción de la grasa en el proceso de lavado. Ello ayuda a que se gaste una menor cantidad tanto de detergente como de agua, así como propicia el uso de sustancias que sean biodegradables para proteger el medio ambiente (Paiva *et al.*, 2000).

2.3.2 Microorganismos productores de lipasas

Hoy en día se han identificado, purificado y caracterizado más de 50 lipasas, siendo la fuente más común de éstas los microorganismos ya que su producción es la más sencilla (Paiva *et al.*, 2000). Los microorganismos más estudiados y productores de estas enzimas son: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* de acuerdo con Hasan y colaboradores (2006). Algunos de los microorganismos productores de lipasas y su uso se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos, clasificación y usos de productores de lipasas.

Nombre del microorganismo	Clasificación microbiana	Uso	Referencia
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria	Producción de sabores	Jaeger & Eggert (2002)
<i>Candida antarctica</i>	Levadura	Transesterificación de aceites	Jaeger & Eggert (2002)
<i>Candida rugosa</i>	Levadura	Síntesis de compuestos	Jaeger & Eggert (2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacteria	Producción de biodiesel	Jaeger & Eggert (2002)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hongo	Industria láctea	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Mucor meihei</i>	Hongo	Industria láctea	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizomucor meihei</i>	Hongo	Preparación de cosméticos	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria	Médico	Hasan <i>et al.</i> (2006)
<i>Gordonia hirsuta</i>	Bacteria	No especificado	Goodfellow <i>et al.</i> (2009)

2.4. Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas están ampliamente distribuidas en diferentes tipos de organismos y catalizan la hidrólisis de ésteres entre el correspondiente ácido carboxílico y un alcohol (Susuki *et al.*, 2004). Estas enzimas prefieren la hidrólisis de ésteres de cadena corta pero también pueden llegar a catalizar la síntesis de ésteres y reacciones de transesterificación (Torres *et al.*, 2008).

2.4.1 Usos industriales de las carboxilesterasas

Las carboxilesterasas son utilizadas como biocatalizadores en aplicaciones biomédicas debido a su excelente capacidad para realizar reacciones estereo- y enantioespecíficas. Se les ha aplicado para la síntesis de fármacos como el

naproxeno, suprofeno, agentes antitumores, alcaloides, y vitaminas (Kaiser *et al.*, 2006).

Estas enzimas pueden ser utilizadas para la elaboración de sabores especialmente frutales. Las carboxilesterasas de bacterias lácticas, aquellas de algunas *Pseudomonas* y de algunos hongos, son las responsables de producir este tipo de sabores en los alimentos por lo que son la fuente principal para el desarrollo de sabores frutales en la industria (Mohamed *et al.*, 2000). El acetato de isoamilo es uno de los sabores más utilizados en la industria alimentaria y puede sintetizarse empleando carboxilesterasas a partir de un alcohol primario (Torres *et al.*, 2008).

Una de las adulteraciones más importantes en la industria de los alimentos es en el tipo de carne que se utiliza y que se declara. Por ejemplo, muchas veces en los embutidos se declara carne de res y realmente se utilizó carne de caballo o de otro animal. La identificación del tipo de carne se hace a partir de los ésteres que caracterizan la carne de cada animal y para esto se utilizan las carboxilesterasas debido a su gran especificidad (Sharma *et al.*, 1994).

Entre las reacciones útiles por las carboxilesterasas se encuentran la resolución de mezclas racémicas por transesterificación y la enantioselectividad de ésteres para la obtención de compuestos ópticamente puros. La mayoría de estas síntesis se dan en un medio orgánico donde las enzimas conducen las reacciones que serían suprimidas en agua (Torres *et al.*, 2008). Al igual que las lipasas, las carboxilesterasas pueden ser utilizadas para la modificación de las propiedades fisicoquímicas de triglicéridos de aceites y grasas en la industria de alimentos (Kademi *et al.*, 2006).

Estas enzimas también tienen beneficios para el sector agrícola al agregar algunos ésteres a plantas como “*activadores*”. El activador se hidroliza mediante la acción de las carboxilesterasas liberando un ácido fitotóxico o un alcohol que resulta dañino para la maleza y/o algunos insectos indeseables (Gershater *et al.*,

2006). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de microorganismos productores de carboxilesterasas.

Tabla 2. Microorganismos, clasificación y usos de productores de carboxilesterasas

Nombre del microorganismo	Clasificación microbiana	Uso	Referencia
<i>Gordonia amarae</i>	Bacteria	No especificada	Klatte <i>et al.</i> (1994)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Bacteria	Modificación de triglicéridos	Bornscheuer (2002)
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria	Síntesis de compuestos	Bornscheuer (2002)
<i>Candida rugosa</i>	Levadura	Síntesis de compuestos	Bornscheuer (2002)
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Bacteria	No especificada	Bornscheuer (2002)
<i>Gordonia defluvii</i>	Bacteria	No especificada	Soddell <i>et al.</i> (2006)
<i>Lactobacillus casei</i>	Bacteria	No especificada	Oliszewski <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Bacteria	Producción de sabores	Oliszewski <i>et al.</i> (2007)
<i>Thermotoga maritima</i>	Bacteria	No especificada	Levisson <i>et al.</i> (2009)

2.5. Factores abióticos y la actividad lipolítica

De acuerdo con los estudios realizados por Jonsson & Snygg (1974) y Adams & Brawley (1981), la actividad lipolítica es sensible a diversos factores abióticos. El efecto del pH, ya sea al disminuirlo, mantenerlo en valor neutro o aumentarlo, afecta la actividad lipolítica de una gran cantidad de bacterias. Estudios con respecto a la temperatura reportan que la actividad lipolítica se presenta en un amplio rango de temperatura (1 a 40°C) con una actividad máxima al trabajar entre los 30 y los 40°C (Anderson, 1980; Papon & Talon, 1988).

2.5.1 Factores abióticos y lipasas

Las lipasas sólo son catalíticamente activas a pH específicos, dependiendo de su origen y del estado ionizado de los residuos del sitio activo. El pH óptimo para la mayoría de las lipasas es entre 7 y 9 pero existen algunas que son activas a pH ácidos (4) o básicos (10). En general, al incrementar la temperatura aumenta la proporción con la que se lleva a cabo la reacción pero a temperaturas muy altas se puede llegar a reducir la rapidez de la reacción por la desnaturalización de la enzima. De acuerdo con Maragoni (2002), la mayoría de las lipasas tienen una temperatura óptima entre los 30 y los 50°C.

En el trabajo realizado por Giudice y colaboradores (2006) se estudió la influencia del pH, temperatura y concentración del cloruro de sodio (NaCl) en la lipólisis, producido por microorganismos marinos. El efecto del pH se evaluó en valores entre 5 y 9, la concentración de NaCl de 0 a 11% (w/v) y la temperatura entre 4 y 15°C por 21 días. Para la actividad lipolítica se utilizaron agar con Tween 80, Tween 85, tributirina y trioleina como sustratos, midiéndose el diámetro del halo de degradación a los 21 días. En ese trabajo se evaluaron 155 bacterias aisladas de la Antártica. El 95.5% de los aislados del estudio de Giudice y colaboradores (2006) presentaron actividad lipolítica lo que sugiere que los ambientes marinos pueden ser una fuente de microorganismos con dicha actividad.

Para estudiar las diferentes combinaciones de los factores abióticos, se evaluaron específicamente 6 microorganismos, los cuales presentaron la mayor actividad lipolítica a bajas temperatura, 4 y 15°C, y que era parte del propósito del estudio. Sin embargo, y aunque las bacterias se aislaron de un ambiente antártico, la mayor actividad lipolítica se presentó a una temperatura de 30°C. Las condiciones óptimas de estas bacterias en Tween 80 fueron pH 7.4 y 1% de sal con un halo de degradación de 42 mm, para Tween 85 pH 7 y 1% con un halo de 32 mm, mientras que para tributirina pH 9 y 7% de sal con un halo de 20 mm. Estos microorganismos se identificaron como miembros del género *Pseudoalteromonas*. Se encontró que la menor actividad lipolítica se daba al

utilizar trioleína y no se evaluaron miembros de la clase *Actinobacteria* (Giudice *et al.*, 2006).

El único reporte donde se ha trabajado con algún miembro de la clase *Actinobacteria* es el trabajo de Keneally y colegas (1998) quienes investigaron los efectos de la temperatura, el pH y la concentración de sal en la actividad lipolítica de 32 bacterias aisladas de salchichas fermentadas. Las bacterias de ese trabajo incluían a los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*, este último parte de la clase *Actinobacteria*. Para observar la actividad lipolítica se utilizó agar tributirina, agar con aceite de oliva y agar con grasa de puerco midiéndose el incremento de ácidos grasos libres. El estudio se realizó a diferentes temperaturas, es decir, 4, 12, 20, 30 y 37°C, mientras que para el pH se evaluó un rango de 3 a 10, y la concentración de sal de 0, 1, 2.5, 3 y 5%. Los únicos géneros que presentaron actividad lipolítica fueron *Staphylococcus* y *Micrococcus*. La mayor actividad lipolítica fue a pH 7.0 aunque también hubo actividad lipolítica entre 5.0 y 9.0. Sin embargo, esta actividad fue casi nula a valores de pH menores a 5.0 y mayores a 9.0. La mayor actividad se dio a 30°C, existiendo actividad a valores entre los 20 y los 37°C. En cuanto a la concentración de sal, se encontró que sin la adición de sal se obtenía una mayor actividad y que mientras mayor era la concentración de sal menor era la actividad lipolítica de los microorganismos de estudio.

En el estudio de Ko y colegas (2004) se extrajeron bacterias (incluyendo actinomicetos) y hongos de suelos agrícolas. A estos microorganismos se les determinó la actividad lipolítica en agar con 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4% de aceite de girasol y 0.01% de Tween 80, incubándolos por 7 días a 24°C. La mayor actividad se presentó a 0.1% de aceite de girasol y 0.01% de Tween 80 encontrándose que fueron los actinomicetos los microorganismos que mayor producción de lipasas tuvieron. El 55.9% de los actinomicetos aislados de estos suelos presentaron una actividad lipolítica de 23.3% y los hongos y otras bacterias un 8.5%.

Odibo y colegas (1995) utilizaron aceite de oliva para inducir la producción de lipasas a partir de *Hendersonula toruloidea* (un hongo). En este caso, se estudiaron concentraciones desde 0.1 hasta 3.8% de aceite de oliva encontrándose que la mayor actividad se presentaba al 0.2%. Los pH estudiados fueron de 4.0 a 9.5, y la actividad más alta fue a un valor de pH de 6.0 y la menor a pH 9.5.

2.5.2 Factores abióticos en carboxilesterasas

Susuki y colaboradores (2004) estudiaron las carboxilesterasas de la bacteria aerobia y termo-acidófila *Sulfolobus tokodaii*. Las temperaturas utilizadas para evaluar esterasas empleando *p*-nitrofenil butirato como sustrato fueron desde los 37 hasta los 75°C y valores de pH entre 6.0 y 9.0. Estos autores encontraron que la actividad de la enzima incrementaba conforme aumentaba la temperatura alcanzando su máximo a los 70°C. La actividad esterasa en particular se dio en un amplio rango de pH (6.0 a 9.0) con un máximo de pH entre 7.5 y 8.0.

Torres y colaboradores (2008) investigaron la actividad de las carboxilesterasas de *Bacillus licheniformis* S-86 en un rango de temperatura de 37 a 75°C y de pH de 4.0 a 10.0. Los resultados indicaron que la enzima mostraba actividad en un amplio rango de temperatura, desde los 37 hasta los 75°C. La actividad esterasa incrementó de un 61% a 37°C a un máximo de 100% a 60-65°C y decayó a un 55% a 70°C. La actividad fue máxima a pH 8.0, mientras que a pH 9.0 y 10.0 fue ligeramente menor. Sin embargo una disminución de la actividad se observó por debajo de pH 7.0, con actividad casi nula a pH 4.0.

Giudice y colaboradores (2006) estudiaron tanto factores abióticos para lipasas como para carboxilesterasas. Estos autores utilizaron medios con Tween 20, 40, 60. La actividad lipolítica fue generalmente mayor utilizando Tween 20 y Tween 40 que con los otros sustratos. Los microorganismos estudiados con mayor actividad esterasa fueron clasificados dentro de los géneros *Vibrio* y *Psychrobacter*.

En la Tabla 3 se muestra la mejor combinación de factores abióticos para los microorganismos estudiados por Giudice y colaboradores (2006).

Tabla 3. Factores abióticos óptimos para la producción de esterasas en los géneros *Vibrio* y *Psychrobacter* (tomada de Giudice *et al.*, 2006)

Tween	pH	NaCl (%)	Temperatura (°C)
20	8	3.5	15
40	8	3.5	4-15
60	6	3.5	15

2.6 La Clase *Actinobacteria*

Esta clase está constituida por bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina en su material genético. El grupo microbiano mas reconocido son aquellos genéricamente denominados como *actinomicetos* por ser parte del orden *Actinomycetales*. La clase *Actinobacteria* actualmente engloba aproximadamente 52 familias y 256 géneros (Logan, 1994; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Figura 4) e incluye microorganismos que se encuentran prácticamente distribuidos en cualquier ecosistema aunque el suelo es el hábitat mayor estudiado por contar con una población de alrededor del 20 al 60% de actinomicetos (Logan, 1994).

Antiguamente los actinomicetos se incluían dentro del reino de los hongos debido a sus características macroscópicas, morfológicas y semejanza en su desarrollo. De hecho la palabra *actino* que proviene del latín significa *rayo* mientras que *myces* significa *hongo*. Fue después de numerosos estudios, y en particular aquellos basados en comparación de sus secuencias ribosomales del gen 16S rRNA, que se demostró que estos "*hongos radiados*" se encuentran filogenéticamente relacionados a las bacterias Gram positivas. El arrastre del término *actinomiceto* aún causa confusión incluso entre diferentes microbiólogos a pesar de que no contienen quitina ni compuestos celulósicos característicos de la composición de la pared celular de los hongos (Logan, 1994).

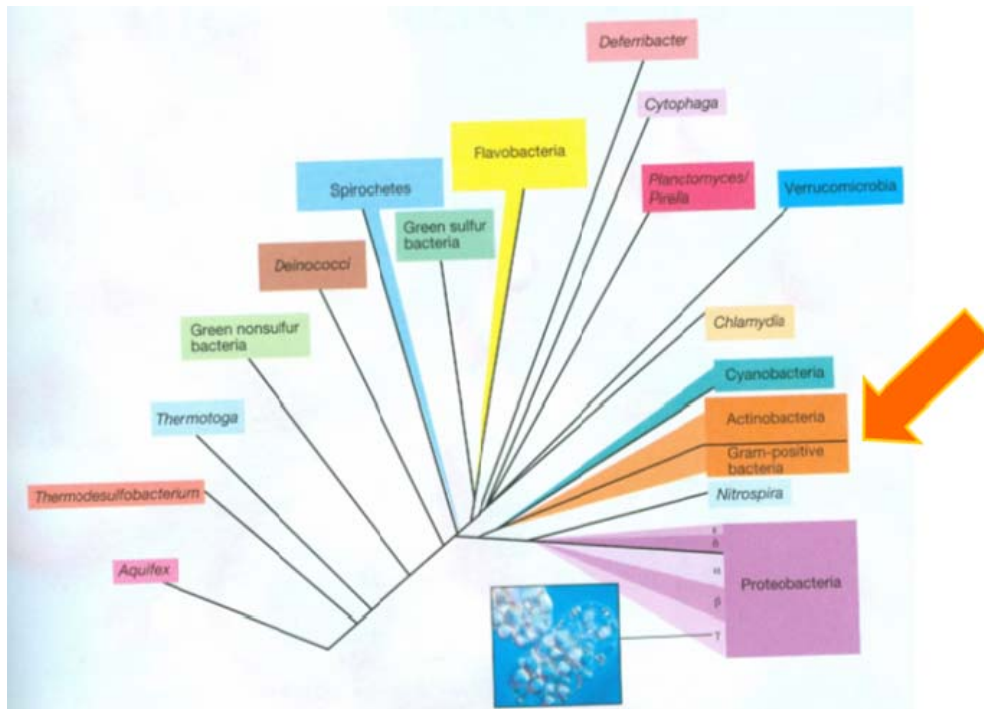


Figura 4. Árbol filogenético basado en secuencias del gen del 16S ribosomal. La flecha indica la posición de la clase *Actinobacteria* (modificada de Madigan *et al.*, 2009).

Los actinomicetos tienen un gran valor biotecnológico ya que son los responsables de la producción de la mitad de muchos de los metabolitos secundarios encontrados (Lam, 2006). Actualmente se cuenta con más de 10,000 productos aislados tan sólo del orden de los *Actinomycetales* (Bull & Stach, 2007). Entre los metabolitos secundarios que pueden llegar a producir se encuentran antibióticos, antitumorales, inmunosupresivos y precisamente, enzimas. Debido a la excelente trayectoria de las actinobacterias en este campo, se han diseñado numerosas estrategias para el aislamiento de éstas a lo largo de la historia. La falta de accesibilidad a hábitats poco comunes como lo constituyen los ecosistemas marinos, poco a poco se ha ido superando con el avance tecnológico (Bull *et al.*, 2000).

Actualmente a los actinomicetos se les reconoce como microorganismos variables con una alta diversidad micromorfológica. Estudios moleculares basados en secuencias del gen del 16S ribosomal permitió establecer un orden jerárquico para la estructura de la clase (Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009). Géneros

reconocidos en el pasado pero sin una asignación taxonómica estable como *Arthrobacter* fueron finalmente incluidos (Logan, 1994) mientras que los géneros *Dietzia* y *Gordonia* ahora agrupan microorganismos de características quimiotaxonómicas distintivas (Goodfellow & Maldonado, 2006).

La morfología de los actinomicetos no es una acumulación de muchas células individuales y uniformes sino más bien una masa de filamentos ramificados, de ahí que en algunos casos sigan siendo considerados como hongos. Una colonia de estas bacterias en un medio sólido se integra por un micelio vegetativo o de sustrato y un micelio aéreo. Cuando el micelio aéreo está ausente, la superficie de la colonia es lustrosa o mate mientras que si el micelio aéreo está presente las colonias pueden ser de aspecto algodonoso. En términos generales el micelio de sustrato muestra un color característico que puede ser crema, amarilla, anaranjada, verde, pardo o incluso negro (Logan, 1994).

Hasta hace algunos años, se creía que las actinobacterias recuperadas de ambientes marinos sólo eran miembros de los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*. Sin embargo estudios recientes han también reportado a los géneros: *Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Streptosporangium* y *Williamsia* (Chen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005; Gontang *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2009).

Lo anterior es importante si se considera que a pesar de que el ambiente terrestre cuenta con una gran diversidad, la mayor biodiversidad microbiana del planeta está en los océanos (Munn, 2004; Sogin *et al.*, 2006). Los océanos constituyen cerca del 70% de la superficie total del planeta siendo la parte más grande de la biósfera (Munn, 2004). México cuenta con 2,946,825 km² de superficie marina en la que se ejerce libre soberanía para explorar, explotar, conservar y administrar los recursos de los fondos marinos nacionales (Cifuentes *et al.*, 1997; Gío, 1999). En algunos ecosistemas marinos, como arrecifes de

corales y sedimentos marinos, se estima que la diversidad biológica es mayor que en las selvas tropicales (Haefner, 2003).

2.7 Sedimentos marinos

El término *sedimento marino* se aplica al cúmulo de partículas de materia orgánica o inorgánica que se acumula en formas no definidas en el fondo del océano. Las partículas provienen de la erosión de las rocas, de la actividad de organismos vivos, de erupciones volcánicas y de procesos químicos. La mayoría del suelo oceánico se lastima normalmente por una lluvia continua de sedimentos. Estos sedimentos ocurren en un amplio abanico de tamaños, llegando a medir hasta 250 mm. Sin embargo, en su mayoría están formados de finas partículas como arena, arcilla y lodo blando midiendo de 2 mm hasta 0.04 mm (Figura 5; Garrison, 2004).

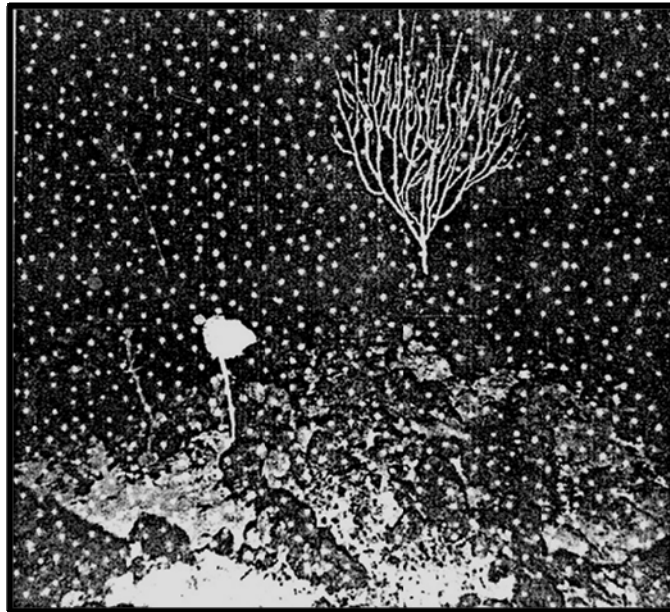


Figura 5. Sedimentos marinos del mar de Cortés (Garrison, 2004).

Los sedimentos se pueden clasificar principalmente en dos: terrígenos y biogénicos. Los terrígenos están formados por erosión de la tierra, erupción volcánica y ráfagas de polvo, mientras los biogénicos están conformados por

acumulación de restos de animales y plantas del mar. La mayoría de los sedimentos marinos están constituidos por la mezcla de estos dos tipos de partículas. La composición de éstos varía según el lugar del mar de donde provengan. Por ejemplo, los que se encuentran en los márgenes continentales, se llaman sedimentos neríticos y están constituidos principalmente por material terrígeno; mientras que, en el fondo del mar, los sedimentos son formados en su mayoría por material biogénico y se les conoce como sedimentos pelágicos (Garrison, 2004).

Existe una considerable concentración de bacterias en el mar siendo en los fondos marinos de 10^{11} células/cm³. La cuenta más alta y producción de las mismas ocurre en los sedimentos pelágicos, debido a que en ellos las bacterias encuentran la mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento de acuerdo con Kennish (2001).

2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación molecular

Actualmente, los métodos más específicos e informativos empleados para la identificación de los microorganismos están basados en la información proveniente del secuenciamiento de nucleótidos a partir de regiones específicas de ADN, en específico del gen ribosomal 16S. Esta molécula está universalmente distribuida y es funcionalmente homóloga en cada organismo lo que hace que la comparación a partir de secuencias homólogas sea una herramienta molecular para la identificación (Madigan *et al.*, 2009).

El operón del RNA ribosomal está formado de la siguiente manera (5' → 3'): gen 16S rRNA 16S, espacio interregión 16S – 23S, gen 23S rRNA, espacio interregión 23S – 5S y 5S rRNA (Figura 6). Los genes de la subunidad 16S rRNA son similares en longitud en todos los miembros del dominio procariote (alrededor de 1,500 pares de bases [pb]) y contiene regiones altamente conservadas así como regiones variables. Lo anterior sirve como una herramienta rápida y

confiable para la pronta identificación de grupos microbianos específicos en caso de localizar regiones únicas de grupos de interés (Stach *et al.*, 2003).

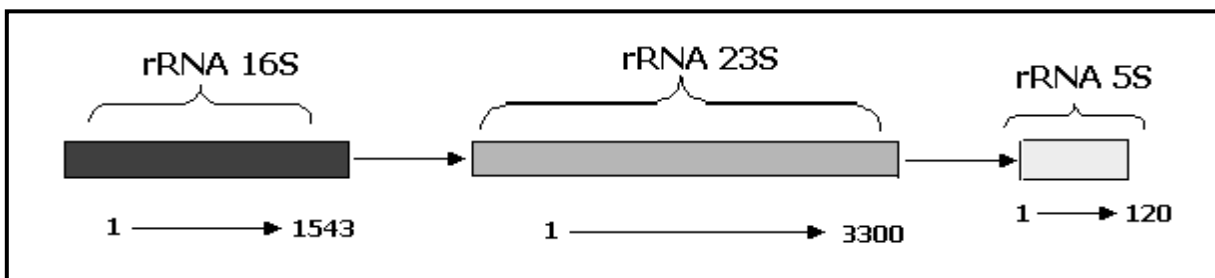


Figura 6. Operón del rRNA (cada rectángulo representa los genes presentes en el operón)
Nota: Las flechas indican la transcripción del operón, que va de izquierda a derecha y los números indican el tamaño aproximado de cada subunidad (modificada de Fragoso, 2009)

En 2003, Stach y colaboradores rediseñaron oligos específicos con base en regiones únicas del gen rRNA 16S para la clase *Actinobacteria* los cuales fueron usados en material genético extraído de muestras marinas y terrestres. De acuerdo con estos autores, los oligos propuestos aumentan la especificidad sobre oligos diseñados previamente, (McVeigh *et al.*, 1996; Heuer *et al.*, 1997) lo que los hace una herramienta confiable para la identificación molecular de este grupo bacteriano.

El empleo de cebadores u oligonucleótidos (primers, del inglés) universales que se unen complementariamente al inicio y final del gen del 16S rRNA permite que por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction, del inglés) se obtengan millones de copias que pueden ser purificadas y enviadas a secuenciar para su posterior análisis comparativo. La PCR es un método que permite sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir de cantidades muy pequeñas, amplificando exponencialmente una secuencia específica de ADN de doble cadena (Figura 7).

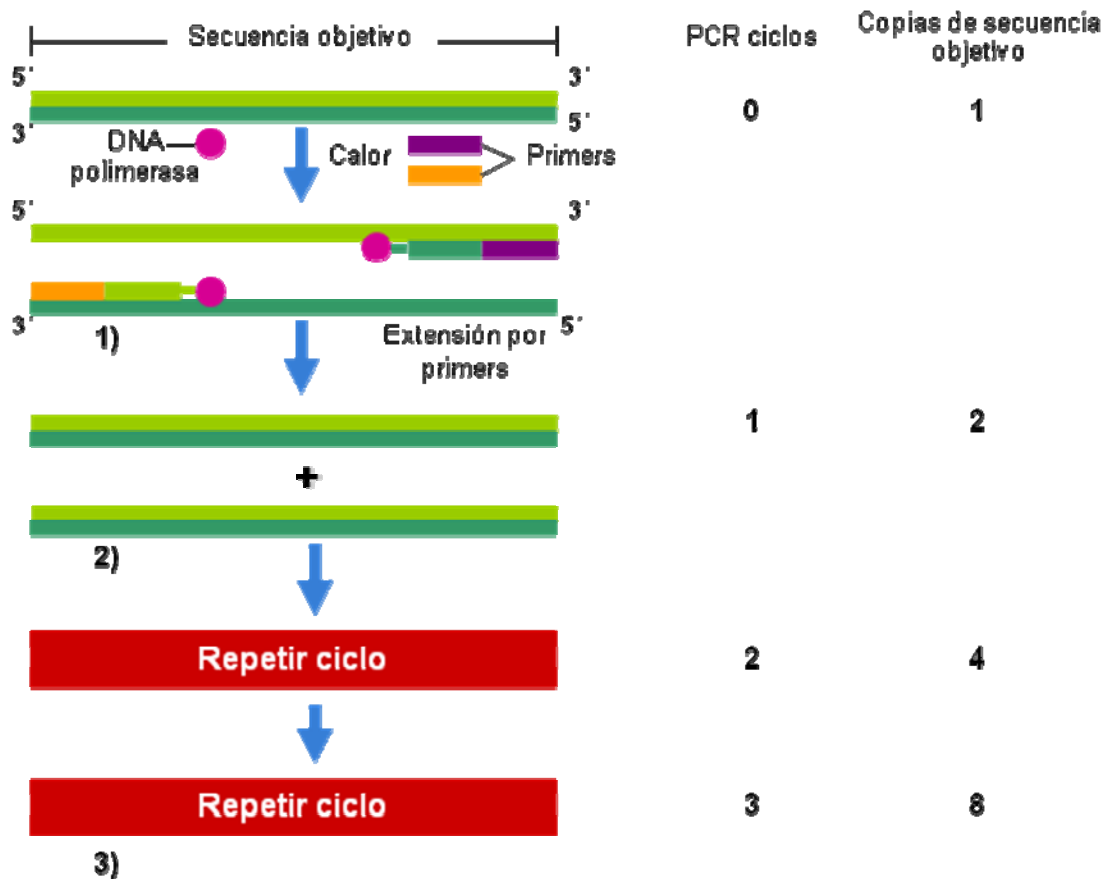


Figura 7. Diagrama de PCR. (1) Desnaturalización (94-96°C), (2) Hibridación (40 -68°C) y (3) Extensión (72°C); tomada de (Madigan *et al.*, 2009).

Por otra parte la secuenciación del ADN es la determinación del orden de bases en una molécula. Existen básicamente dos métodos: la degradación química (Maxam-Gilbert) y la síntesis enzimática de la región a secuenciar (Sanger). En secuenciación, un gran avance tecnológico lo constituyó la introducción de equipos automatizados los cuales se emplean para separar los productos de las reacciones de secuenciación, detectar y coleccionar (vía computadora) la información de estas reacciones así como establecer el orden de las bases para automáticamente deducir la secuencia de bases del fragmento de ADN de interés (Hardin, 2001).

Una vez obtenida una secuencia específica, ésta se puede comparar contra una bases de datos en sitios de libre acceso como el National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que contiene la herramienta BLAST (del inglés, Basic Local Alignment Search Tool). BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias al comparar secuencias de nucleótidos o de proteínas contra bases de datos calculando además la significancia estadística de la comparación. La determinación de la secuencia de un microorganismo “desconocido” y comparándolo via BLAST permite entonces la identificación de los microorganismos de estudio.

2.9 Objetivo general

- Evaluar y establecer, por medio de tres diferentes factores abióticos como el pH, la temperatura y la concentración de sal marina, las condiciones óptimas para la actividad lipolítica de doce actinobacterias aisladas de sedimentos marinos del Golfo de México.

2.10 Objetivos particulares

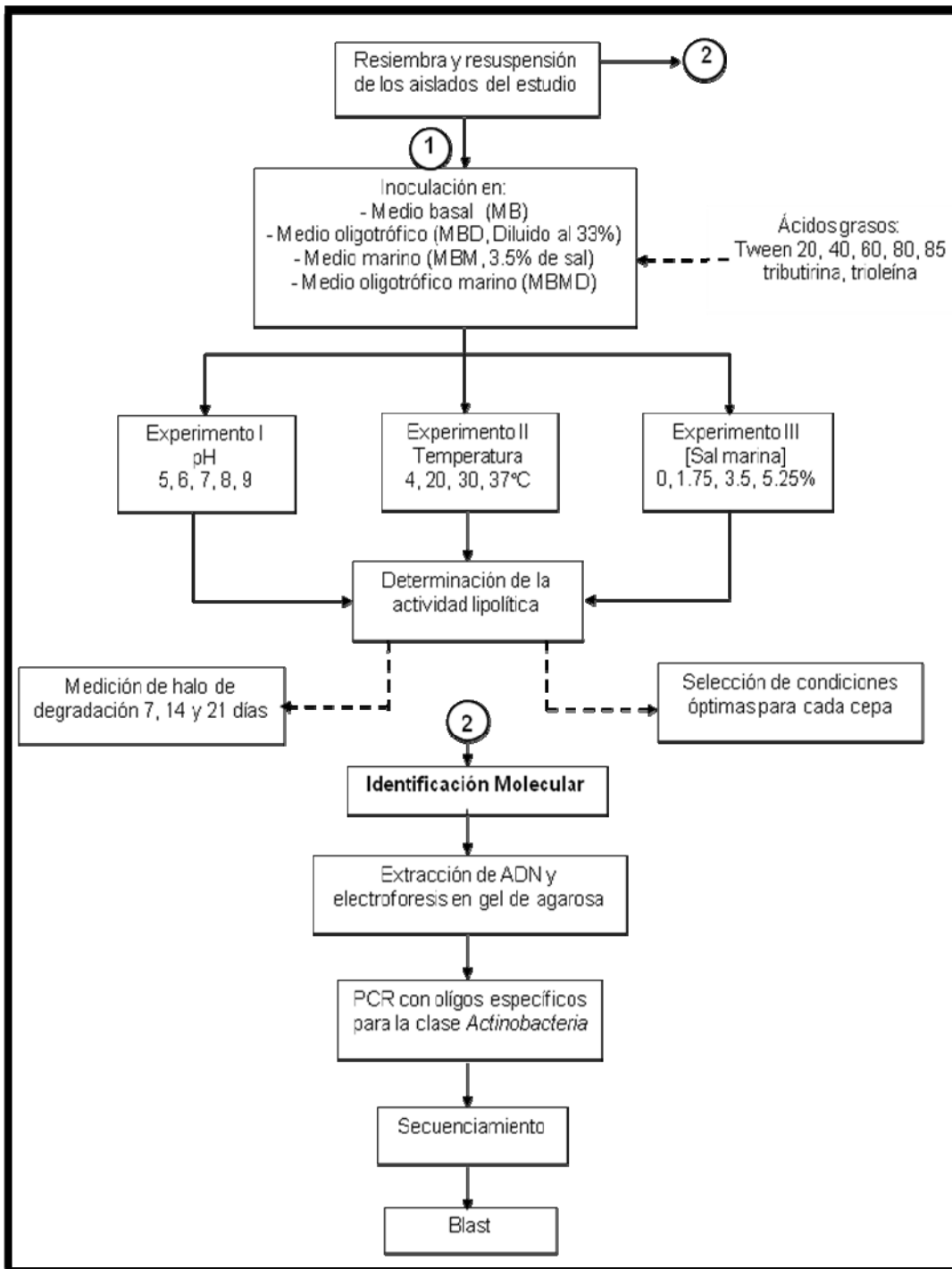
- Evaluar la actividad lipolítica de los microorganismos de estudio en un rango de pH de 5.0 a 9.0
- Evaluar la actividad lipolítica a temperaturas de 4, 22, 30 y 37°C
- Evaluar la actividad lipolítica a una rango de concentración de sal marina de 0.0 a 5.25%
- Determinar si los microorganismos de estudio poseen actividad lipolítica específica hacia un tipo de sustrato cuando se utilizan diferentes fuentes de lípidos
- Establecer si existe diferencia en la actividad lipolítica al sustituir el medio basal por un medio oligotrófico
- Determinar por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para la clase *Actinobacteria*, a qué género pertenecen los microorganismos de estudio

2.11 Hipótesis

Si se cultivan las 12 actinobacterias aisladas de sedimentos marinos a diferentes temperaturas, pHs, concentración de sal marina y nutrientes del medio de cultivo, entonces se podrá determinar las condiciones bajo las cuales la actividad lipolítica se expresa al máximo.

3. Metodología

El siguiente diagrama indica la estrategia experimental diseñada para el presente proyecto detallándose cada uno de los pasos en páginas posteriores.



3.1 Resiembra y resuspensión

Las doce cepas de los microorganismos identificados como L1 a L12 se resembraron en Agar Glucosa Extracto de Levadura (GYEA, del inglés; Gordon & Mihm, 1962; apéndice) y se incubaron por 7 días a 30°C. Una vez pasado este tiempo, se tomó una asada de cada microorganismo y se resuspendió en un mililitro de solución isotónica al 0.9% en tubos estériles de rosca (1.5 ml de capacidad). Estas suspensiones se conservaron en el refrigerador (4 °C). La cantidad de microorganismos presente en cada suspensión se estableció empleando los estándares de McFarland preparados de acuerdo a lo descrito en Murray y colaboradores (2003; apéndice).

3.2 Inoculación en medio sólido para observar la actividad lipolítica

Se prepararon cuatro medios de cultivo: medio basal (MB), medio basal diluido (MBD), medio marino (MBM con 3.5% de sal) y medio marino diluido (MBMD) los cuales se suplementaron con los diferentes ácidos grasos de estudio, es decir, Tween 20 (T20), Tween 40 (T40) Tween 60 (T60), Tween 80 (T80), Tween 85 (T85), trioleína (TO) y tributirina (TB). Los ácidos grasos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México) y se agregaron al 1% con excepción de TO y TB que se agregaron al 0.2% de acuerdo a lo indicado por Giudice y colaboradores (2006). Una vez preparados los medios, estos se esterilizaron en una autoclave a 121°C por 15 minutos para posteriormente vaciarse en cajas Petri de 60 x 15 mm. Las cajas Petri con los medios se inocularon con 8µl de las suspensiones microbianas empleando una micropipeta Gilson de 20 µL (Gilson, Francia) y puntas estériles (Axygen, EUA). Los medios se incubaron por 21 días a 30°C por tratarse de la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos de estudio.

3.3 Efecto del pH en la actividad lipolítica

Para preparar los pH de estudio (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0) se utilizó el sistema de búffer de fosfatos a 0.2 M. Para valores de pH 5.0, 6.0 y 7.0 se utilizó la parte ácida del búffer (KH₂PO₄; Sigma-Aldrich, México) mientras que para los valores de 8.0 y 9.0 se utilizó la parte básica (K₂HPO₄; Sigma-Aldrich, México). Se tomaron

50 mL del búffer de fosfatos y se ajustó con NaOH 1M o HCl 1M según el pH deseado. Las soluciones con el pH correspondiente se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Cada 50 mL de búffer caliente (aproximadamente 50°C) se adicionó a 50 mL de MB, MBD, MBM y MBMD (con cada fuente de lípidos) estéril para un volumen final de 100 mL. El pH del medio se comprobó utilizando papel pH con el remanente no vaciado en las cajas Petri de acuerdo a lo indicado por Duangmal (2004) y Quintana (2004).

Una vez obtenidos los resultados anteriores se seleccionaron tres valores de pH y tres fuentes de ácidos grasos con base en el grado de actividad lipolítica. También con base en estos resultados, el número de microorganismos de estudio se redujo a nueve.

3.4 Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica

Las temperaturas seleccionadas para este estudio fueron: 4, 22, 30 y 37 °C. Las nueve cepas se inocularon en placas con agar suplementadas con los tres diferentes lípidos en estudio. Para 4 °C las placas se colocaron en un refrigerador (Acros, México) y las demás se utilizaron incubadoras con ajuste digital (Quincy Lab, EUA).

3.5 Efecto de la concentración de sal marina en la actividad lipolítica

Las concentraciones de sal marina que se utilizaron fueron: 0, 1.75, 3.5 y 5.25%. Para preparar la concentración deseada de sal marina se utilizó sal de acuario (Instant Ocean, EUA). Estas concentraciones de sal se combinaron con los diferentes pH seleccionados, así como con las tres diferentes fuentes de lípidos.

3.6 Determinación de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó observando los halos “claros u opacos-nebulosos” (halos de degradación) alrededor o por debajo de las colonias los cuales se generaron durante la incubación (Keneally *et al.*, 1998). El diámetro

del halo de degradación se midió utilizando un Vernier y las lecturas se registraron a los 7, 14 y 21 días.

3.7 Identificación molecular de las cepas

3.7.1 Extracción de ADN

El método utilizado para la extracción de ADN de los microorganismos aislados y purificados consistió en una extracción fenólica. A tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL se agregaron 500 μ L de búffer Glucosa-Tris-EDTA (GTE, Apéndice) y perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, México) hasta la línea de 0.1 mL de cada tubo. A cada tubo se le agregó una asada de cada uno de los doce microorganismos de estudio depositando la biomasa en el fondo del tubo Eppendorf. Los tubos se mezclaron en un vórtex (Daigger, Vortex Genie 2, EUA) constantemente por 15 minutos a velocidad máxima para romper las células por un método físico. Un vez pasados los quince minutos los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 14,500 rpm y se transfirieron 450 μ L del sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf estériles también de capacidad de 1.5 mL.

A cada uno de estos tubos se les agregaron 450 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8, 1mM EDTA; Sigma-Aldrich EUA). Los tubos se mezclaron nuevamente en el vórtex por 5 segundos para posteriormente centrifugarse ahora por 10 minutos a 14,500 rpm. Después de la centrifugación los tubos presentaron dos fases y la fase superior se retiró con ayuda de una micropipeta Gilson (Gilson, Francia) a nuevos tubos Eppendorf estériles desechándose el tubo que contenía la parte inferior. Dependiendo del volumen transferido, se agregó la misma cantidad de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8, 1mM EDTA) y se mezclaron nuevamente durante 5 segundos en el vórtex para posteriormente centrifugarse por 10 minutos a 14,500 rpm. La parte superior fue nuevamente transferida a nuevos tubos Eppendorf estériles y el tubo que contenía la parte inferior se desechó. Se agregaron ahora 500 μ L de etanol absoluto (96-100%; Baker, México) frío (-20 °C) a cada tubo y se

invertieron 3 veces suavemente con el fin de favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos.

En varios casos, el ADN fue visible después de este paso. El ADN se identificó por la presencia de hebras blanquecinas dentro del tubo. El ADN se mantuvo a 4°C por 24 horas para terminar de favorecer su precipitación. Una vez pasado el tiempo, los tubos se retiraron del refrigerador y se centrifugaron por 10 minutos a 14,500 rpm. El líquido se decantó y el ADN concentrado en el fondo del tubo en forma de pastilla compacta se lavó agregando 200 µl de etanol al 70% repitiéndose este paso dos veces. En ambas ocasiones después de agregar el etanol al 70% los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm y el líquido se eliminó por decantación. El etanol remanente en los tubos se secó dejando invertidos los tubos sobre papel absorbente durante al menos 8 horas. La pastilla de ADN se resuspendió entonces en 75 µL de búffer TE 1X (Sigma-Aldrich, México). La visualización del ADN se realizó en un gel de agarosa por electroforesis horizontal como se describe a continuación conservándose las muestras a -20°C hasta su utilización.

3.7.2 Preparación y visualización de ADN en gel de agarosa

2.5 g de agarosa se disolvieron en 250 mL de búffer amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0.5X en un horno de microondas. En la campana de extracción se agregaron 0.75 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La agarosa se dejó enfriar por 10 minutos y se vació en una cámara de electroforesis horizontal con peines de plástico de 20 pozos (Sigma-Aldrich, EUA). Una vez polimerizado el gel después de un tiempo de 30 a 45 minutos, se retiraron los peines y se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis cubriéndose completamente con búffer amortiguador TBE 0.5X. Dos µL de ADN de cada una de las muestras se mezclaron con búffer de carga (2 µl) para posteriormente depositarse en cada uno de los pozos del gel. En el último pozo se agregó marcador de peso molecular (100 pares de bases, bp, del inglés; Bioline, EUA). Los respectivos electrodos

(+ y -) se conectaron en la cámara de electroforesis y la fuente de poder se programó a 100 Voltios dejándose correr el gel por 35 minutos.

Una vez pasados los 35 minutos, el gel se observó bajo un transiluminador (Probiotek, México) y la presencia de ADN se confirmó como una banda de alto peso molecular. Las imágenes resultantes se grabaron en un fotodocumentador UVISAVE (Probiotek, México) en una memoria CompactFlash de 256 Mb (Kingston Technology, EUA) en formato TIFF y se visualizaron en una computadora PC con el programa Paint Shop Pro versión 8.1 (JASC Corp, EUA).

3.7.3 PCR con oligonucleótidos específicos para la clase *Actinobacteria*

Comprobada la extracción de ADN, se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés) para amplificar exclusivamente una fracción del gen 16S rRNA de la clase *Actinobacteria* de acuerdo a lo descrito por Stach *et al.* (2003) con los iniciadores ACT254-F [5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3'] y ACT894-R [5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3']. Las cantidades de reacción para cada tubo de PCR se indican en la Tabla 4.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador TC-512 (Techne, EUA) bajo las siguientes condiciones: (a) 95°C por 1 minuto, (b) 55°C por 1 minuto y (c) 72°C por 1 minuto, pasos a, b y c repetidos por 35 ciclos y una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de PCR de cada muestra se examinó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% de acuerdo a lo indicado previamente esperando un producto de aproximadamente 650 bp.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de PCR para el presente estudio

Reactivos	Volúmenes para una reacción
Buffer NH ₄ (5X) (Bioline, EUA)	5µl
MgCl ₂ (50mM) (Bioline, EUA)	1.5µl
dNTPs (10mM) (Bioline, EUA)	1.25ul
Oligo 1 (ACT254-F) (20µM)	0.5µl
Oligo 2 (ACT894-R) (20µM)	0.5µl
DNA	0.5-0.7µl
<i>Taq</i> polimerasa (Bioline, EUA)	0.2µl
H ₂ O	Hasta obtener un volumen final de 50µl

3.7.4 Secuenciación de los productos de PCR

Una vez determinados los productos de PCR, estos se purificaron utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd, Alemania) de acuerdo a las indicaciones e instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron analizados nuevamente en una electroforesis horizontal en gel de agarosa para confirmar la presencia del producto y estimar su concentración por comparación contra un marcador de peso molecular de concentración conocida. Esta electroforesis se realizó como se describió previamente para las electroforesis horizontales de ADN y productos de PCR en los incisos anteriores. Los productos purificados se conservaron a una temperatura de -20°C hasta ser llevados al Instituto de Biología de la UNAM para su procesamiento de acuerdo a las indicaciones de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, responsable del laboratorio de Biología Molecular de dicho Instituto.

3.7.5 Comparación empleando GenBank y BLAST

Las secuencias obtenidas en el Instituto de Biología fueron enviadas en archivos de formato ZIP por correo electrónico los cuales al descomprimirse mostraban las secuencias resultantes en formato ABI. Los archivos en formato ABI se leyeron con el Software Chromas Lite Versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia) y el texto de la secuencias se exportó en formato de Texto al procesador de textos Word 2003 (Microsoft Corp, EUA).

El texto correspondiente a cada una de las secuencias obtenidas se copió dentro de la ventana de la opción BLAST del sitio GenBank. El proceso de comparación se ejemplifica a continuación.

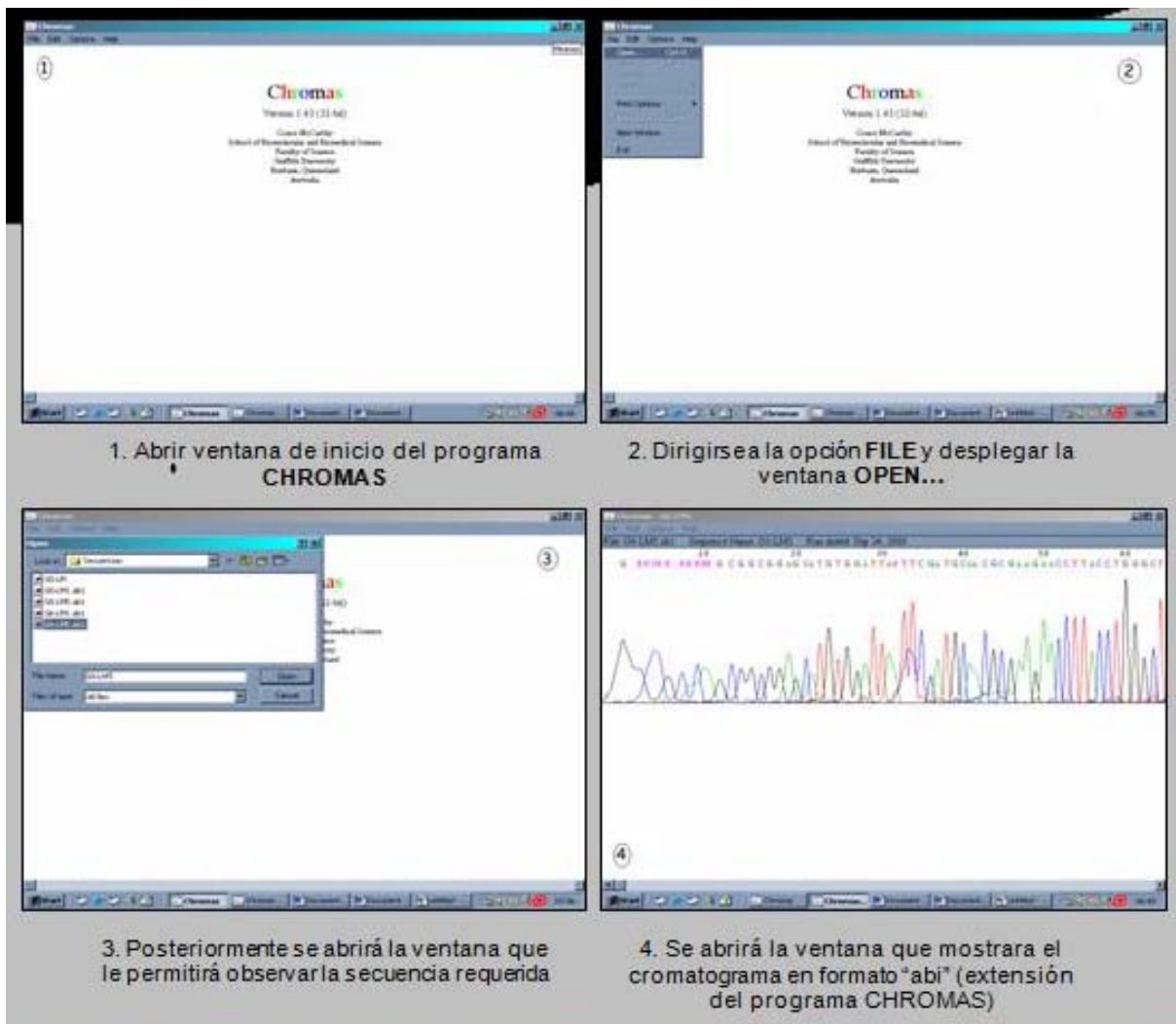
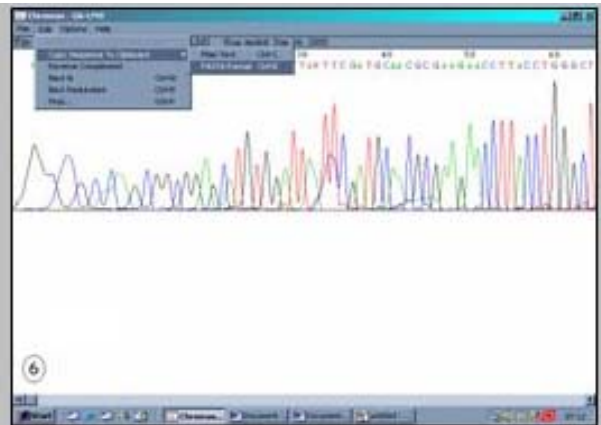


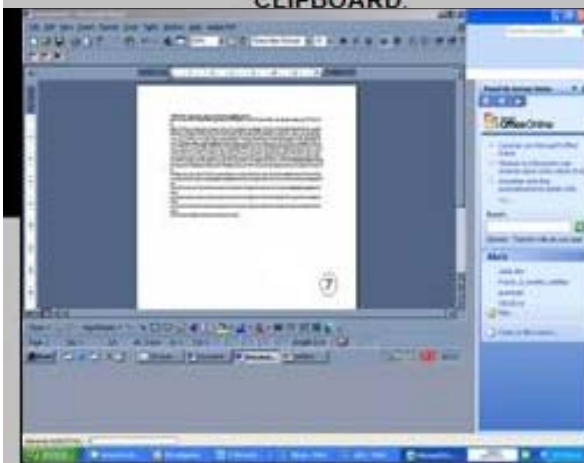
Figura 8. Diagrama general para el empleo de GenBank y BLAST a partir de una secuencia (modificado de Maldonado, 2009).



5. Dirigirse a la opción EDIT y desplegar la ventana COPY SEQUENCE TO CLIPBOARD.



6. Para poder exportarlo se debe seleccionar la opción FASTA FORMAT.



7. La secuencia obtenida se recomienda guardarla en una hoja de Word para su posterior uso.



8. El siguiente paso es acceder a la página de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> en la cual se tiene acceso a la base de datos llamada GenBank (banco de genes)

Figura 8. Continuación.



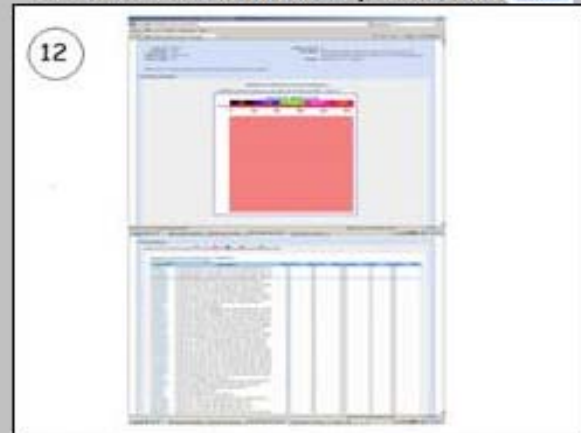
9. Una vez en GenBank, seleccionar el hipervínculo "BLAST", después "nucleotide blast"



10. Insertar la secuencia guardada en el paso 7, y en la ventana DATABASE elegir la opción NUCLEOTIDE COLLECTION y dar un clic en BLAST



11. La base de datos realiza la comparación de nuestra secuencia con todas aquellas en la base de datos (toma alrededor de 30 o 60 minutos la búsqueda)

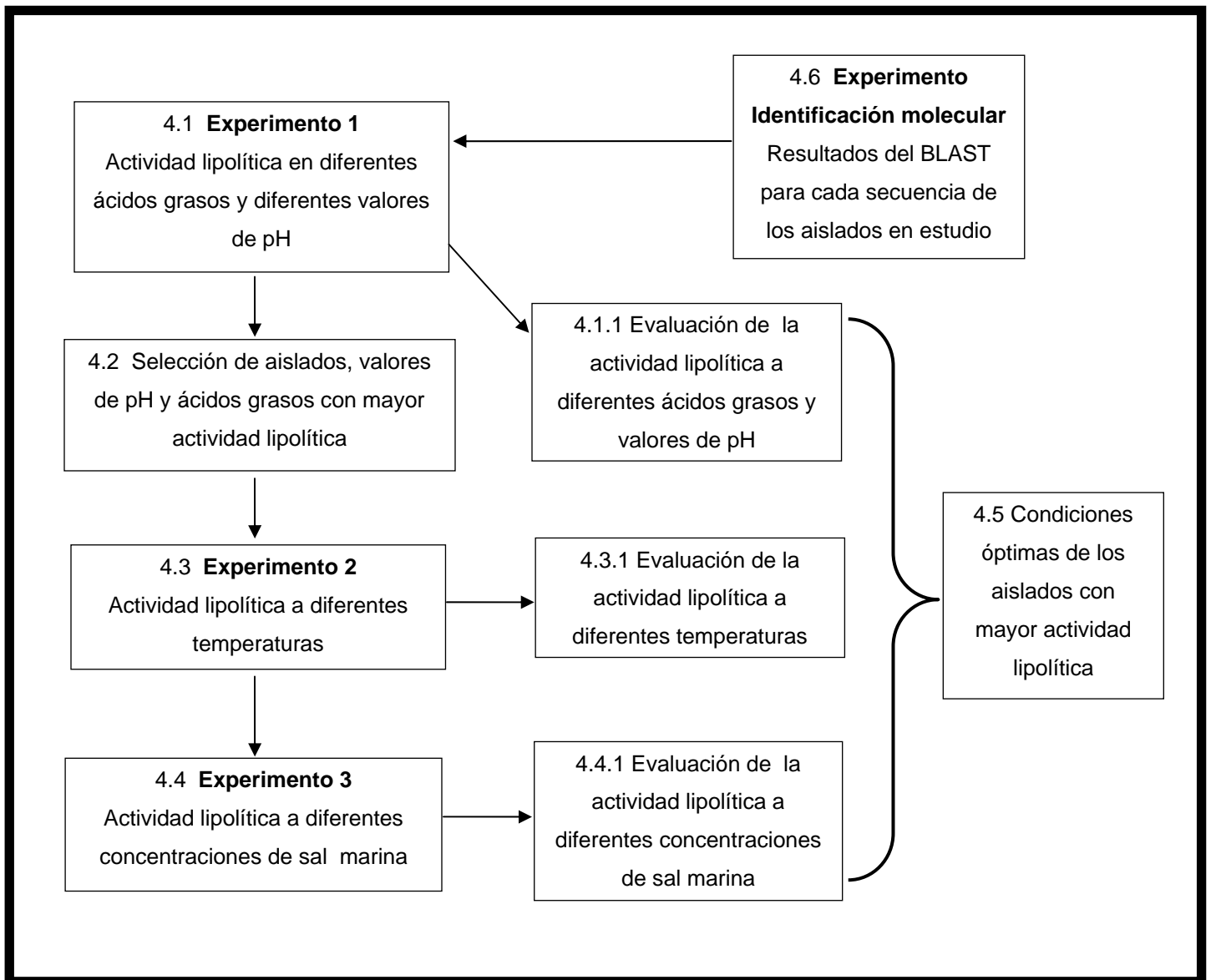


12. Automáticamente se obtiene una lista con (%) en orden decreciente respecto a la similitud de los diferentes microorganismos comparados. En la tabla se puede observar la identidad de cada microorganismo, es decir, género y especie el cual de manera general nos ha permitido identificarlos.

Figura 8. Continuación.

4. Resultados

El siguiente diagrama muestra los experimentos realizados durante el presente trabajo y los resultados de cada uno de ellos se detallan en las páginas subsecuentes.



4.1 Experimento 1: Actividad lipolítica de los aislados marinos a diferentes ácidos grasos y valores de pH

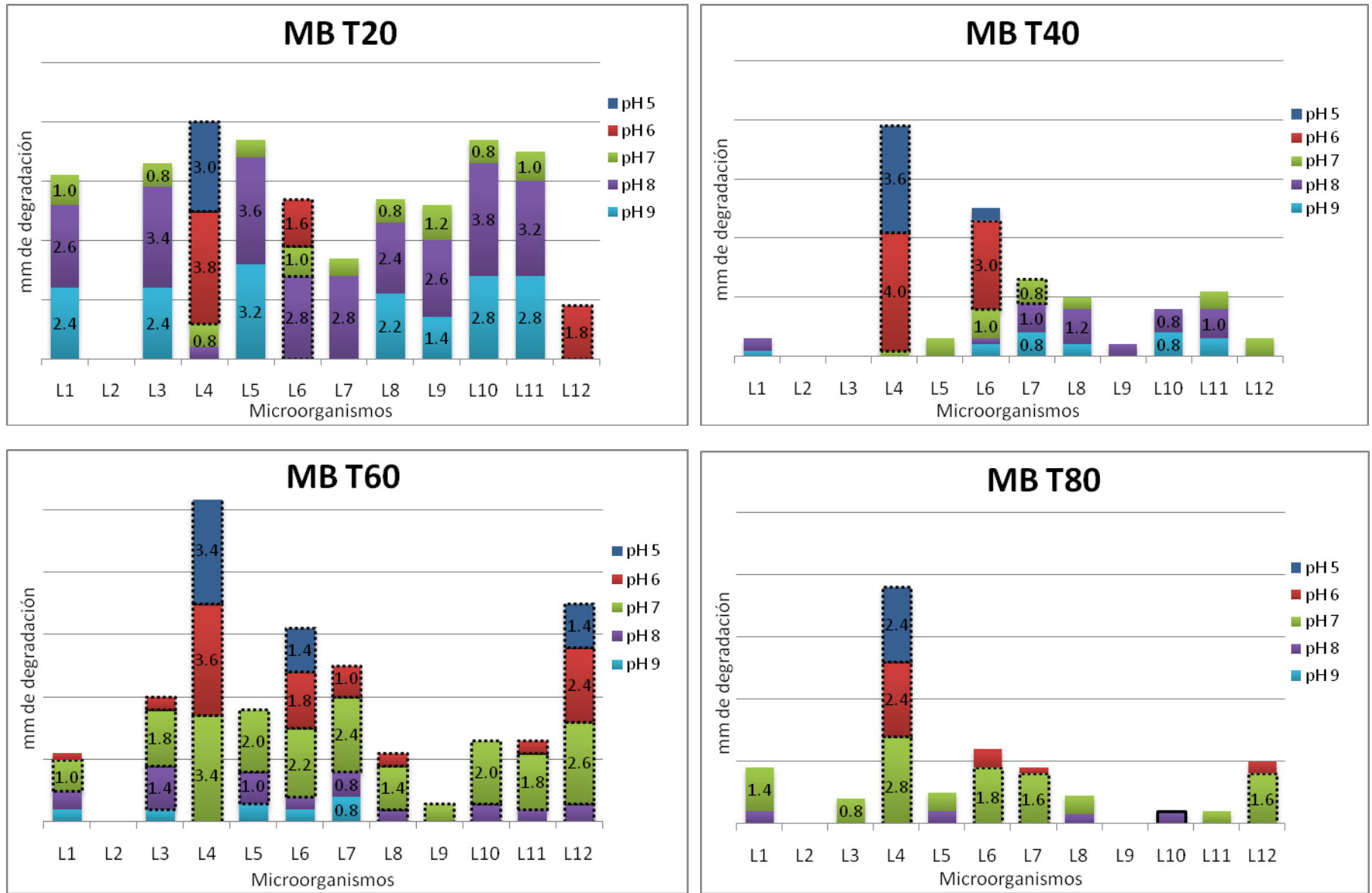


Figura 9. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MB incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

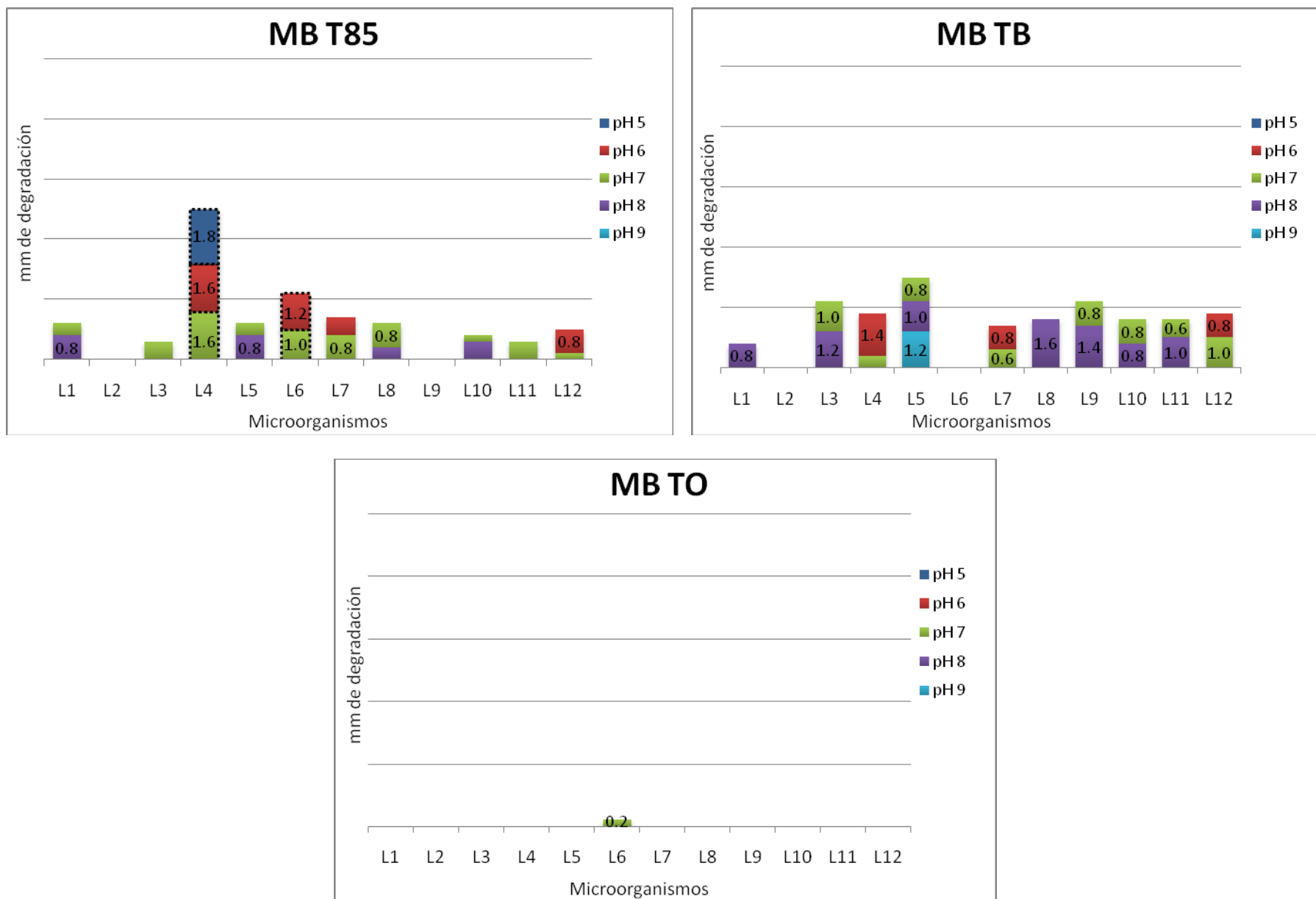


Figura 10. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MB incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

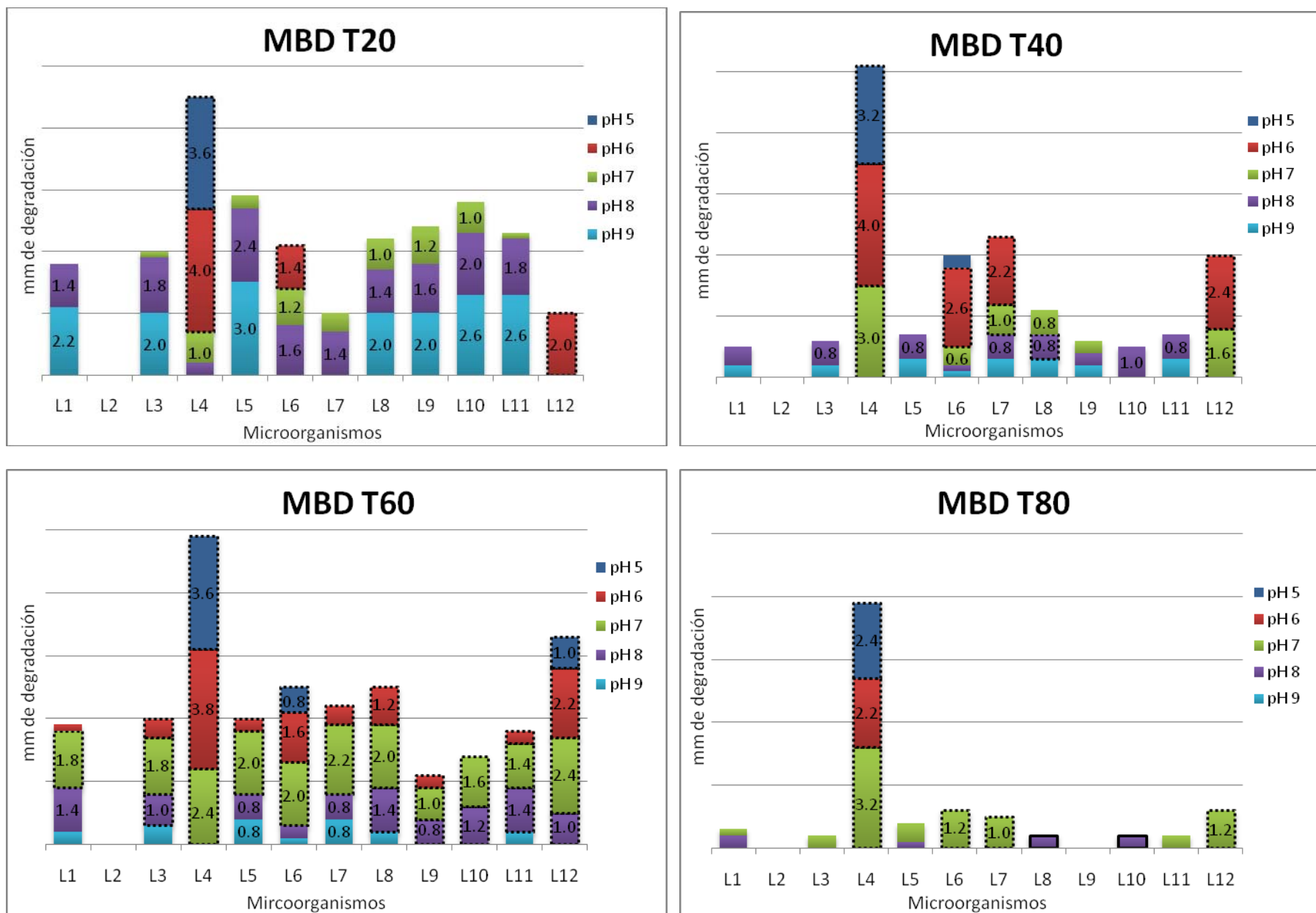


Figura 11. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

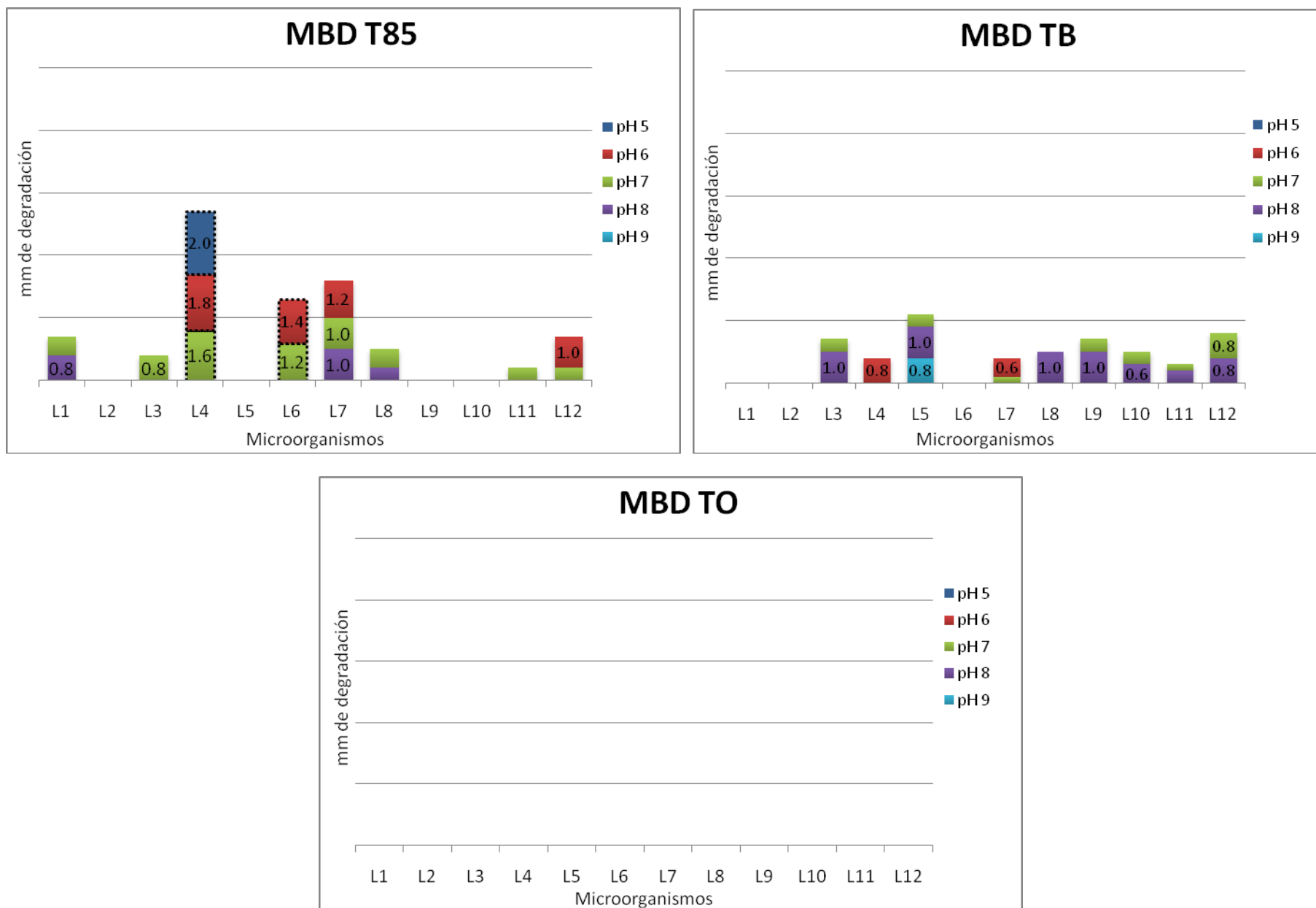


Figura 12. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MBD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

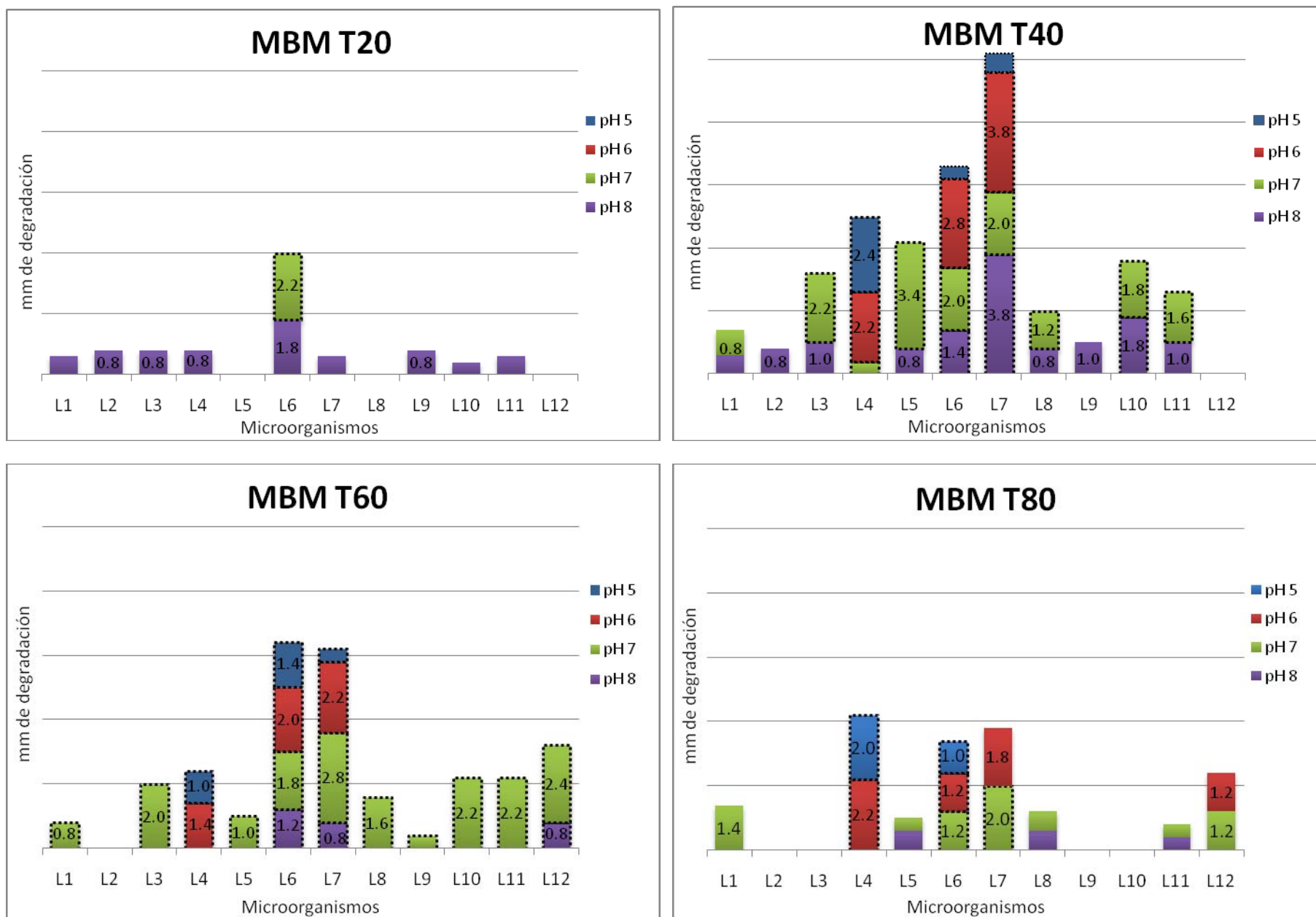


Figura 13. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBM incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

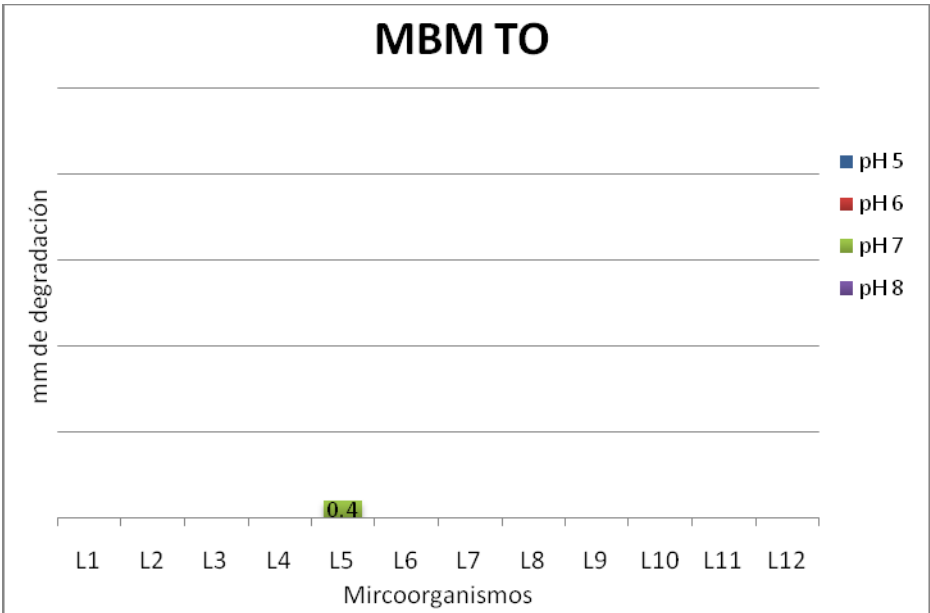
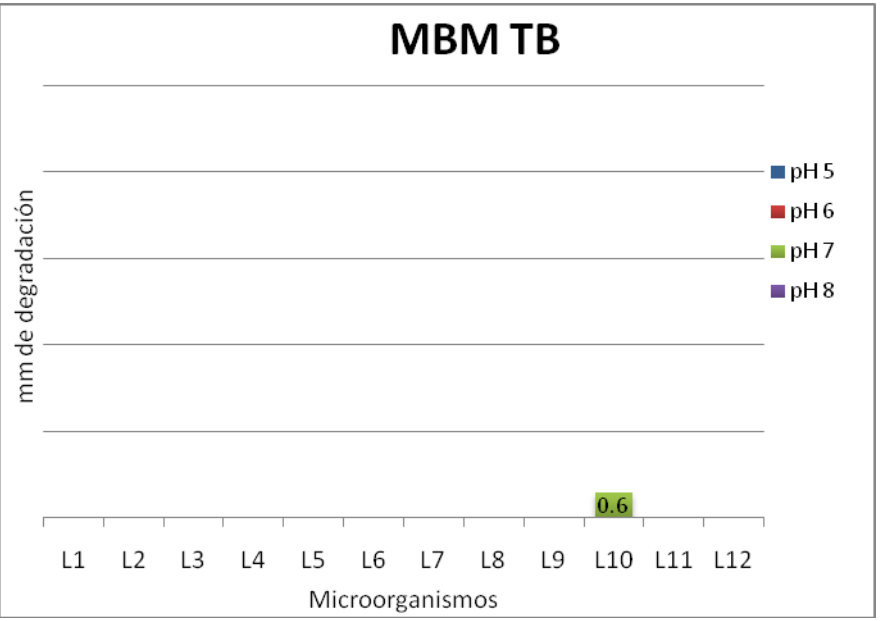
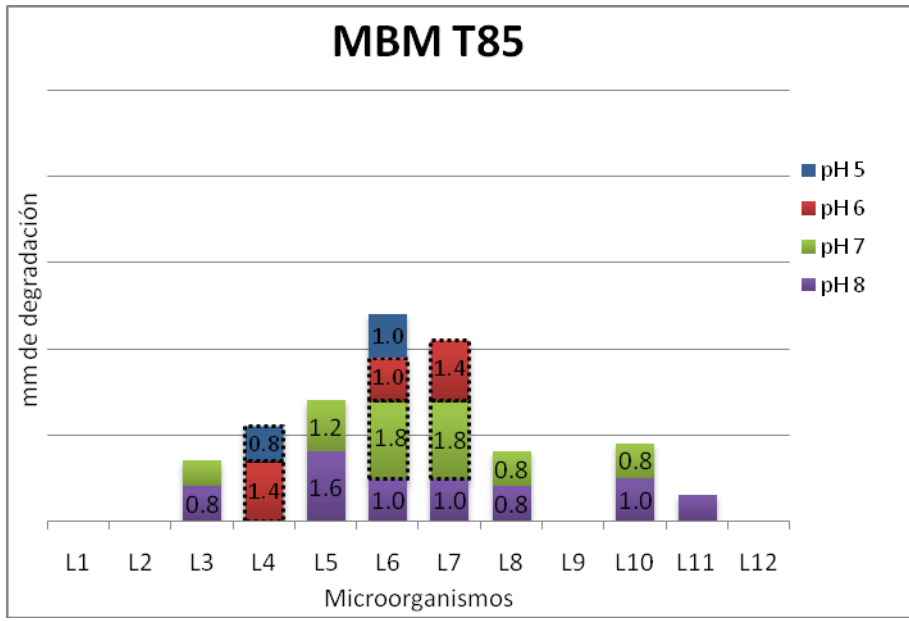


Figura 14. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MBM incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

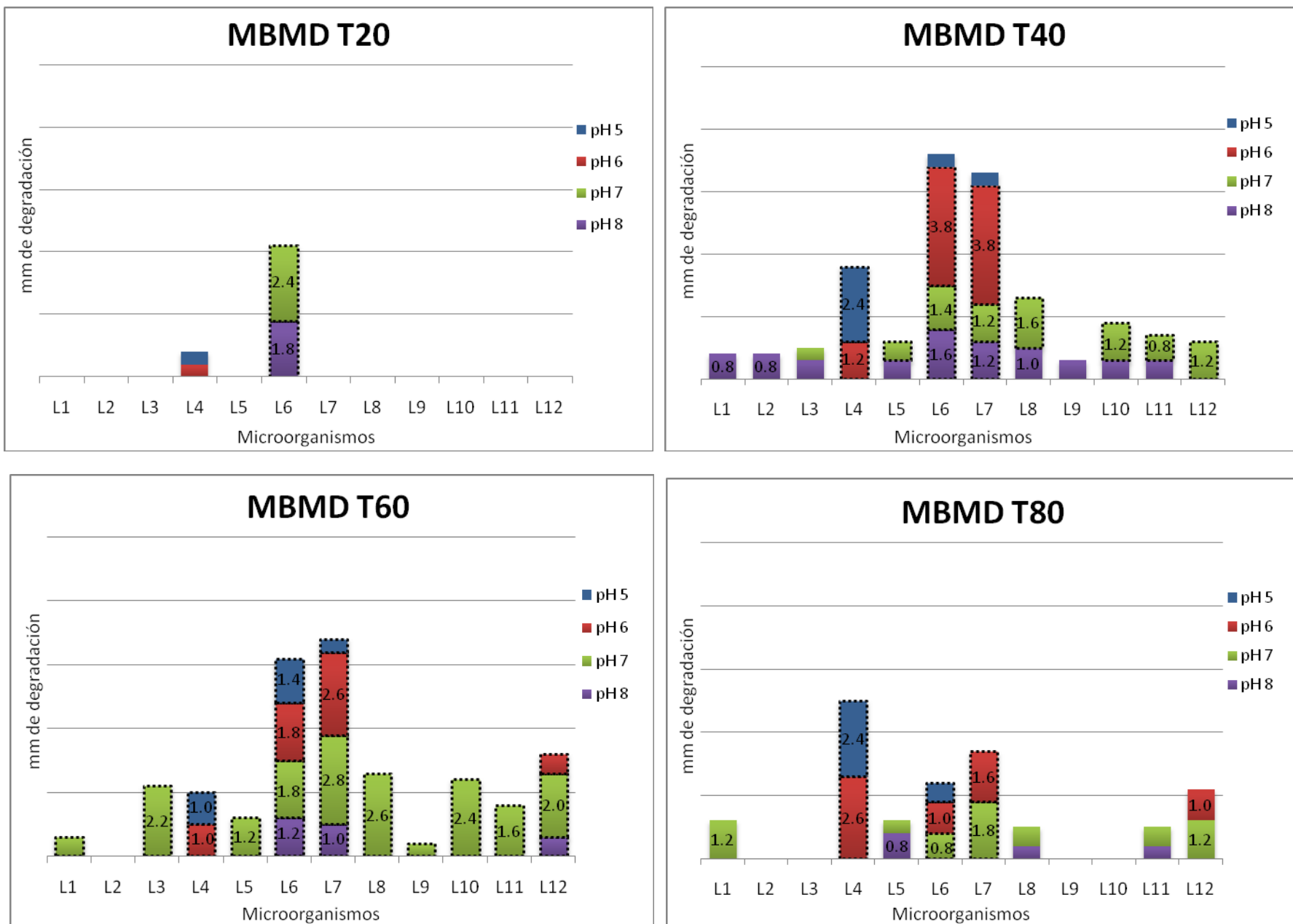


Figura 15. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBMD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

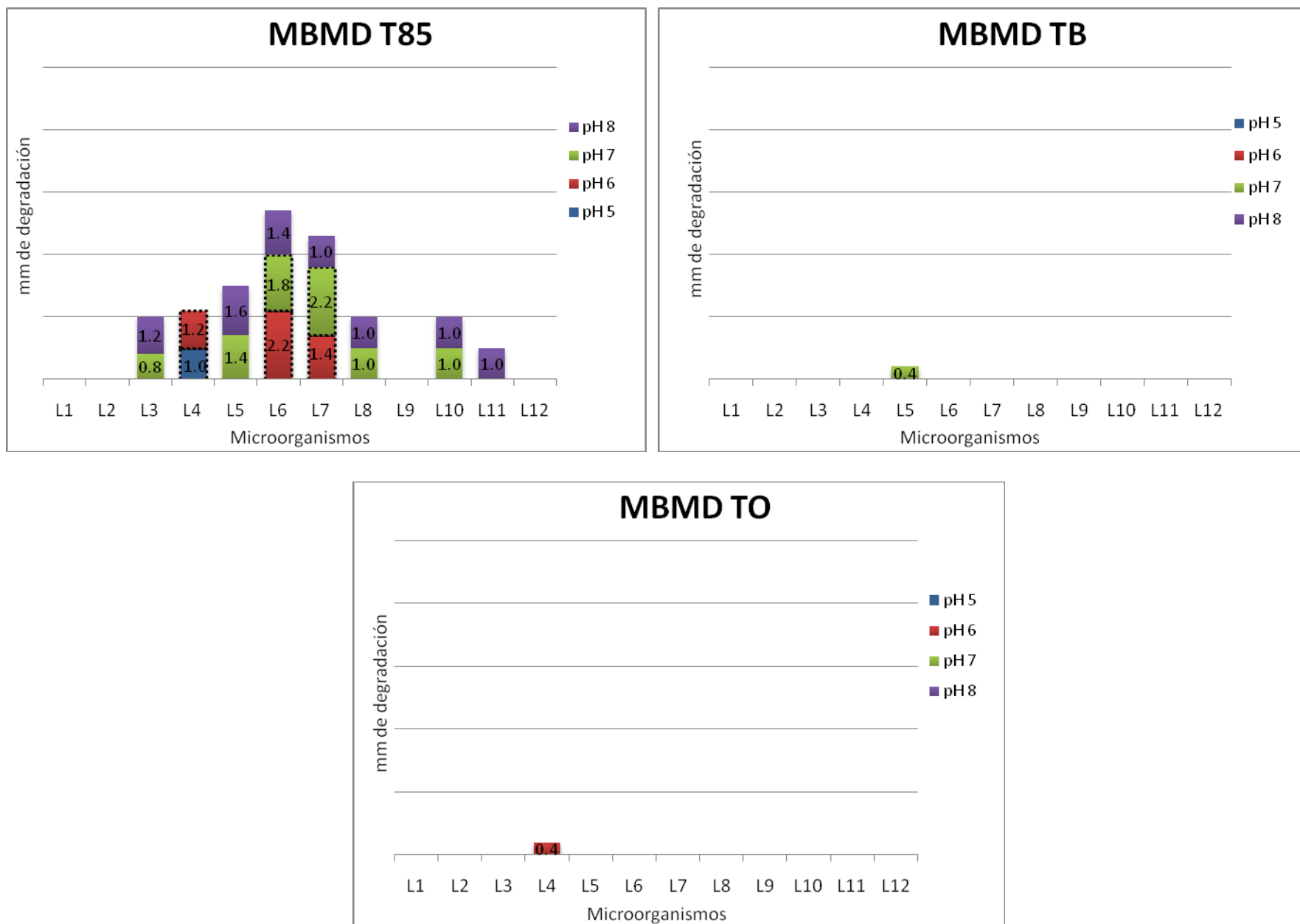


Figura 16. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB, TO) en MBMD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

4.1 Experimento 1: Actividad lipolítica de los aislados marinos a diferentes ácidos grasos y valores de pH

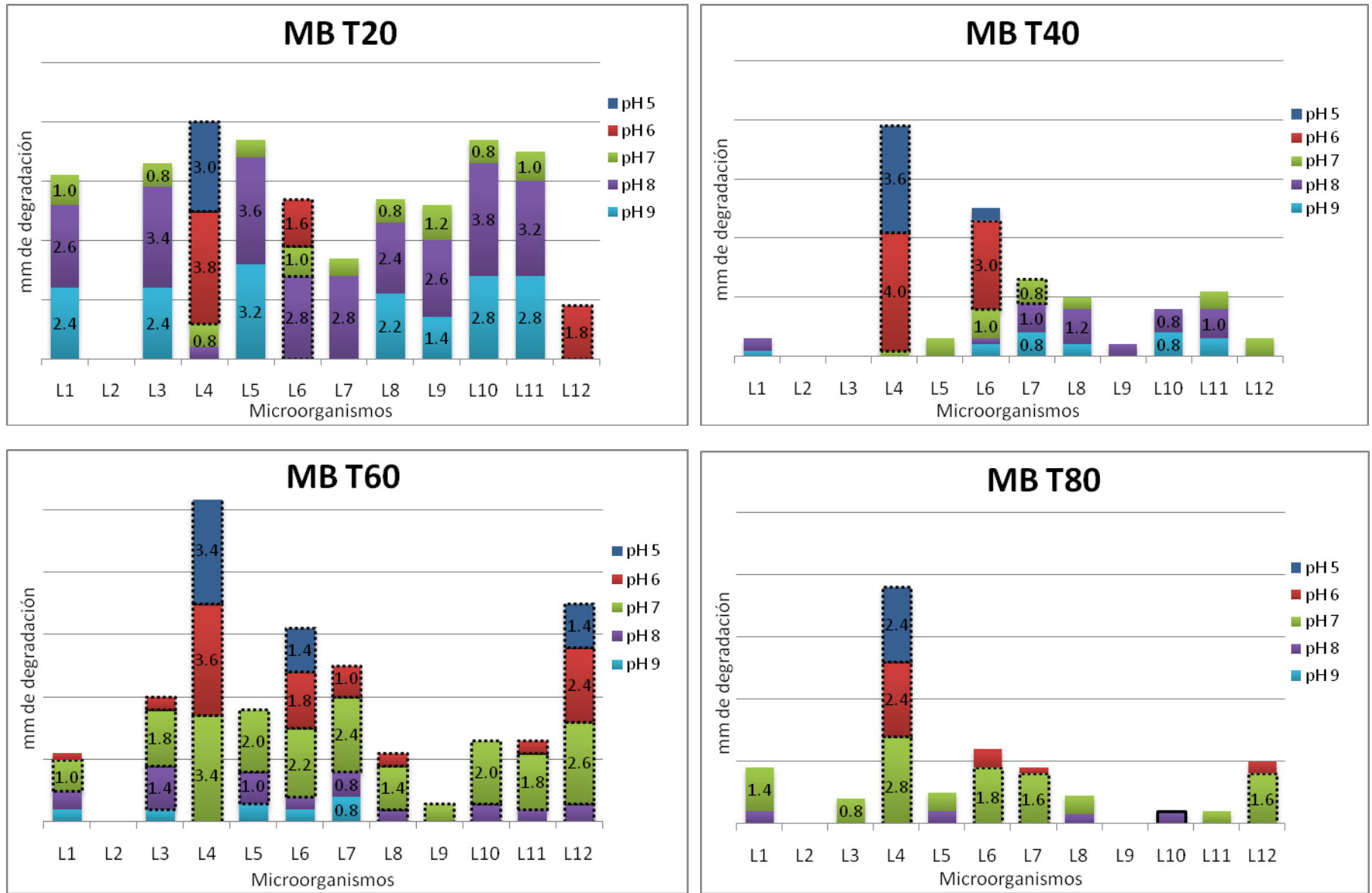


Figura 9. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MB incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

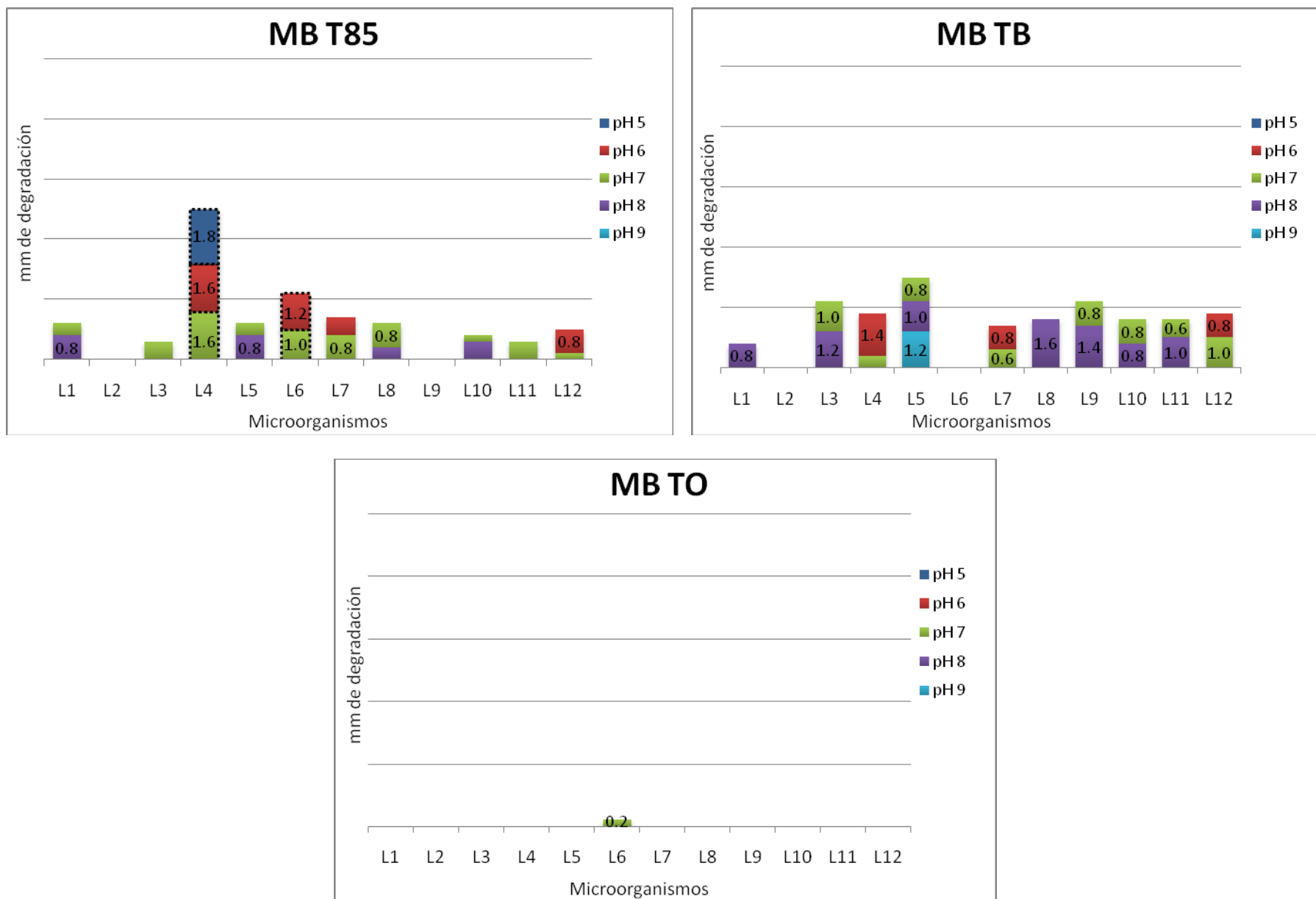


Figura 10. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MB incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

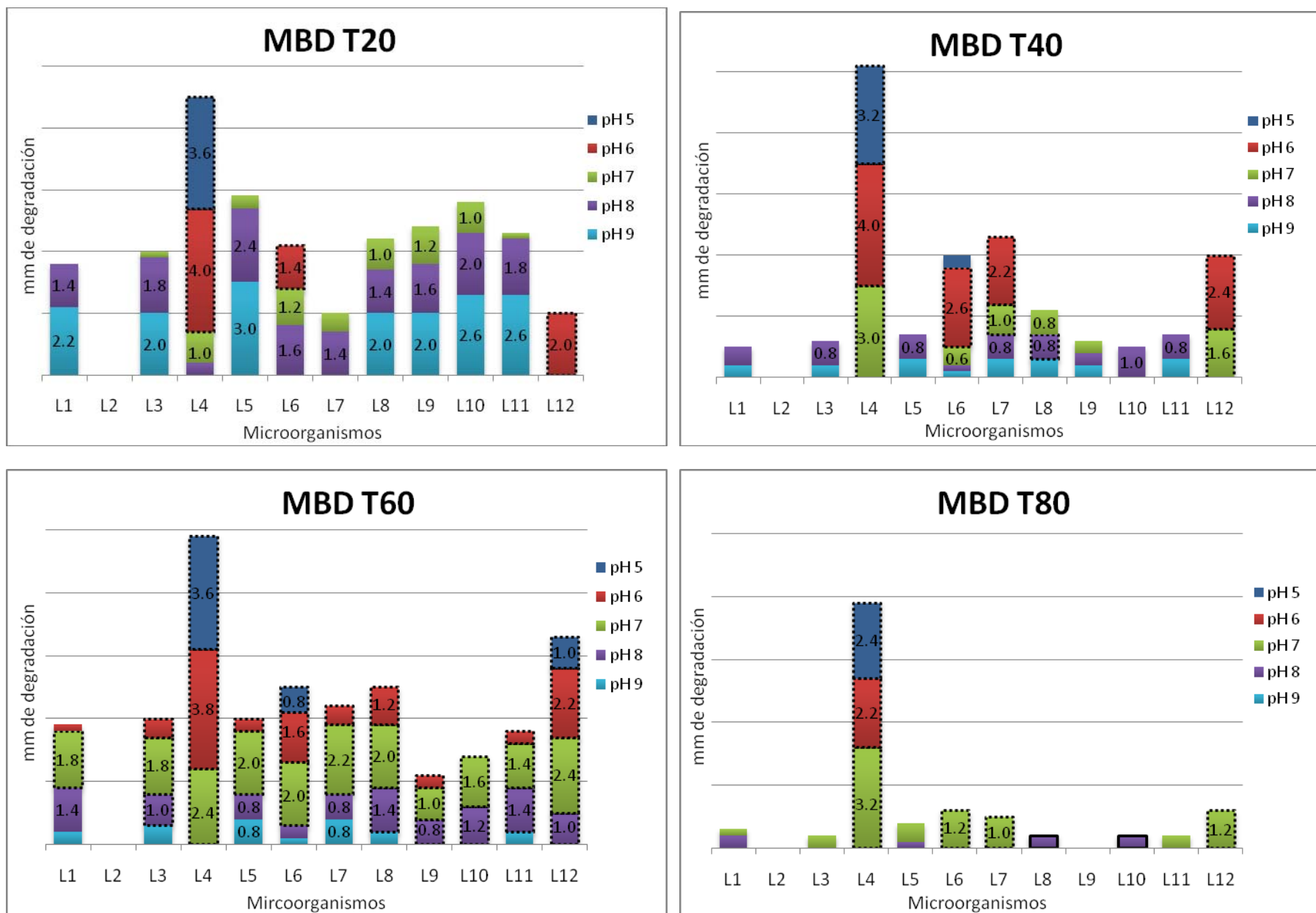


Figura 11. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

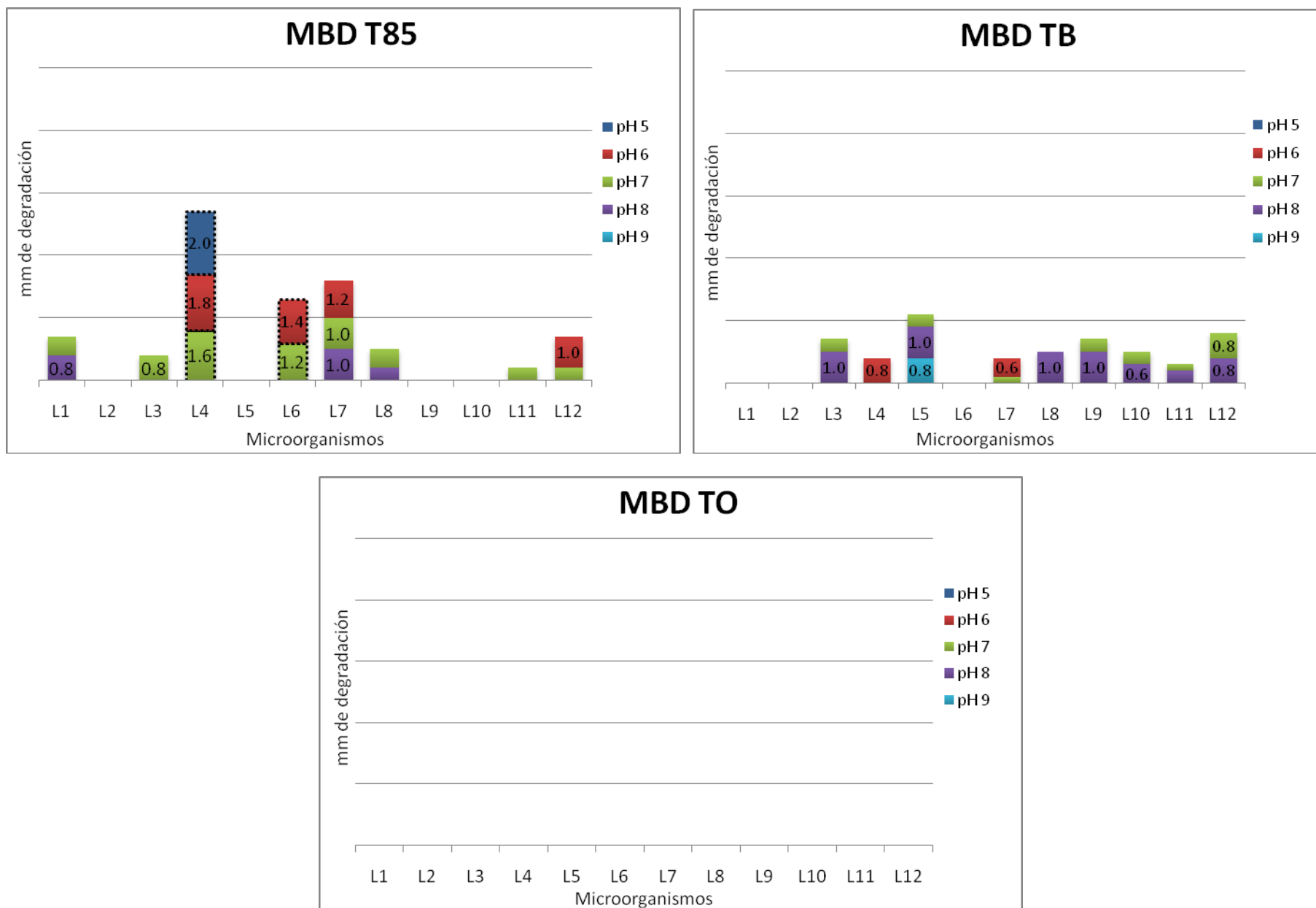


Figura 12. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MBD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

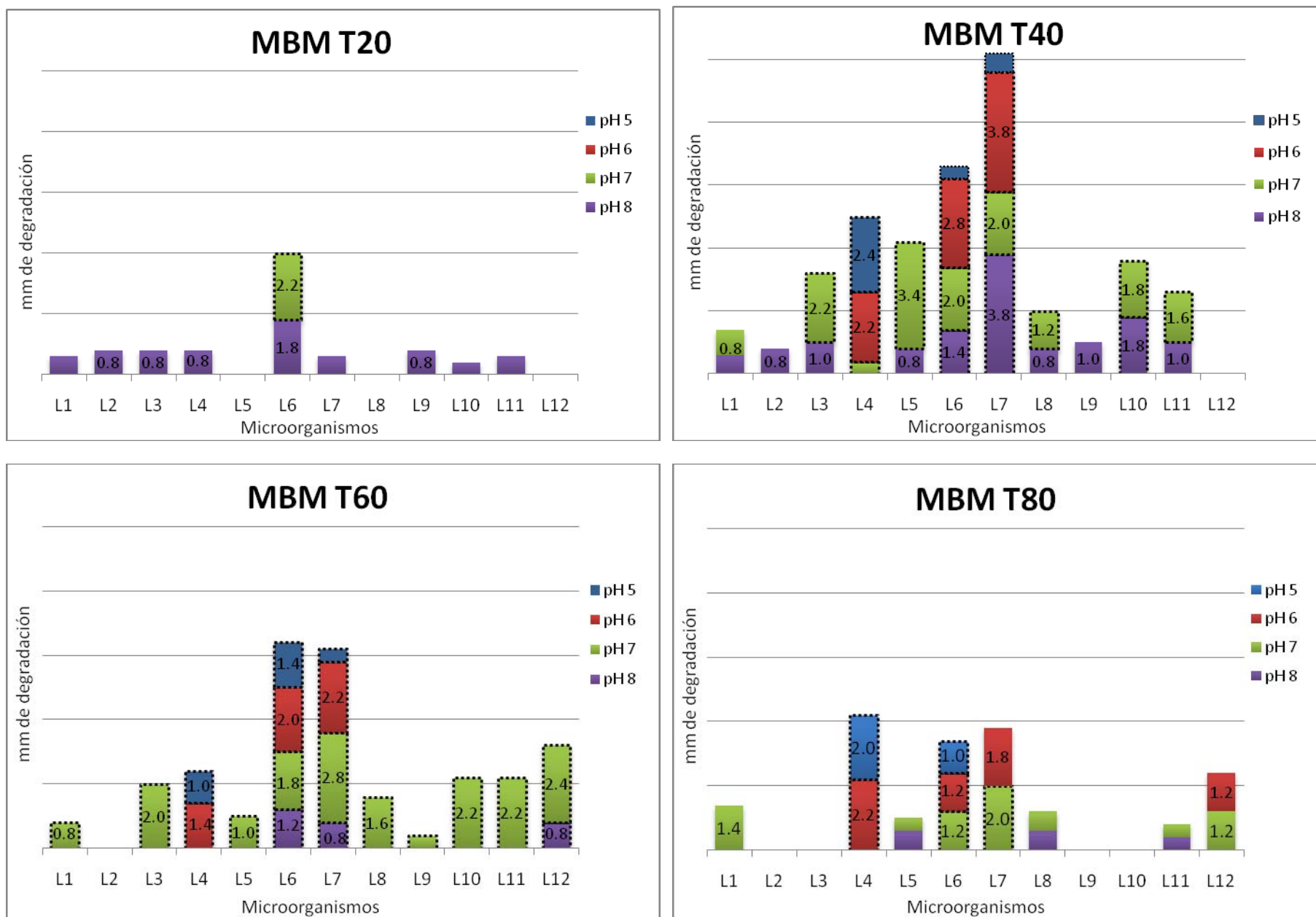


Figura 13. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBM incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

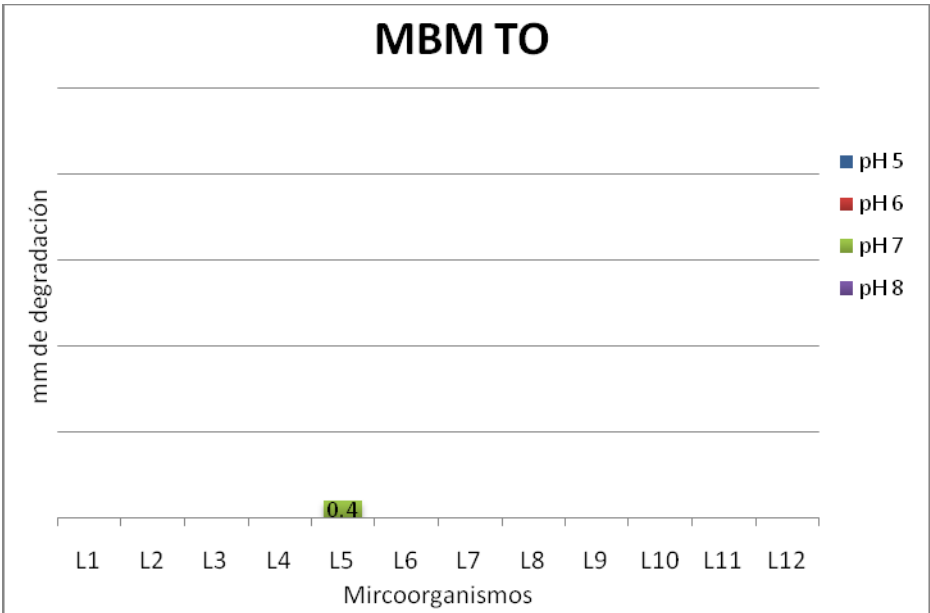
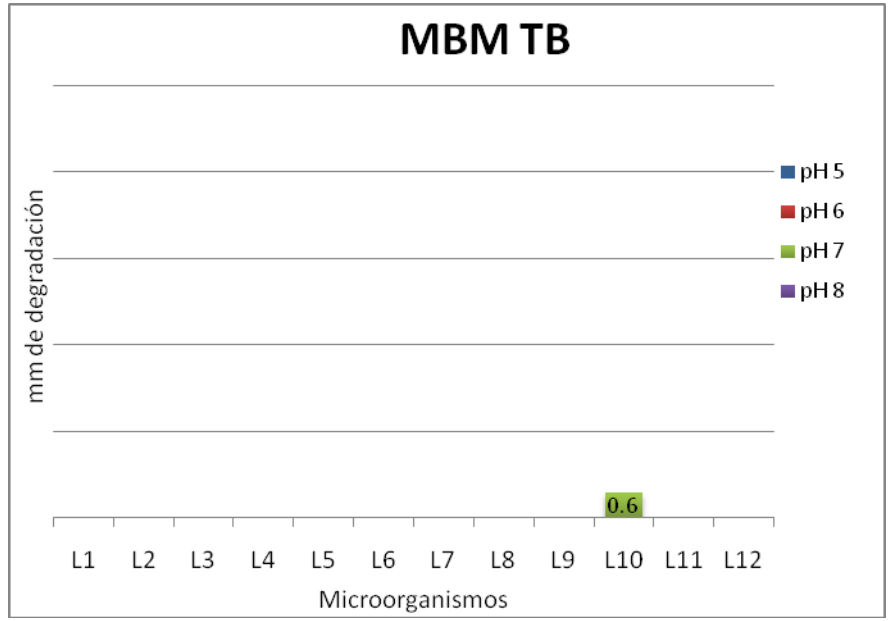
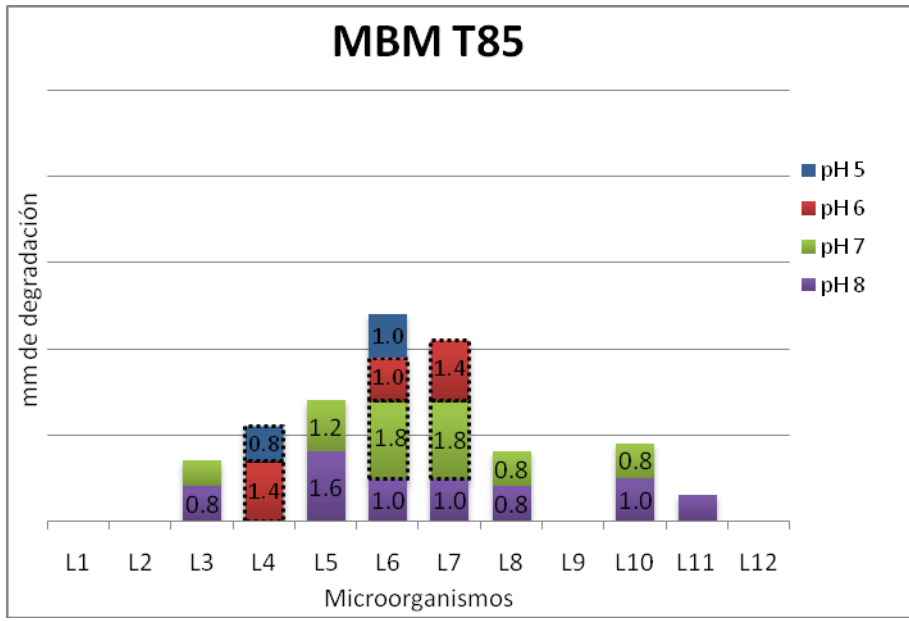


Figura 14. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB y TO) en MBM incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

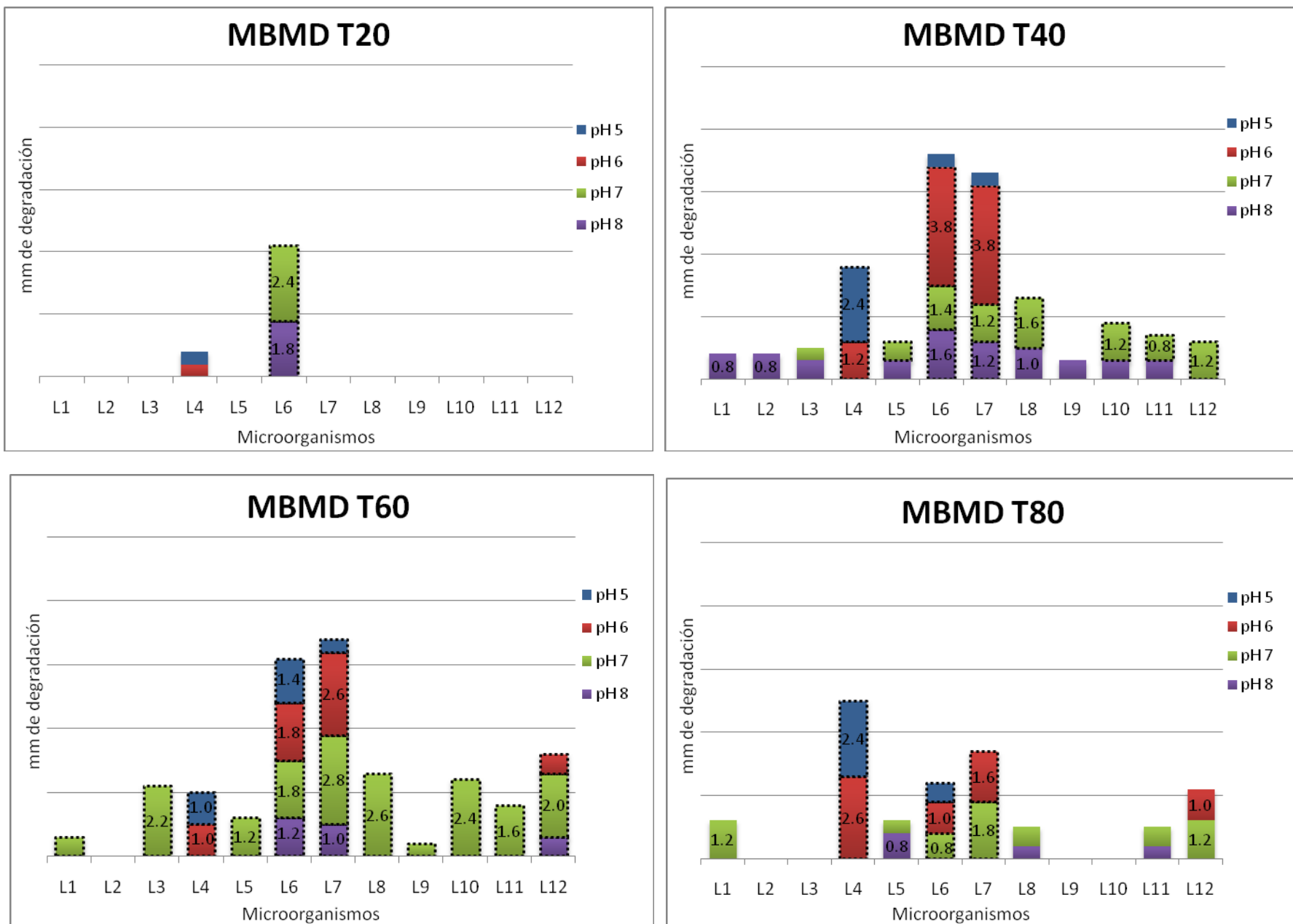


Figura 15. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T20, T40, T60 y T80) en MBMD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

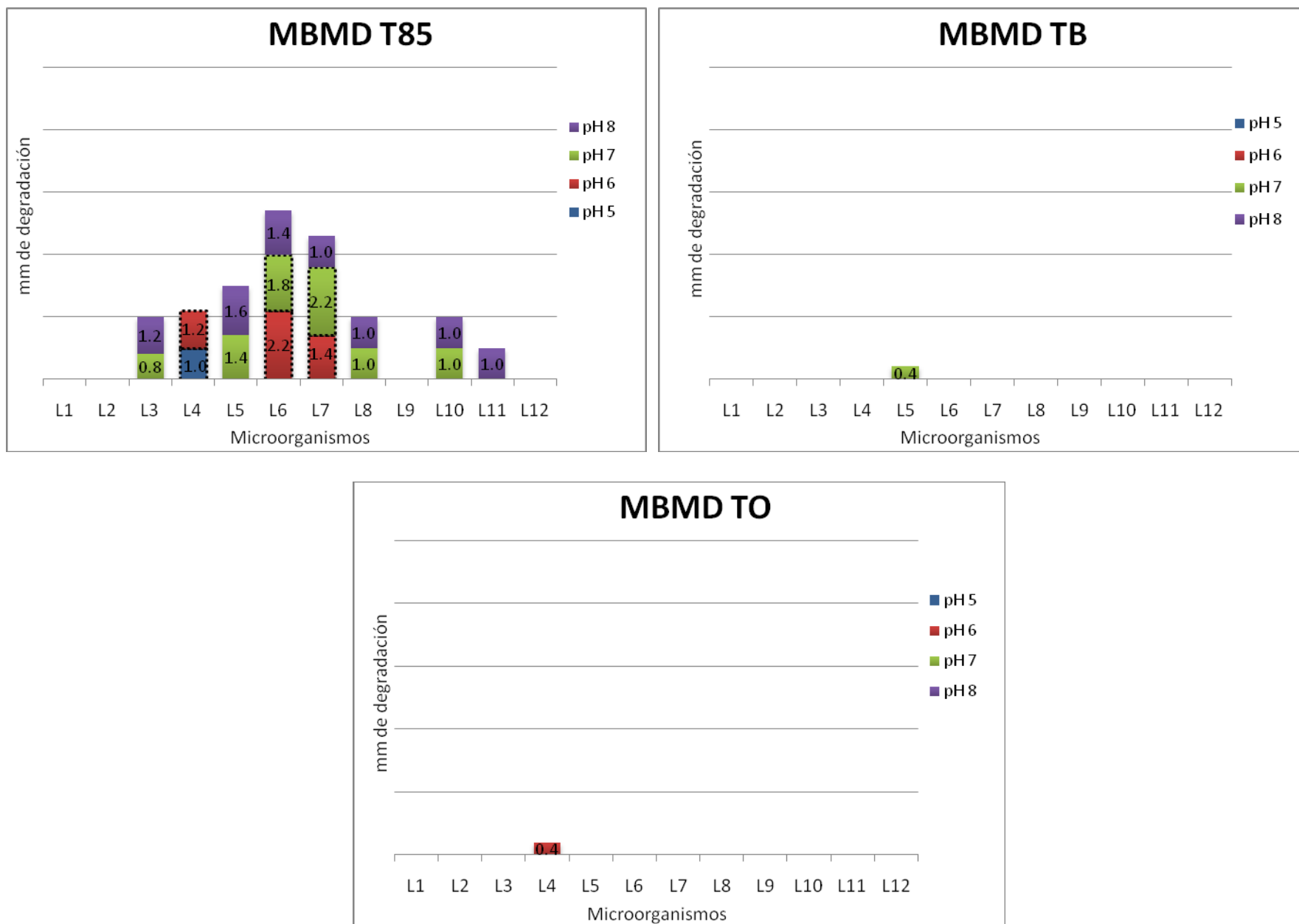


Figura 16. Diámetro de degradación de diferentes ácidos grasos (T85, TB, TO) en MBMD incubados a 30°C por 21 días. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

4.1.1 Representación visual de la degradación de ácidos grasos

En las siguientes figuras se muestra la actividad lipolítica observada de 4 cepas

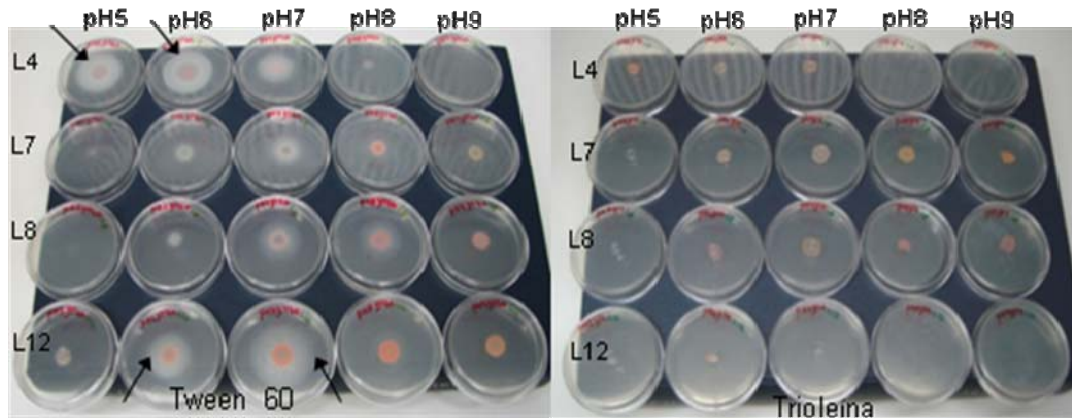


Figura 17. Actividad lipolítica de los aislados L4, L7, L8 y L12 a pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0. en Tween 60 MBD (izquierda) y Trioleina MBD (derecha) a los 21 días de incubación a 30 °C. Las flechas indican la zona opaca identificada como actividad lipolítica.

Actividad en Tween 40 y 60 por parte del aislado L7.

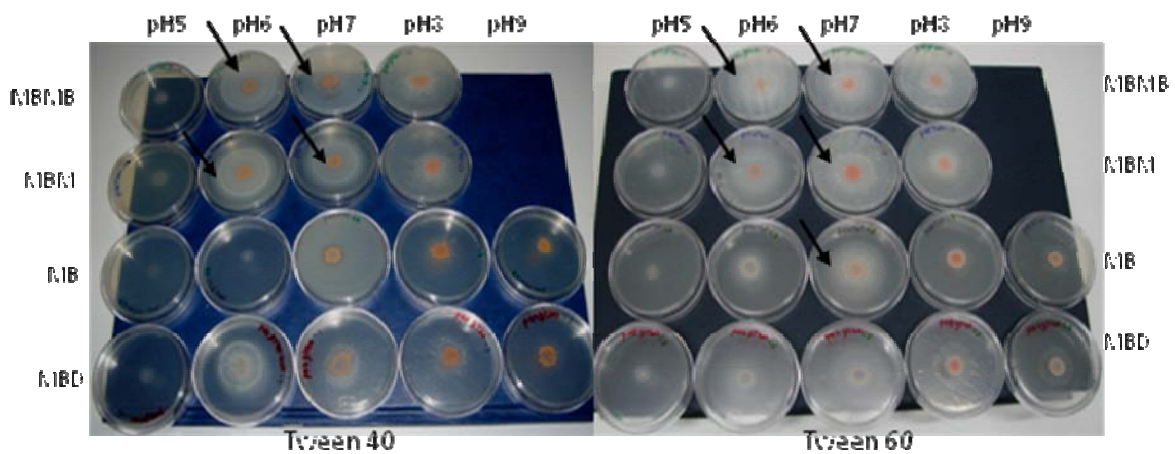


Figura 18. Actividad lipolítica del aislado L7 a pH 5.0, 6.0, 7.0 y 9.0 a a 30 °C a los 21 días de incubación en Tween 40 y 60 evaluados. Las flechas indican la zona opaca identificada como actividad lipolítica.

4.2 Selección de aislados, valores de pH(s) y ácidos grasos con mayor actividad lipolítica

De acuerdo a la actividad lipolítica observada en 9 de los doce aislados estudiados, 3 fuentes de ácidos grasos y 3 valores de pH se seleccionaron para la serie de experimentos para la segunda parte del estudio.

- Microorganismos seleccionados: L3, L4, L5, L6, L7, L8, L10, L11 y L12
- Fuentes de ácidos grasos utilizados: Tween 20, Tween 40 y Tween 60
- Valores de pH seleccionados: 5.0, 6.0 y 7.0; 6.0, 7.0 y 8.0
- Para cada microorganismo:
 - L3: pH6, pH7 y pH8
 - L4: pH5, pH6 y pH7
 - L5: pH6, pH7 y pH8
 - L6: pH6, pH7 y pH8
 - L7: pH6, pH7 y pH8
 - L8: pH6, pH7 y pH8
 - L10: pH6, pH7 y pH8
 - L11: pH6, pH7 y pH8
 - L12: pH5, pH6 y pH7

4.3 Resultados experimento 2: Degradación de los ácidos grasos a diferentes temperaturas

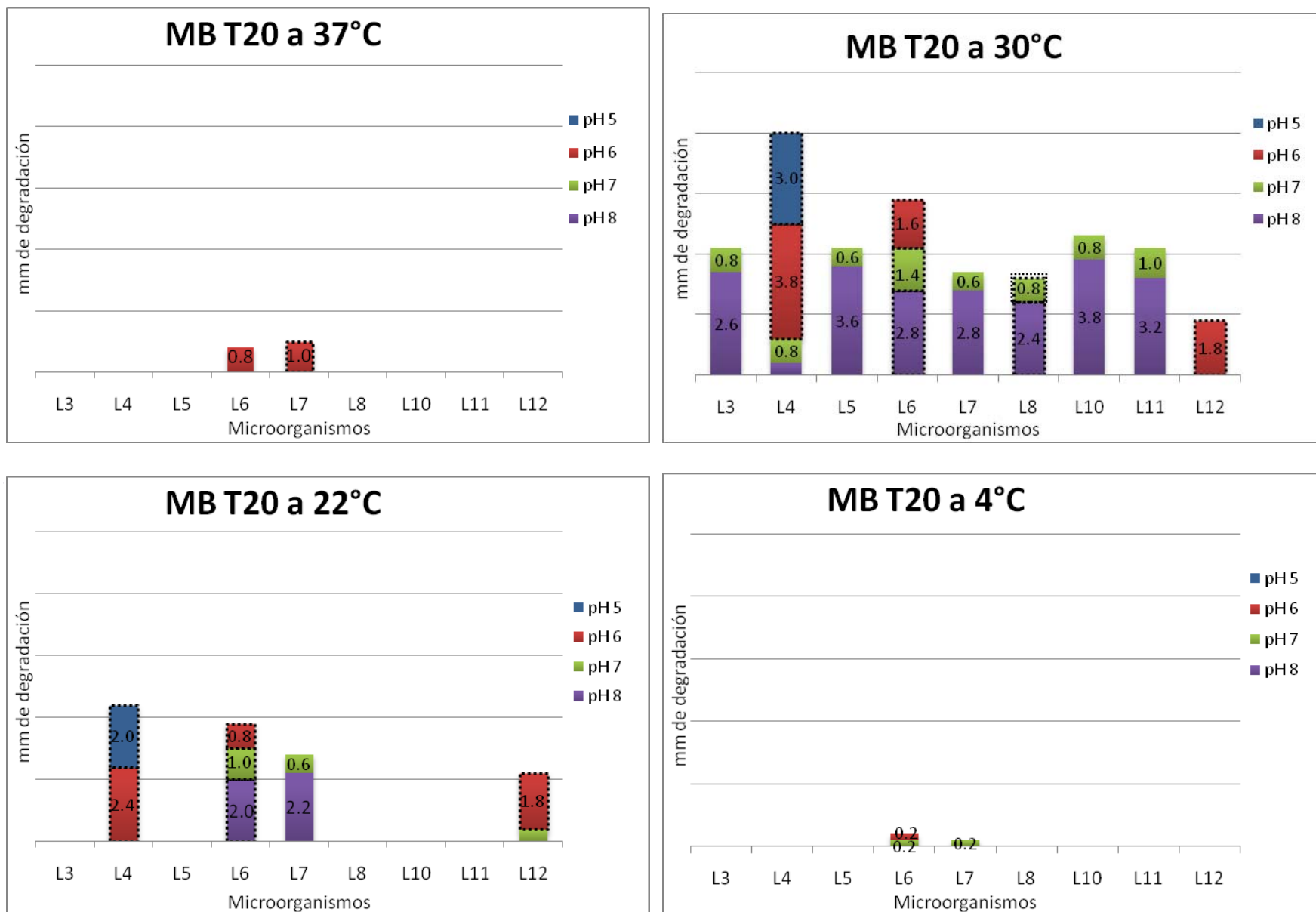


Figura 19. Diámetro de degradación del Tween 20 en MB por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

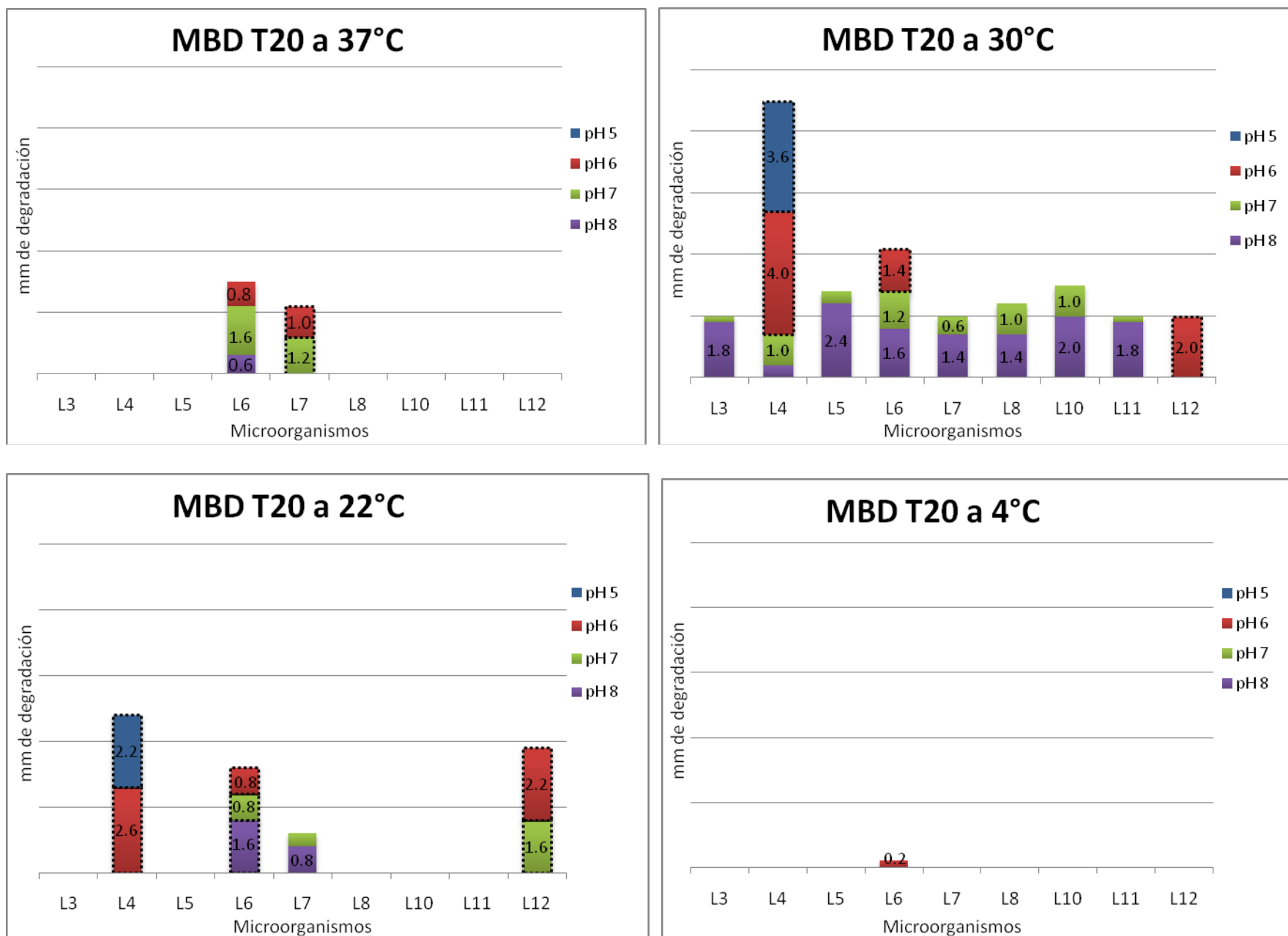


Figura 20. Diámetro de degradación del Tween 20 en MBD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

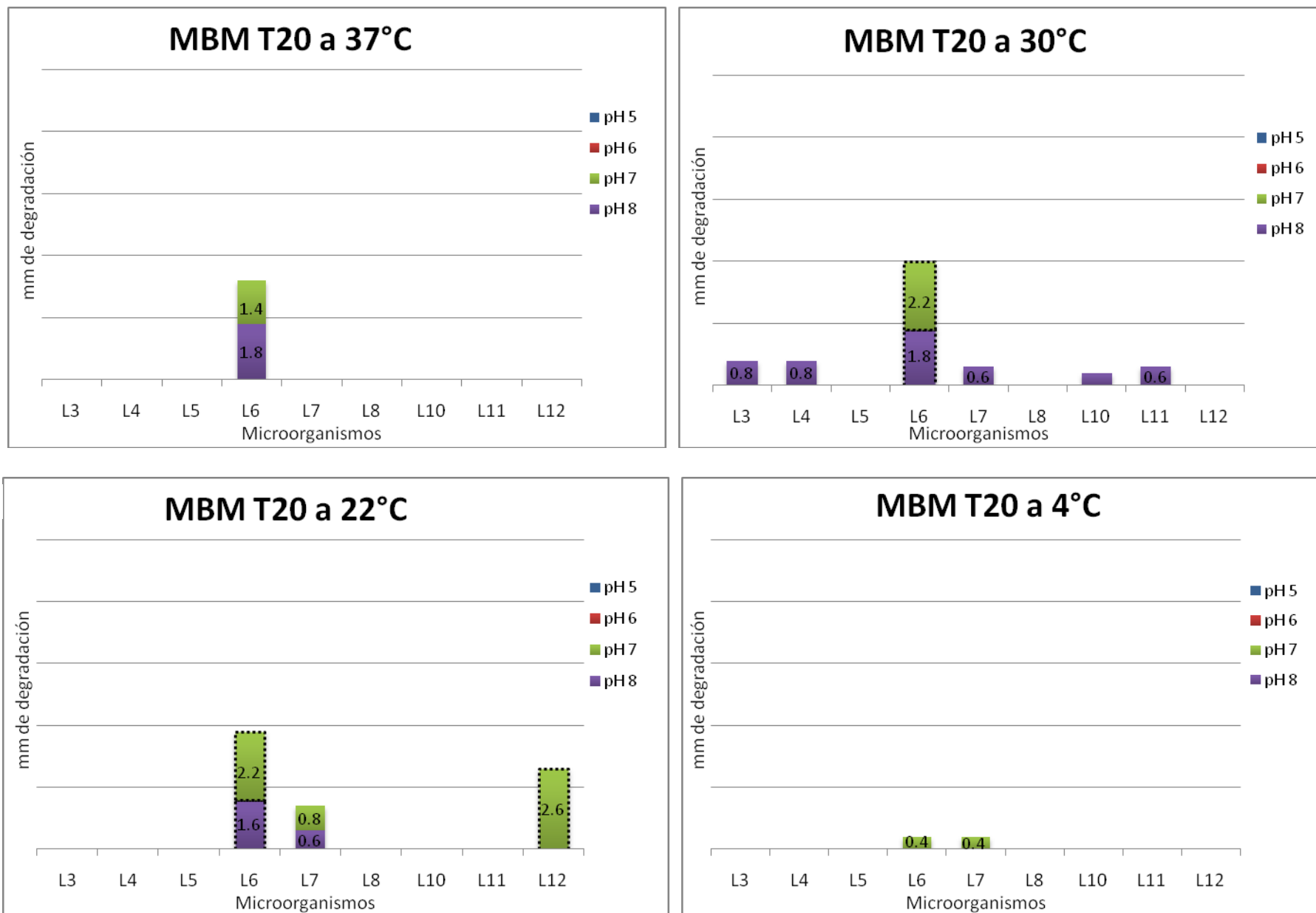


Figura 21. Diámetro de degradación del Tween 20 en MBM por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

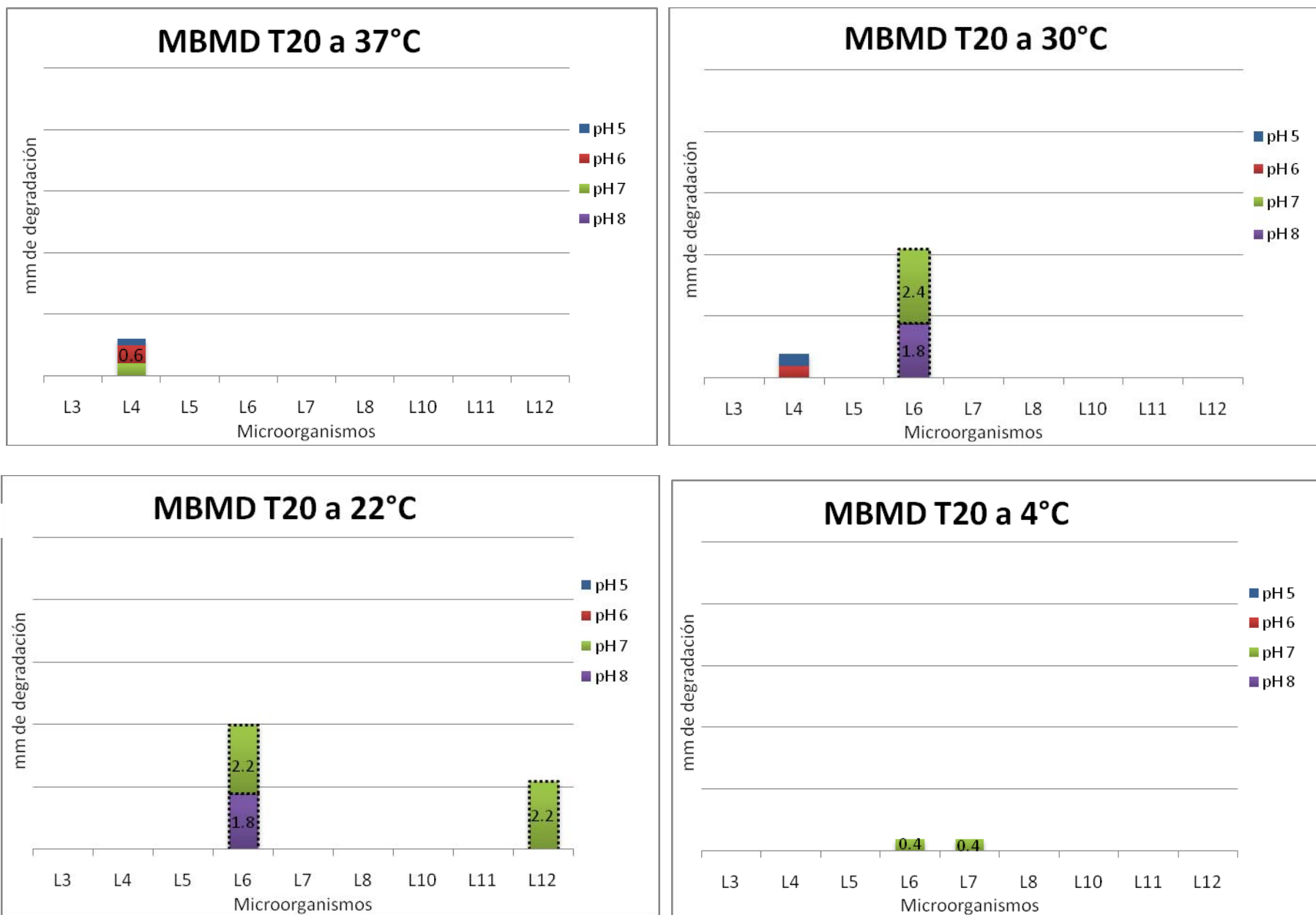


Figura 22. Diámetro de degradación del Tween 20 en MBMD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

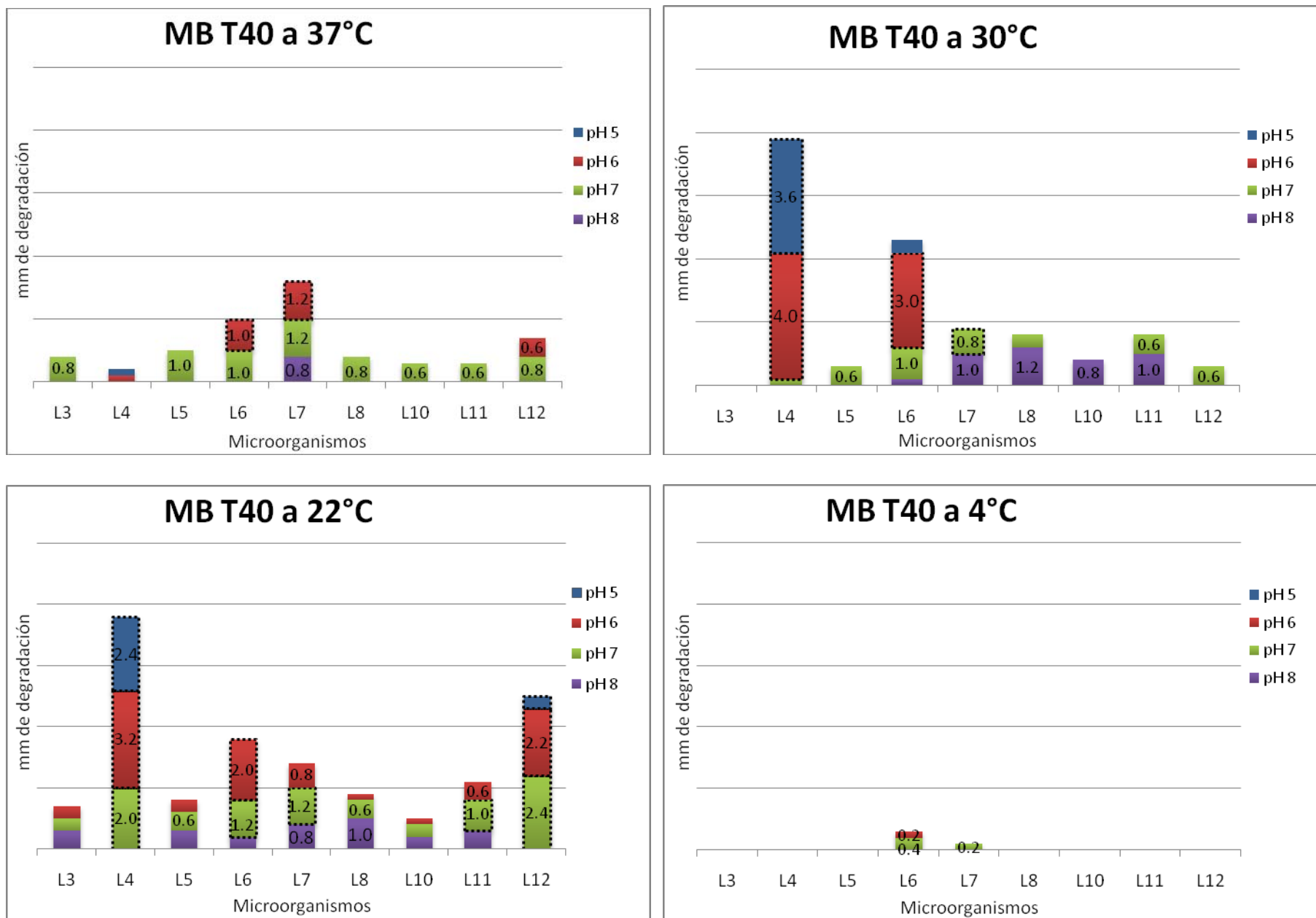


Figura 23. Diámetro de degradación del Tween 40 en MB por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

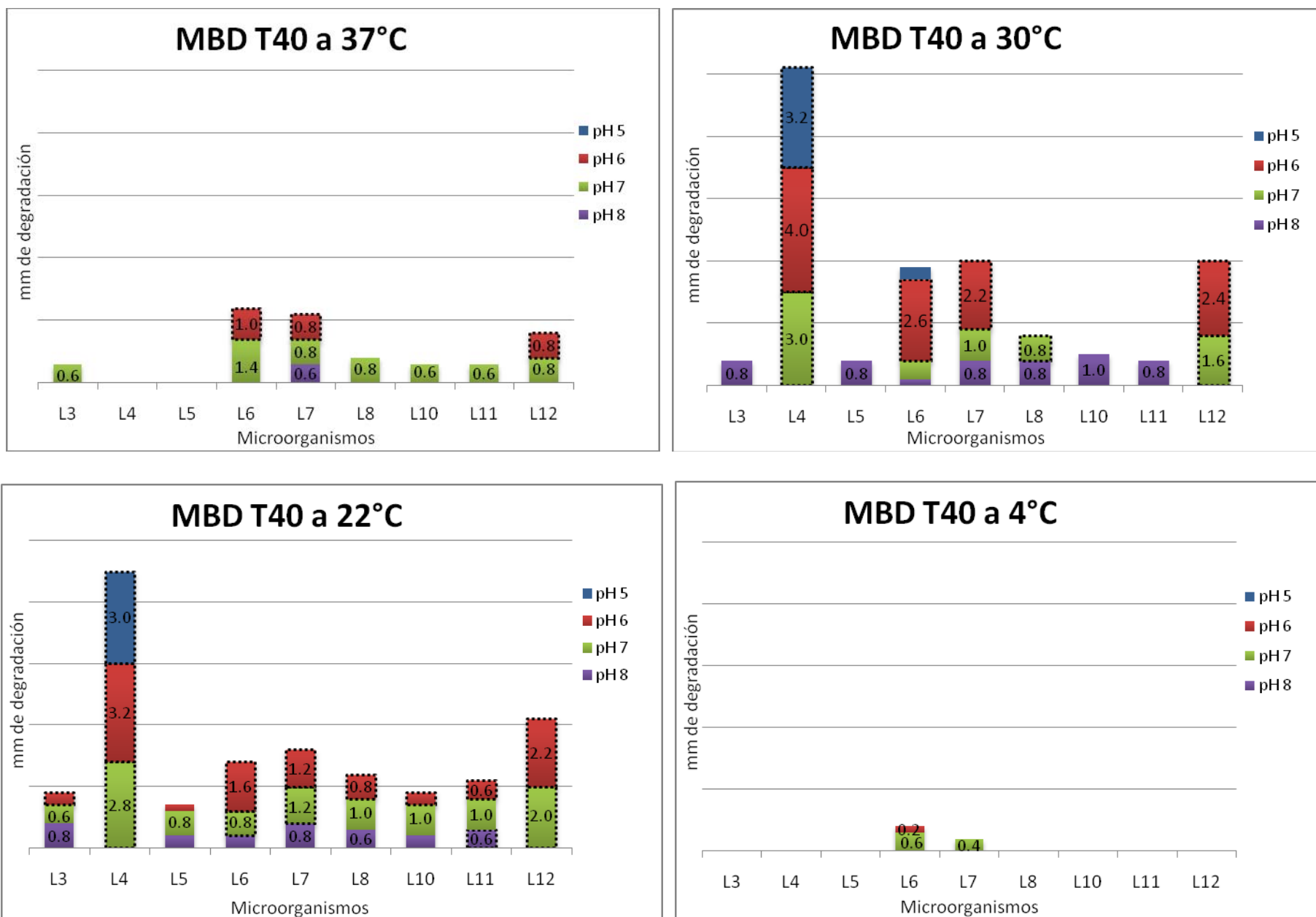


Figura 24. Diámetro de degradación del Tween 40 en MBD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

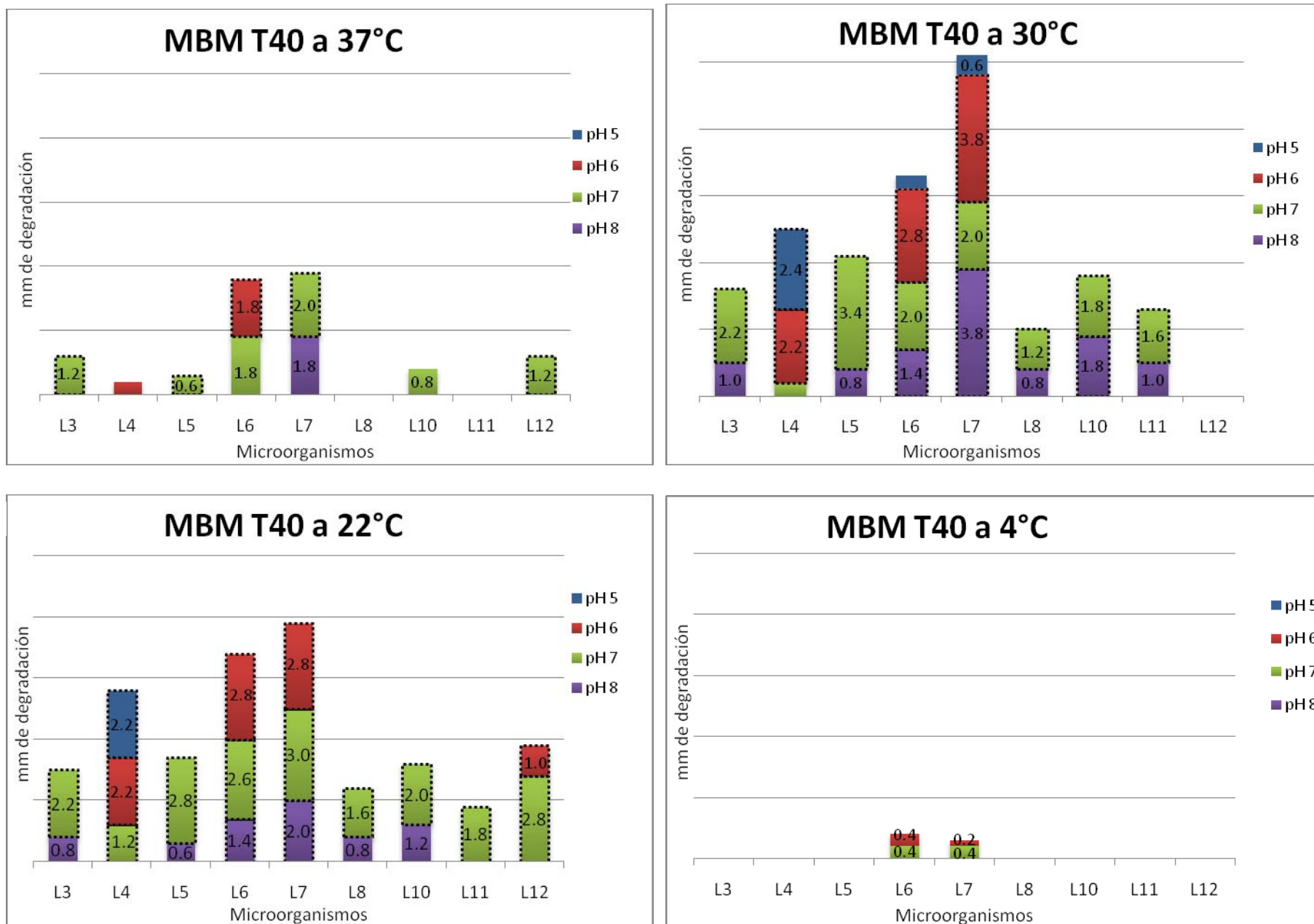


Figura 25. Diámetro de degradación del Tween 40 en MBM por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

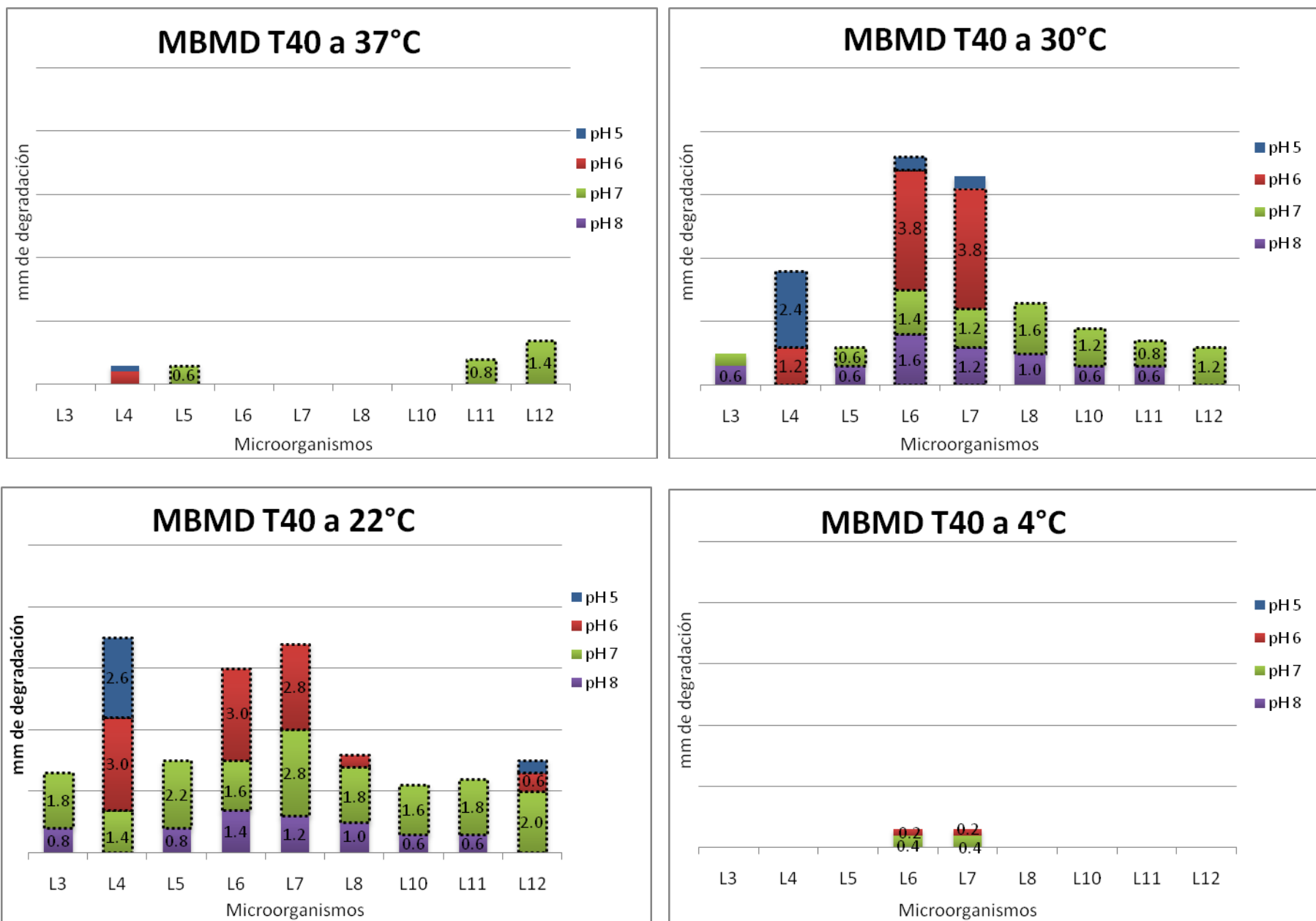


Figura 26. Diámetro de degradación del Tween 40 en MBMD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

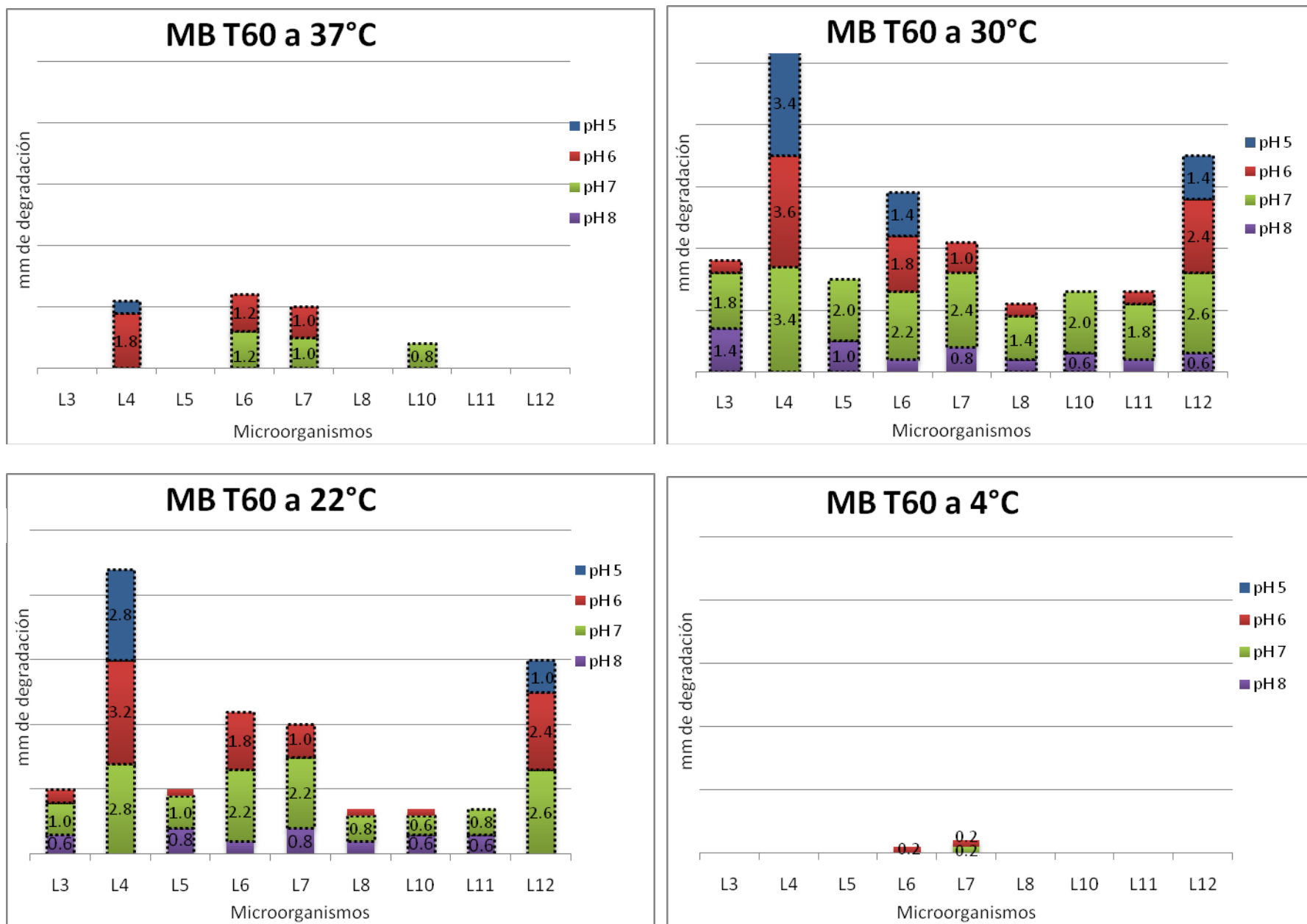


Figura 27. Diámetro de degradación del Tween 60 en MB por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

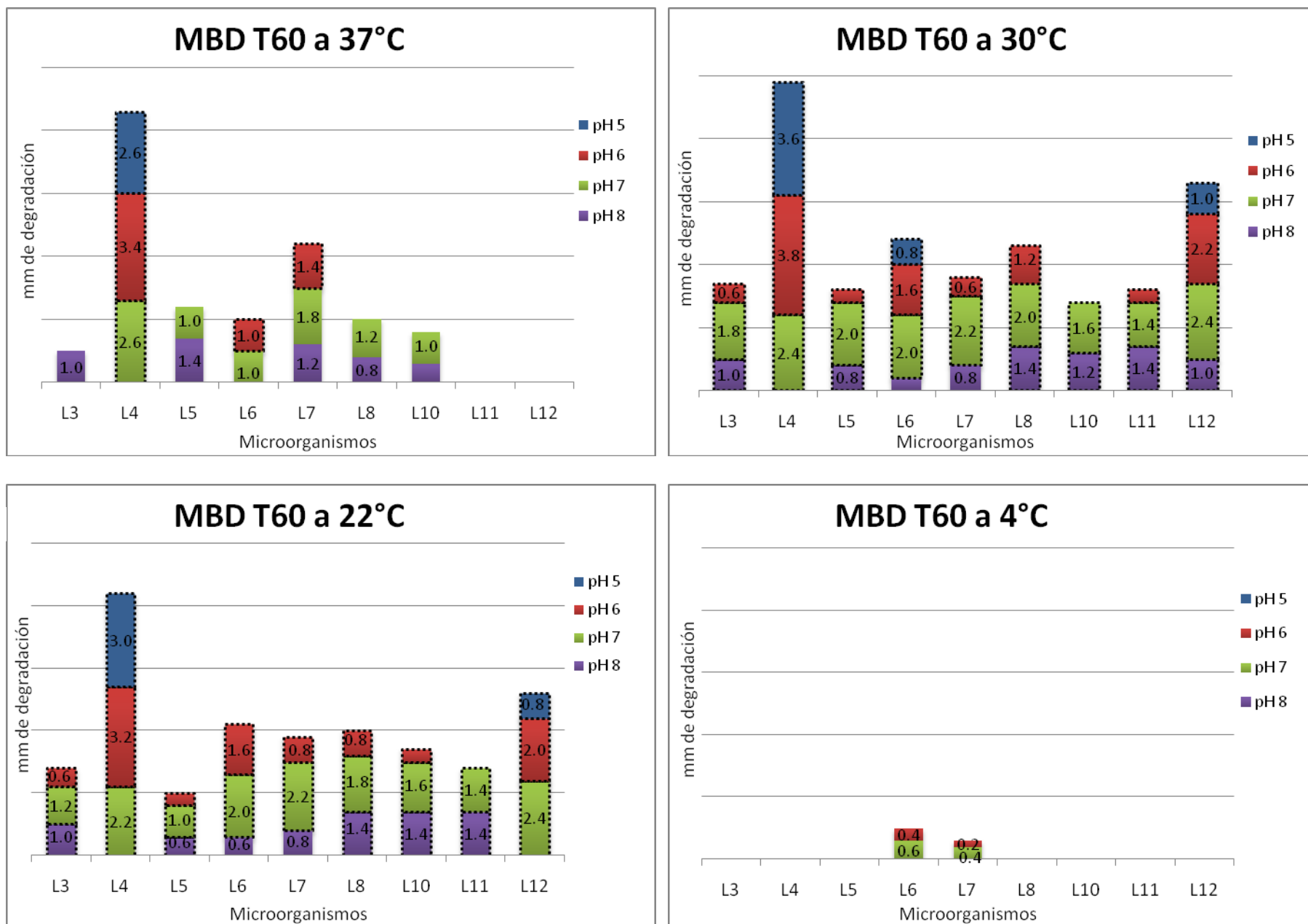


Figura 28. Diámetro de degradación del Tween 60 en MBD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

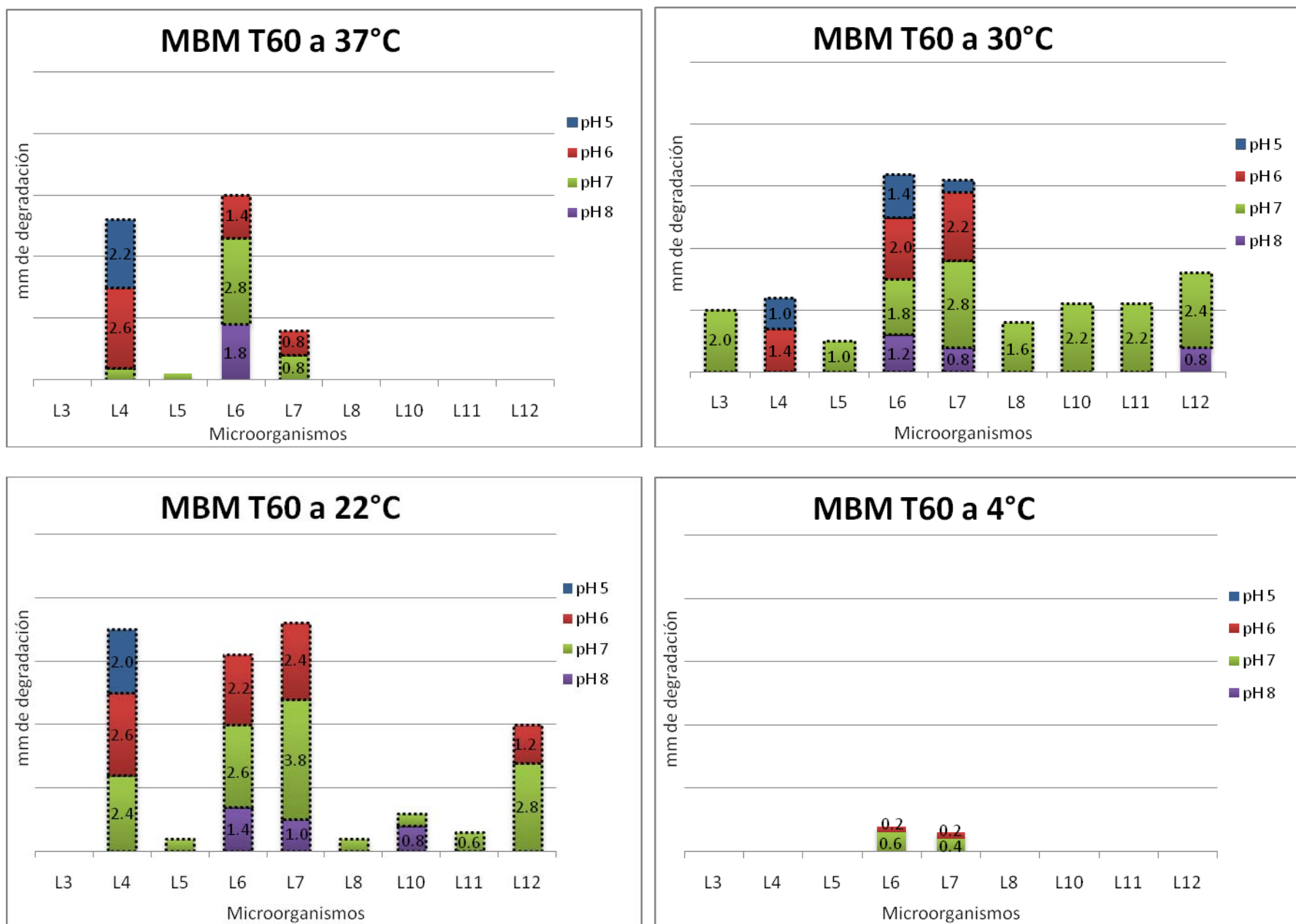


Figura 29. Diámetro de degradación del Tween 60 en MBM por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

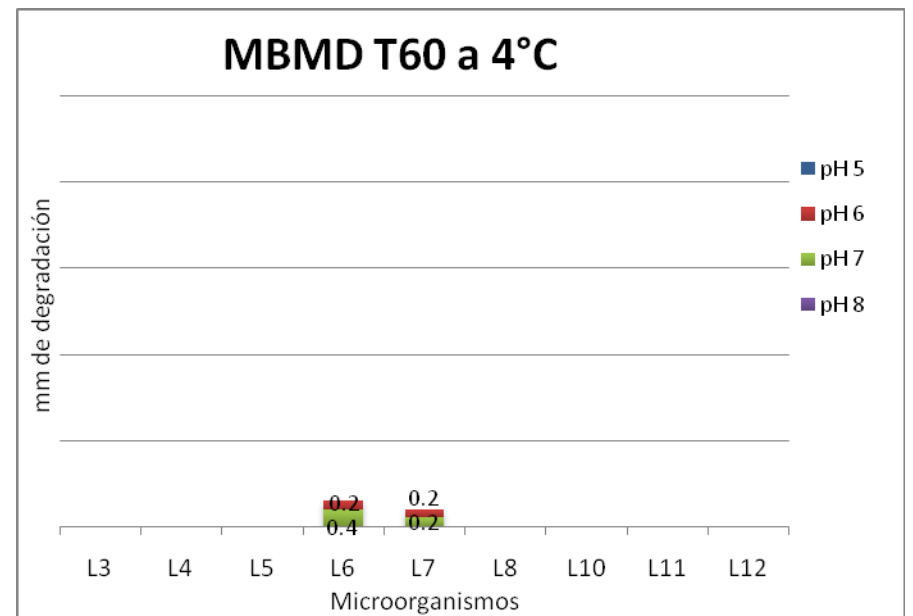
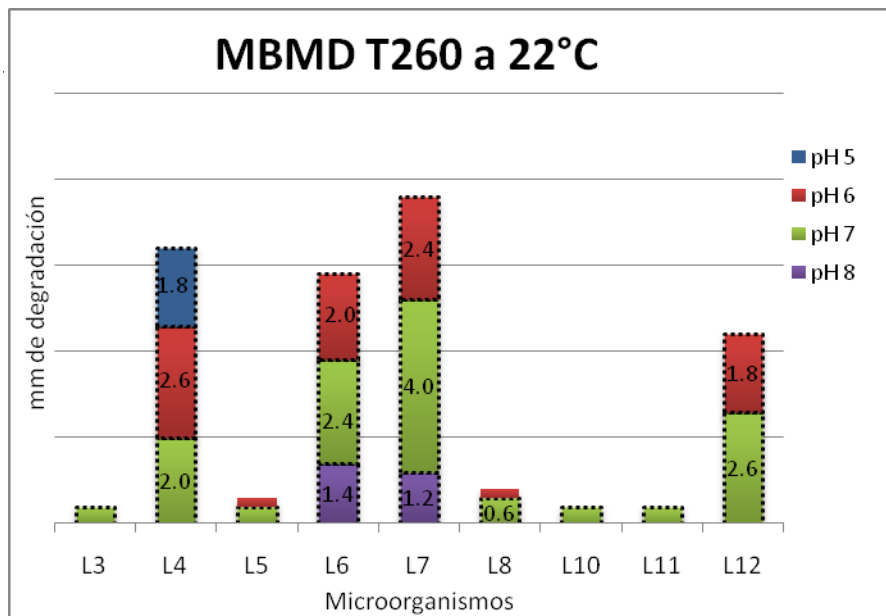
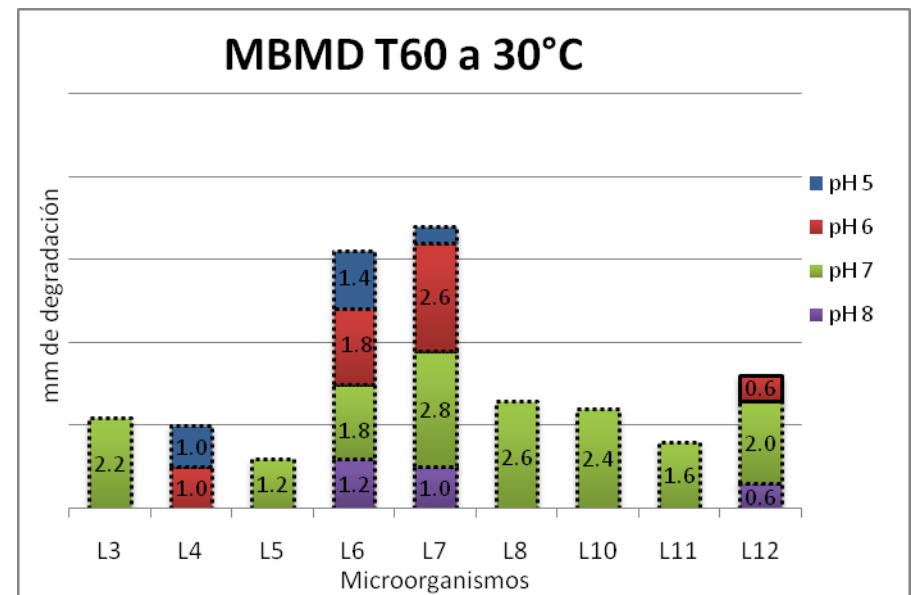
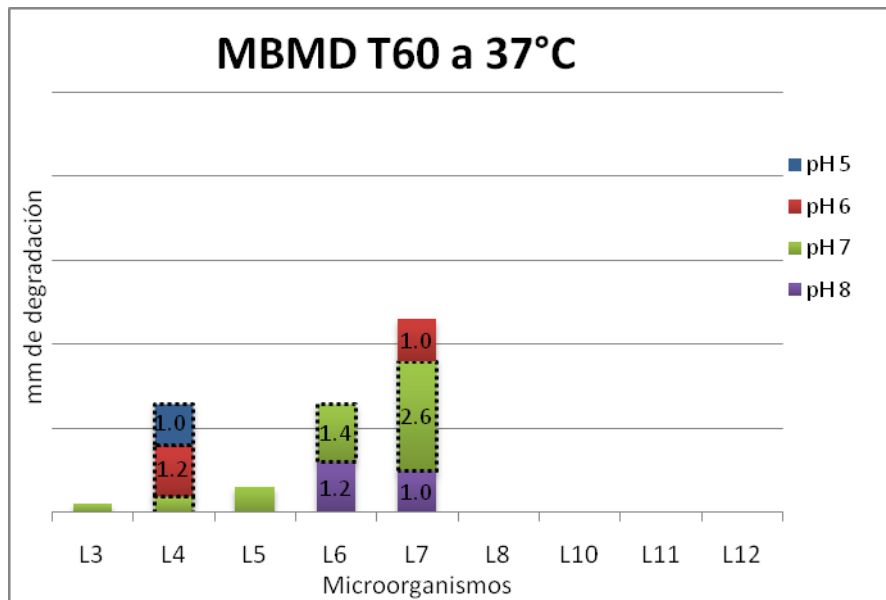


Figura 30. Diámetro de degradación del Tween 60 en MBMD por 21 días a diferentes temperaturas. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

4.4 Resultados experimento 3. Degradación de los ácidos grasos a diferentes concentraciones de sal

62

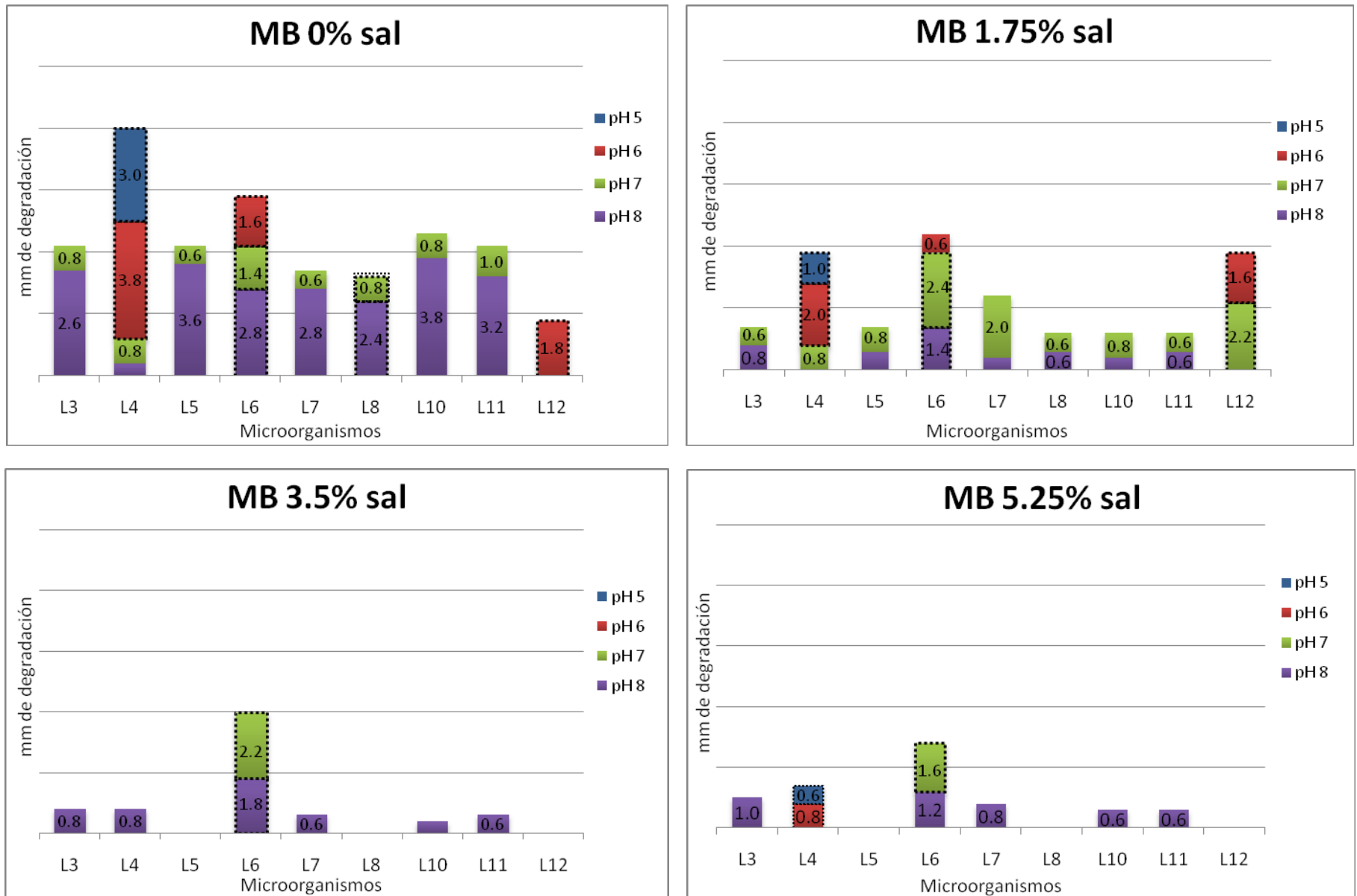


Figura 32. Diámetro de degradación del Tween 20 en MB a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

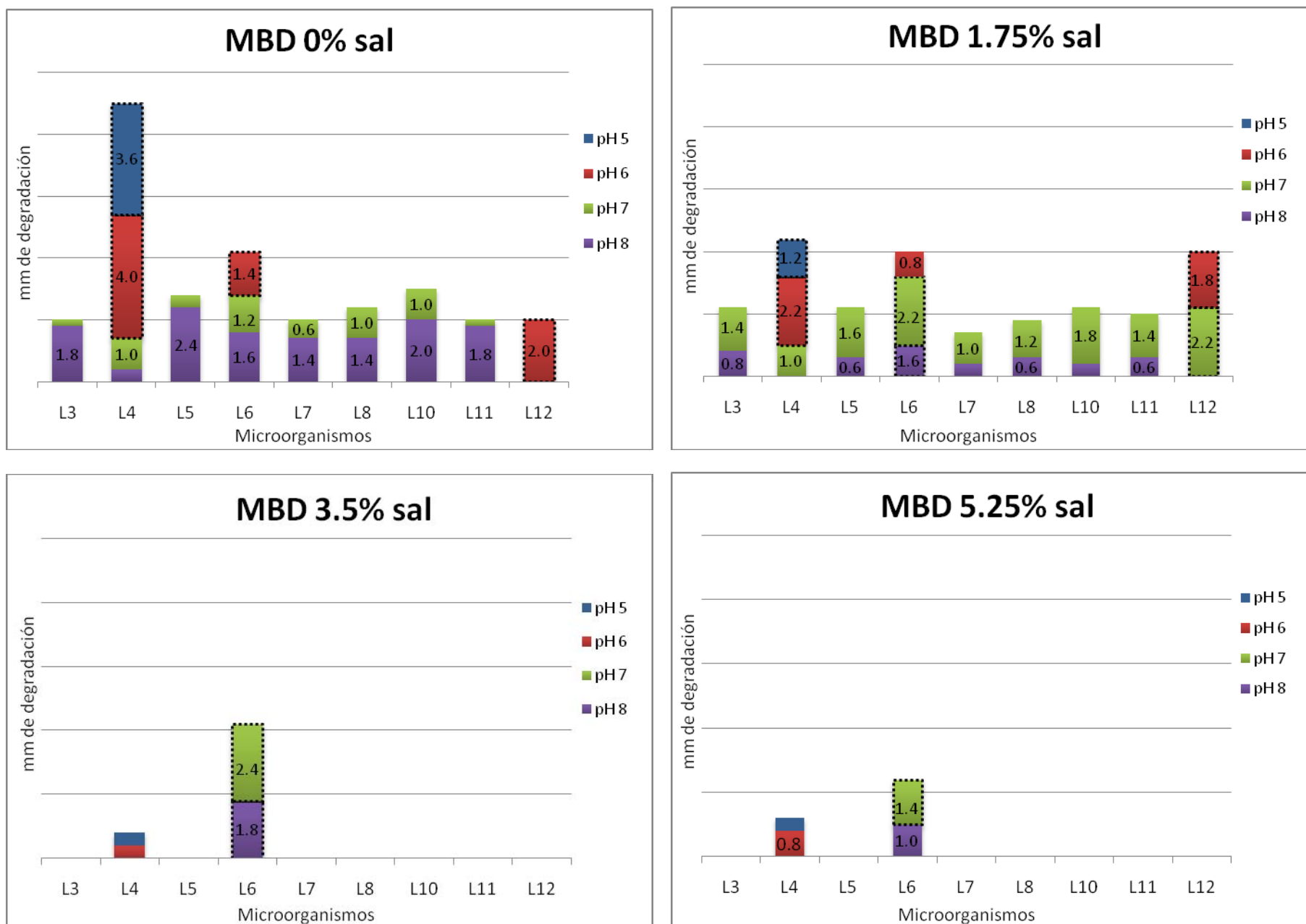


Figura 33. Diámetro de degradación del Tween 20 en MBD a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

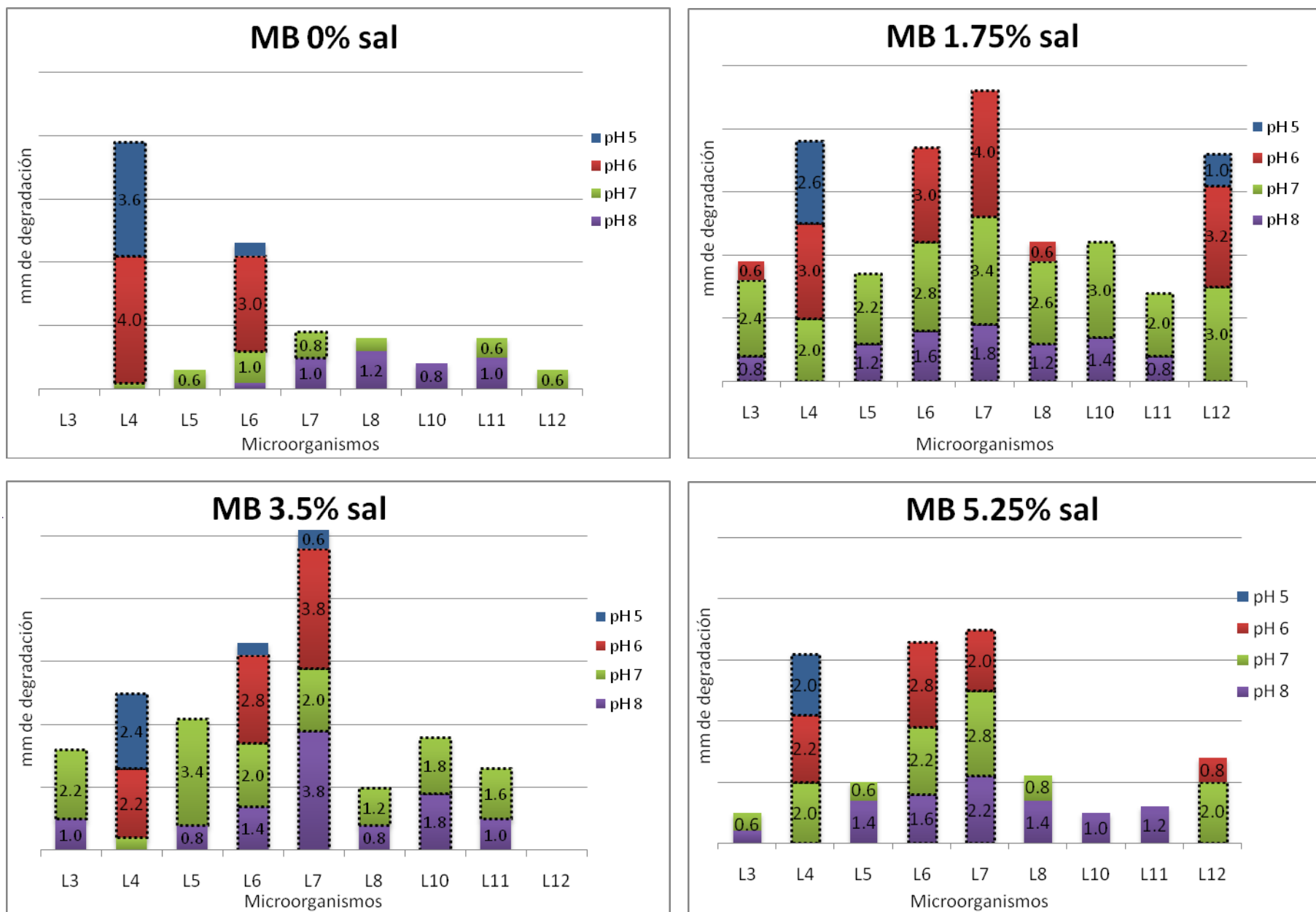


Figura 34. Diámetro de degradación del Tween 40 en MB a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

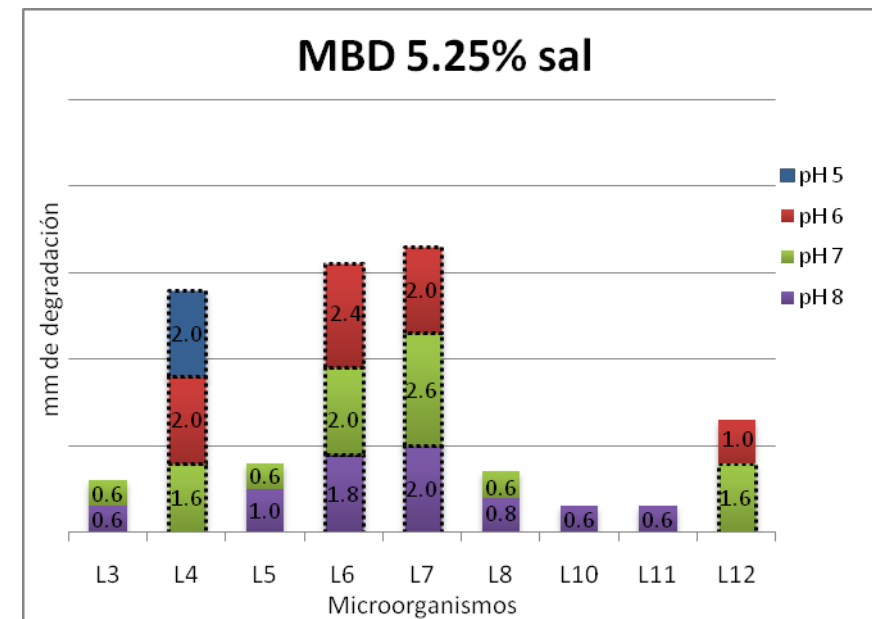
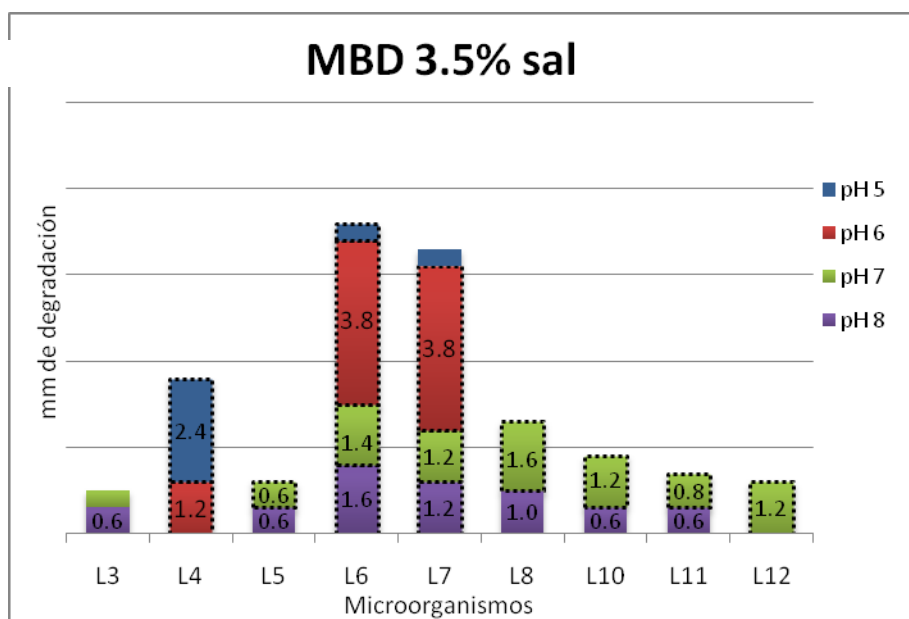
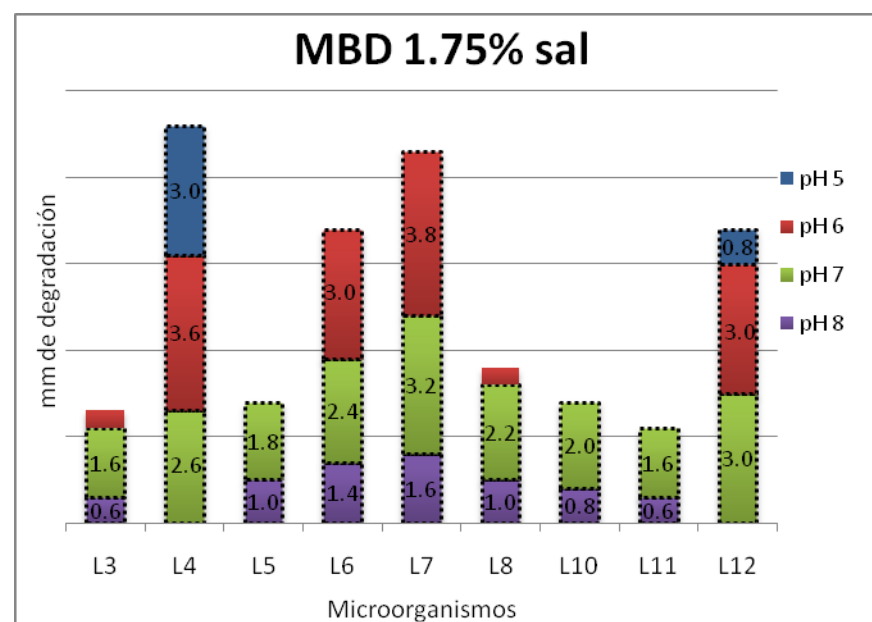
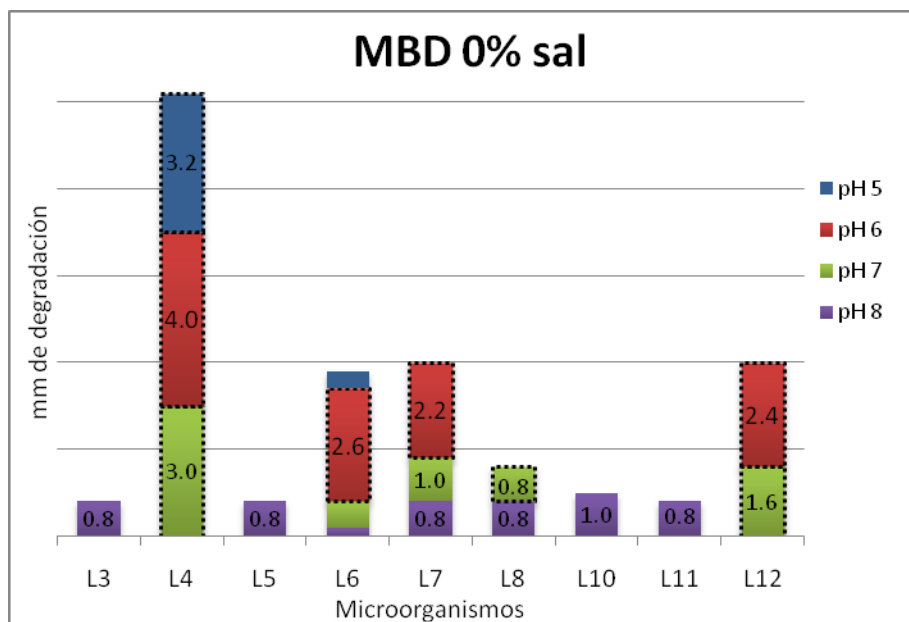


Figura 35. Diámetro de degradación del Tween 40 en MBD a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

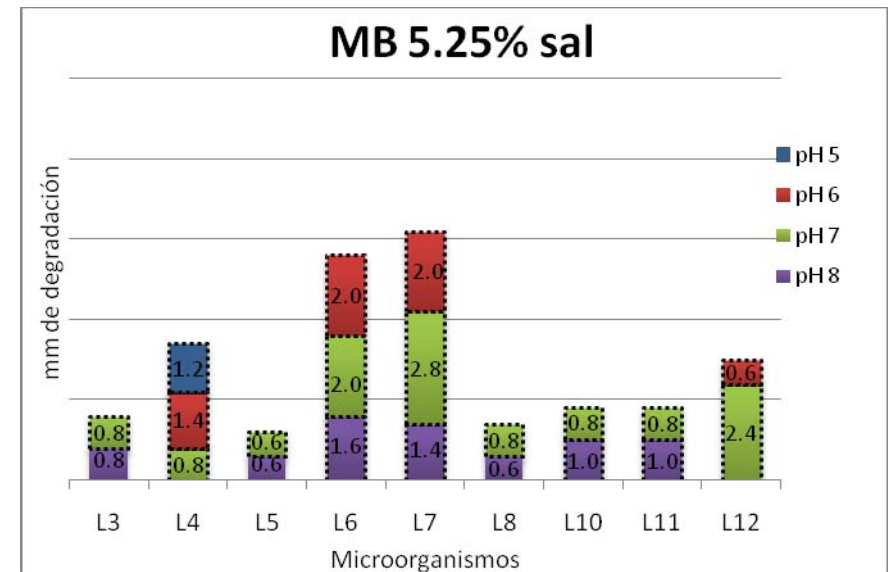
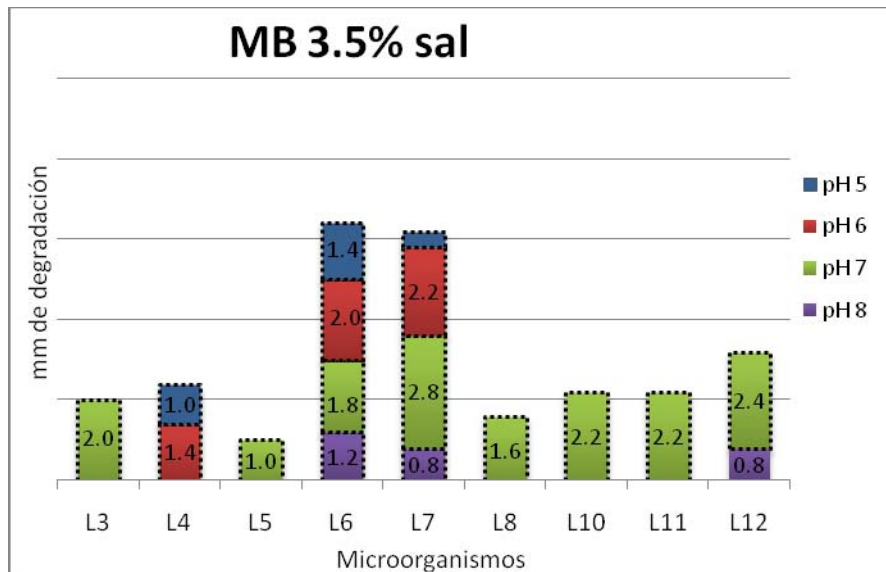
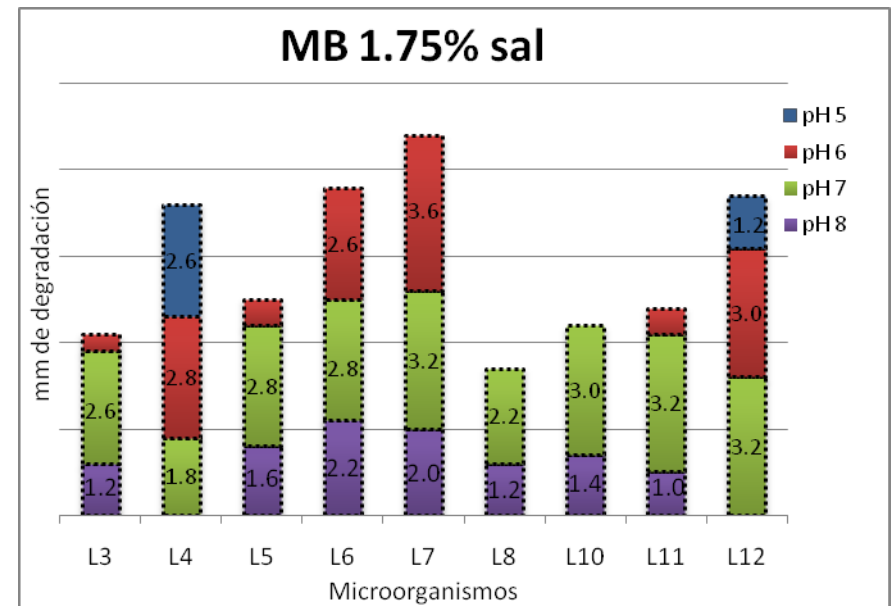
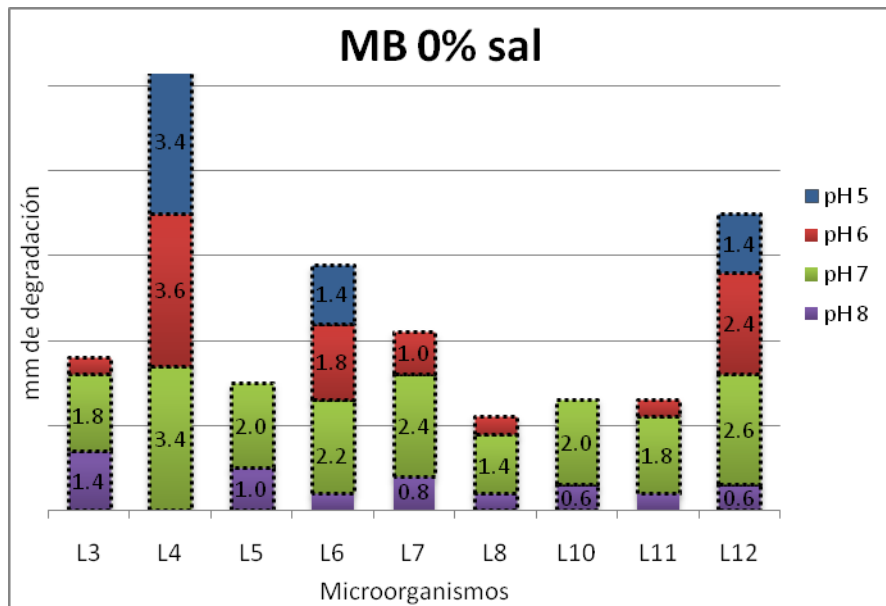


Figura 36. Diámetro de degradación del Tween 60 en MB a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

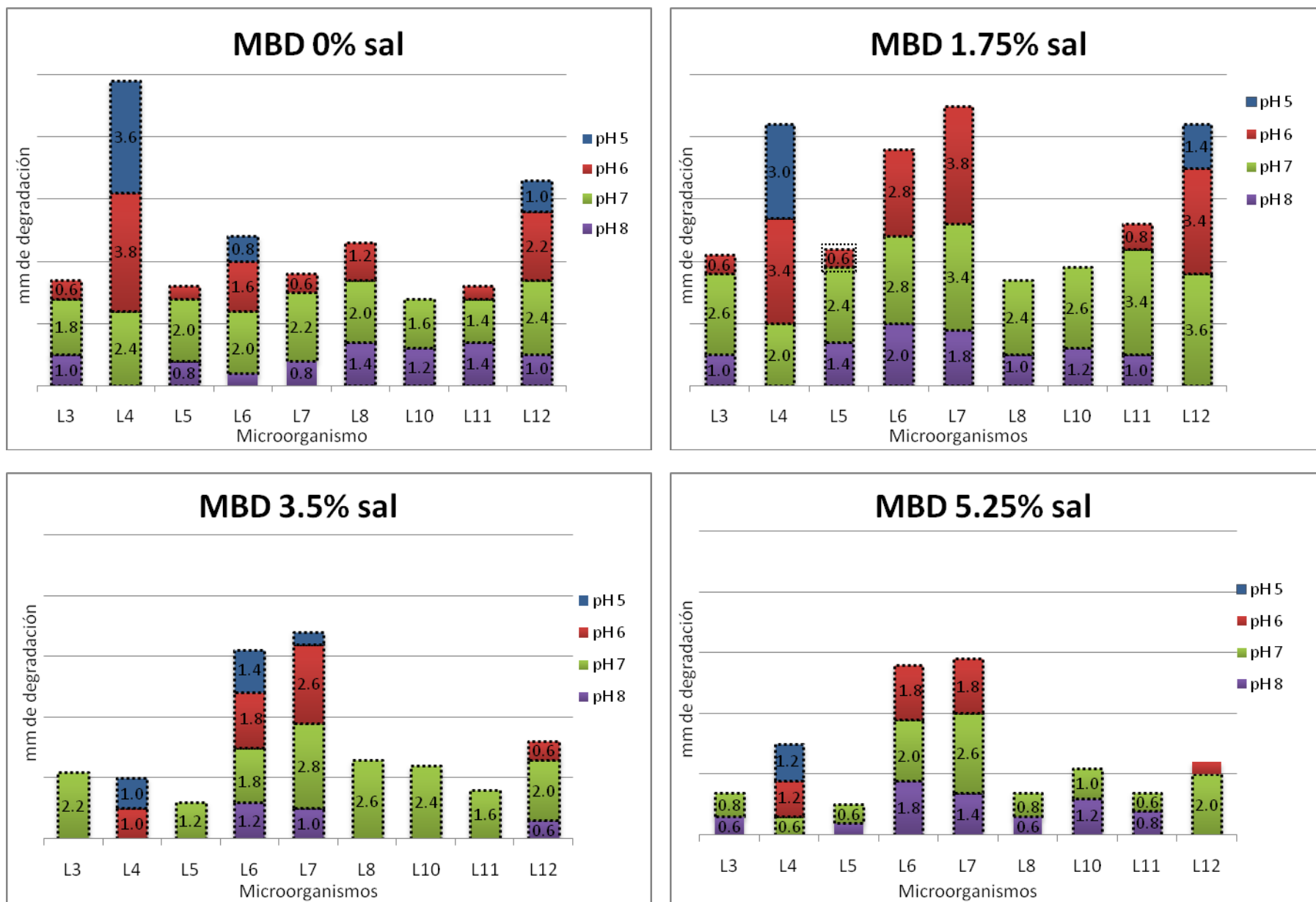


Figura 37. Diámetro de degradación del Tween 60 en MBD a 30°C por 21 días a diferentes concentraciones de sal. Los aislados productores de halo blanco se indican con la línea punteada.

4.4.1 Representación visual de la degradación a diferentes concentraciones de sal

En las siguientes figuras se muestra la actividad lipolítica observada por el aislado L12 en Tween 60 a diferentes concentraciones de sal marina.

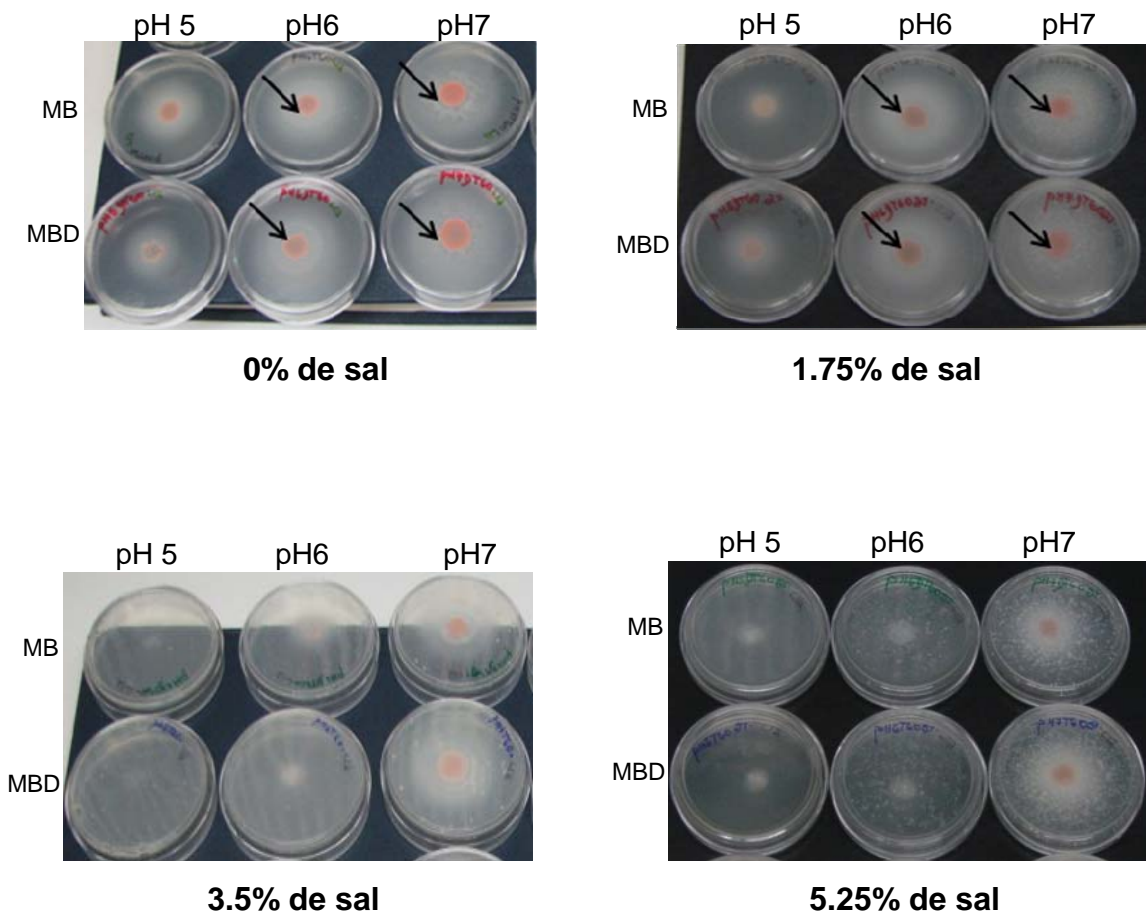


Figura 38. Actividad lipolítica del aislado L12 a pH(s) 5.0, 6.0 y 7.0 incubado a 30 °C por 21 días. Las flechas indican la zona opaca identificada como actividad lipolítica.

4. 5 Condiciones óptimas para los diferentes aislados estudiados

En las siguientes tablas se resumen aquellos resultados de la segunda parte del estudio. Únicamente se muestran las condiciones óptimas de algunos de los microorganismos estudiados por ser consideradas las más importantes.

Tabla 5. Condiciones óptimas para la mayor actividad lipolítica de los aislados L3, L5 y L10 en Tween 20 a los tres diferentes factores abióticos estudiados.

Cepa	Ácido graso	pH	Medio	Temperatura (°C)	Concentración de sal (%)	Diámetro de degradación (mm)
L3	Tween 20	8	MB	30	0%	34
L5						36
L10						38

Tabla 6. Condiciones óptimas para la mayor actividad lipolítica de los aislados L4, L6 y L7 en Tween 40 a los tres diferentes factores abióticos estudiados.

Cepa	Ácido graso	pH	Medio	Temperatura (°C)	Concentración de sal (%)	Diámetro de degradación (mm)
L4	Tween 40	6	MBD	30	0%	40
L6					3.5%	38
L7			MB		1.75%	40

Tabla 7. Condiciones óptimas para la mayor actividad lipolítica de los aislados L8, L11 y L12 en Tween 60 a los tres diferentes factores abióticos estudiados.

Cepa	Ácido graso	pH	Medio	Temperatura (°C)	Concentración de sal (%)	Diámetro de degradación (mm)
L8	Tween 60	7	MBD	30	3.5%	26
L 11					1.75%	34
L 12					1.75%	36

4.6 Identificación molecular

La siguiente tabla indica los resultados obtenidos una vez seguido el protocolo descrito en la Figura 8 para la identificación molecular de los aislados. La pantalla del BLAST para cada uno de los aislados se incluye en el Apéndice.

Tabla 9. Resultados del BLAST de cada una de las secuencias obtenidas de los aislados del estudio.

Código del aislado	Número de bases empleadas para BLAST	Identificada como	Porcentaje de identificación	Código de acceso en GenBank
L1	594 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	93%	FJ435351.1
L2	429 bp	<i>Arthrobacter</i> sp. VC-YC6632	96%	EU730943.1
L3	623 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	99%	FJ435351.1
L4	511 bp	<i>Gordonia terrae</i> M-Btl-1	99%	FJ828877.2
L5	532 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	92%	FJ435351.1
L6	511 bp	<i>Gordonia terrae</i> M-Btl-1	98%	FJ828877.2
L7	520 bp	<i>Gordonia terrae</i> M-Btl-1	97%	FJ828877.2
L8	515 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	98%	FJ435351.1
L9	597 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	96%	FJ435351.1
L10	549 bp	<i>Dietzia maris</i> RE20	96%	AF537361.1
L11	343 bp	<i>Dietzia</i> sp. H0	97%	FJ435351.1
L12	561 bp	<i>Gordonia terrae</i> M-Btl-1	98%	FJ828877.2

4.7 Estándares de McFarland

Se encontró que las suspensiones realizadas se ubicaban entre el estándar 4 y el 10 lo cual representa una cantidad de microorganismos de 12×10^8 a 30×10^8

5. Discusión de resultados

En todos los experimentos la actividad lipolítica se determinó como positiva al observarse halos claros o turbios alrededor o por debajo del crecimiento de la colonia de acuerdo a lo reportado por Sierra (1957) así como por Guidice y colaboradores (2006). El halo blanco se presenta debido a la precipitación de un complejo que se forma con el calcio y el ácido graso que se libera por la acción de las enzimas lipolíticas (Kademi *et al.*, 2006). El diámetro del halo es proporcional a la cantidad de enzima producida por los microorganismos de acuerdo a lo reportado por Sierra (1957), esto mismo se comprobó por Ko y colaboradores en el 2004.

Experimento 1. La actividad lipolítica en medios suplementados con diferentes ácidos grasos como Tween 20, 40, 60, 80 y 85, se observó a través de halos blancos muy notorio alrededor de las colonias de los microorganismos con enzimas lipolíticas. Existen varias ventajas de utilizar diferentes Tween(s) para detectar este tipo de actividad, las cuales consisten en que: 1) se da un contacto óptimo entre las células en crecimiento y el sustrato lipídico, 2) los resultados son observables a simple vista y 3) dependiendo del microorganismo y la actividad, es posible la medición del diámetro de degradación.

En el experimento 1, en donde se estudiaron diferentes ácidos grasos, aquellos medios con 3.5% de sal el pH no se mantuvo a 9.0 sino a 7.0 por lo cual este medio se eliminó del experimento. Esto puede deberse a que se forman precipitados de fosfatos con el calcio a valores de pH muy básicos, por lo que los fosfatos no logran actuar como búffer. También se encontró que la degradación a pH 5.0 en todos los medios fue muy baja para la mayoría de los aislados con excepción de L4. Por otro lado la degradación de la cepa L2 fue casi nula, ya que sólo se presentó, y escasamente, a pH 8.0 en MBM T20 y T40, y en MBMD con T40.

En los experimentos en los que se utilizó Tween 20 (T20) se observó que la actividad lipolítica en medios con 3.5% de sal, fue mucho menor que en los medios sin sal, con excepción de L6 el cual tuvo un mayor crecimiento a pH 7 tanto en MBMD como en MBM (Figuras 13 y 15). En cuanto a MBMD con T20, los únicos aislados que tuvieron degradación fueron L4 y L6. En general para todos los aislados la actividad lipolítica fue mejor en MB que en MBD, con excepción de L4. En el caso de L12 se observó que este tuvo poca actividad a un solo pH y en los medios sin sal. Se puede observar que el aislado L4 tuvo el mayor halo en T20 (Figura 11)

Por otra parte, al utilizar Tween 40 (T40) y MBD la actividad fue mayor para L2, L4, L6, L7 y L12 que cuando se utilizó T20. Por el contrario, las demás cepas presentaron una actividad lipolítica significativamente menor en T40 (Figura 13). Además se encontró mayor actividad en MBM que en MB. Lo anterior no sucedió en la mayoría de los aislados en presencia de T20, con excepción de L4 y L6 (Figuras 9 y 13).

La mayor actividad se presentó en T40 por L4, de hecho, al finalizar las lecturas (21 días) la zona de actividad se había expandido a toda la superficie de la caja Petri (60 x 15). Se observó que para L3, L7 y L12 la actividad fue mayor empleando MBD que en MB (Figuras 9 y 11). El halo de degradación en T40 a pH 5 se presentó en L4, L6 y L7, los cuales no habían presentado actividad a este mismo pH utilizando T20. L6 presentó actividad de pH 5 hasta pH 9 y en todos los medios.

Por otro lado, al emplear Tween 60 (T60) se observa que L1, L3, L7, L8, L11 y L12 mostraron una degradación en un rango más amplio de pH que cuando se emplearon T20 y T40. No obstante la degradación de L4, L5, L6 y L7 fue menor al usar T60 que T40. Para L1, L4, L8 y L9 el halo de degradación fue mayor con el MBD que con el MB (Figuras 9 y 11). Sin embargo, utilizando el medio marino existió mayor degradación por L3, L7, L8, L10 y L11 que en el medio sin sal

marina (Figuras 9 y 13). La degradación de L9 fue significativamente menor que utilizando T20 que T40.

La actividad que se presentó en Tween 80 (T80) para todos los microorganismos fue menor que al compararse con T20, T40 y T60. Los halos fueron inferiores a 20 mm de diámetro, con excepción de L4. Este resultado está de acuerdo a lo reportado previamente para bacterias aisladas de la Antártica ya que T80 es un ácido graso difícil de utilizar.

Los halos de la mayoría de los microorganismos fueron ligeramente mayores al utilizar Tween 85 (T85) -al compararlo con T80- con excepción de L1, L4 y L12.

Al emplear Tributirina (TB) la degradación fue muy baja pues ninguno de los aislados tuvo un diámetro mayor a 15 mm. Mientras tanto, la degradación que se presentó utilizando Trioleína (TO) fue casi nula, ya que sólo se observó en L4, L5 y L6 y el diámetro de éstas fue mínimo. Los estudios realizados por Giudice y colaboradores (2006) reportaron resultados similares a los del presente trabajo, es decir que la degradación más baja se presenta en TO.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayor actividad lipolítica se dio con T20, T40 y T60, por lo que se decidió que fueran estas las fuentes de ácidos grasos a utilizar en los estudios de temperatura y sal. Según lo reportado por Giudice y colaboradores (2006), se conoce que la degradación es mayor con T20 y T40, pero no con T60, como se encontró en este estudio. Los resultados son comparables, ya que se utilizan condiciones similares y con bacterias marinas. Estos autores encuentran un diámetro de 52 cm utilizando T20 mientras que con T40 de 42 y con T60 de 30 mm incubándose a 30°C. En el presente trabajo se encontró que el mayor halo fue de 40 mm de diámetro utilizando T40, 38 mm con T20 y 36 mm con T60. En todos los casos la temperatura de incubación fue de

30°C. Los resultados obtenidos son muy satisfactorios cuando se les compara con lo reportado previamente.

Al observar que la mayor actividad lipolítica se dio utilizando Tween 20, 40 y 60 se puede establecer que los microorganismos prefieren degradar ácidos de cadena corta que de cadena larga. Esto puede tener una gran aplicación en la industria alimentaria, ya que son los ácidos grasos más abundantes en los alimentos.

Los estudios de Jonsson & Snygg (1974) y Adams & Brawley (1981) indican que la mayor degradación se da a un pH neutro aunque sí existió degradación tanto a pH 5 como a pH 9. Esto mismo se encontró en la mayoría de las doce bacterias evaluadas. Para L4 y L12 la mayor actividad se observó a pH 5 y pH 6, pero no a pH 7.

Por otra parte, en la Figura 17 se observan 4 diferentes microorganismos en MBD a los cinco pH de estudio. Claramente en T60 existen halos (zonas blancas) de degradación. Además, se observa que se presentó la actividad lipolítica a diferentes valores de pH dependiendo del aislado. En contraste, se presentan los medios con Trioleína, en los cuales no se observa ninguna degradación para MBD.

En la Figura 18, se muestra a la cepa L7 en todas las fuentes de ácidos grasos de estudio. En T20 se observa que la producción de una zona blanca fue casi nula por lo que aparenta no haber crecimiento, sin embargo sí existe crecimiento y degradación aunque ambos de manera mínima. Por otro lado, se observa que con T40 y T60 existe una zona blanca y se puede constatar que al utilizar estos dos últimos ácidos grasos se presenta una mayor degradación en el medio que contiene sal. Con T80 no se observó ninguna degradación aparente pero en esta prueba las cajas se tenían que observar a contraluz mientras que con T85 si se llegaron a observar halos blancos pequeños en los medios marinos. Con

TB en MBD se observa una especie de halo, pero este se debe a las burbujas de grasa que se formaron y no a una actividad lipolítica mientras que con TO no se presentó degradación alguna.

Después de realizar el estudio con los doce aislados, en las siete diferentes fuentes de ácidos grasos y a cinco diferentes pH(s), fue posible determinar las mejores condiciones y aislados para llevar a cabo los estudios de temperatura y de sal. Lo anterior, debido a que no consideramos conveniente realizar los subsecuentes estudios utilizando fuentes de ácidos grasos o pH(s) que no produjeron halos de degradación significativos. Por lo tanto, no se utilizó pH 9.0 preparado con medio marino.

Experimento 2. Durante el desarrollo de este experimento se variaron las temperaturas de incubación (Figuras 19–30). Al utilizar T20 se observa que la sensibilidad a la temperatura es muy fuerte ya que a 22°C sólo se presentó degradación del ácido graso por los aislados L4, L6, L7 y L12 en MB y en MBD (Figuras 19 y 20). Sin embargo, en el medio marino únicamente hubo degradación en L6, L7 y L12 en MBM y de L6 y L12 en MBMD (Figuras 21 y 22). Al incubar a 37°C en T20 podemos observar que el diámetro del halo fue menor que a 22°C, ya que sólo se dio una degradación muy reducida por L6 y L7 en MB y MBD, mientras que en MBMD, el único aislado que degradó fue L4 (Figura 22). Para la temperatura de 4°C, tanto el crecimiento como la degradación fue casi nula, ya que sólo se dio con L6 y L7 siendo igual o menor a 6 mm.

Al utilizar T40 como fuente de ácido graso y con una temperatura de incubación de 22°C en MB, se encontró que la degradación para L3, L7 y L12 fue mayor que con 30°C, mientras que para L4 y L6 fue menor (Figura 23). Para 37°C en MB podemos ver que todas las degradaciones fueron menores que al utilizar 30°C, con excepción de L7 y L12. Cuando se utilizaron MBD, MBM y MBMD la degradación a 37°C para todas las cepas fue mucho menor que al incubar a 30°C. Sin embargo la variación en la degradación de 22 a 30°C fue mínima para todos

los microorganismos, con excepción de L6 y L7, así como con L4 en MB, donde sí existió una mayor degradación a 30° (Figura 23).

A diferencia de T40, en T60 MB (Figura 27) se observa que la variación que se presentó en los halos de degradación entre los 30 y los 22°C es significativa aunque no tan clara como en el caso de T20. También se observa en la Figura 24 que este comportamiento no se presenta en MBD donde el tamaño del halo de degradación a 22 y el de 30°C no muestra diferencia. A 37°C la degradación es menor que a 30°C pero mucho mayor que utilizando MB y que la que se presentó con T20 y T40. Por otro lado, cuando se utiliza un medio marino y T60, la degradación del ácido graso es mayor a 22 que a 30°C para el caso de L4, L6, L7 y L12, mientras que es menor para las demás cepas. Al igual que con T20 y T40, la degradación que se dio a 4°C fue casi nula. Se esperaba que existiera una degradación considerada a 4°C, por tratarse de la temperatura a la que se encuentran los sedimentos marinos (Duxbury & Duxbury, 1997) además de que Guidice y colaboradores (2006) reportaron bacterias marinas con una muy buena capacidad de degradar lípidos a 4°C pero esto no ocurrió para los aislados de este trabajo.

En la Figura 31 se puede observar la degradación que se dio en T40 por L7 donde los halos de degradación de mayor tamaño se dieron a los 30°C. Por comparación, a 22°C la diferencia en el tamaño de los halos es menor, mientras que a 37°C es mucho menor y a 4°C el crecimiento fue casi nulo igual que la degradación.

Experimento 3. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 32 a 37, donde se observan las variaciones en la degradación de ácidos grasos a diferentes concentraciones de sal marina en el medio. Para T20 (Figuras 32 y 33) se observa que la adición de sal al medio afecta considerablemente la degradación producida por los diferentes microorganismos, con excepción de L6 y

de L12 en MBD ya que con 1.75, 3.5 y 5.25% (agua marina) el diámetro del halo de degradación es menor que con 0% de sal.

Por otro lado al utilizar T40 (Figuras 30 y 31) como fuente de ácido graso se observa que la degradación es notoriamente mayor con 1.75% de sal que sin ella (0.0%), con excepción de L4. Al comparar 1.75 con 3.5% de sal, se observa que la degradación disminuye pero este no es el caso de L5 en MB y L6 en MBD, ya que tienen una degradación mayor al utilizar agua marina en el medio de cultivo. Cuando se utiliza 5.25% de sal se observa que tanto L4, L6, L7 y L12 presentan buena degradación, mientras el halo de degradación de las otras cepas es mucho menor que con agua marina.

Al igual que con T40, en T60 (Figuras 36 y 37) se observa que la degradación que se presenta en el medio con 1.75% de sal es mayor que sin ella, lo que no sucede con L4. Se observa que cuando se empleó agua marina en el medio de cultivo, la degradación disminuyó en comparación con 1.75% de sal. No obstante, esta degradación resultó ser mayor que cuando no hubo adición de sal (tomando en cuenta que esto no sucede para L4). Al adicionar 5.25% de sal se observa que tanto L4, L6, L7 como L12 mantienen el mismo halo de degradación que con 3.5% de sal mientras que para los demás aislados la degradación disminuye.

En la Figura 38 se observa la degradación de L12 utilizando T60, donde el mayor halo se dio a 1.75% de sal. Sin embargo, la disminución de la degradación sin utilizar sal no fue tan notoria como al usar agua marina en el medio de cultivo. Al parecer este aislado soporta una alta concentración de sal, aunque con estas condiciones no se da el mayor halo de degradación pues con 5.25% de sal la degradación del ácido graso no disminuyó en comparación con 3.5%.

La concentración de sal reportada en otros estudios (Keneally *et al.*, 1998) sugiere que sin la adición de sal se debería presentar una mayor actividad

lipolítica. Sin embargo, Giudice y colaboradores (2006) reportan que los microorganismos con mayor actividad lipolítica presentaban mayor degradación con agua marina. Estos dos grupos de resultados, aparentemente contradictorios, se presentaron también en este estudio ya que hubieron aislados que tienen una mayor actividad lipolítica con la adición de sal como otros que tienen mayor actividad sin ella.

En las Tablas 5, 6 y 7 se observan los resultados de las condiciones óptimas para cada una de las cepas que presentaron mayor degradación. Se logra observar que la mayoría de los aislados prefirieron -para presentar una mayor actividad lipolítica- un medio oligotrófico que un medio basal, así como un ambiente con una determinada concentración de sal. En el caso del ácido graso se dividieron los resultados equitativamente puesto que tres cepas tuvieron su mayor degradación con T20 y a pH8, tres con T40 y pH6 y tres con T60 y pH7.

Experimento identificación molecular. En los resultados obtenidos en la identificación molecular nos podemos dar cuenta que es notorio que el género *Arthrobacter* sólo corresponde a L2, y que, a lo largo del estudio, fue la cepa con menor degradación al utilizar todos los ácidos grasos.

Podemos observar que el comportamiento de todas las cepas en estudio pertenecientes al género *Gordonia* es similar entre sí, ya que tienen una menor degradación en Tween 20 comparado con Tween 40 y 60. Sin embargo, las condiciones óptimas de las cuatro cepas pertenecientes a este género, en el caso del ácido graso, fueron diferentes; L4, L6, L7 se dieron con Tween 40 mientras que L12 lo hizo con Tween 60. Al analizar los resultados obtenidos, observamos que cuando estas cuatro cepas degradaron el ácido graso fueron las que más frecuentemente presentaron un halo de degradación blanco.

Por otro lado, podemos observar que L4 fue la única cepa del género *Gordonia* que no tuvo una mayor degradación al utilizar sal, ya que L6, L7 y L12 presentaron su mayor degradación en la presencia de esta sustancia. En cuanto al pH observamos que las cuatro cepas prefieren un medio de ácido a neutro para presentar una mayor degradación. Se puede decir que las cepas de este género presentaron los halos de degradación de mayor tamaño.

En el caso de las cepas del género *Dietzia*, observamos que las condiciones óptimas fueron muy diferentes para cada una. Por ejemplo la cepa L1 y L9 fueron eliminadas del estudio ya que su halo de degradación fue muy pequeño. Por otro lado, L8 presenta el menor halo de degradación de las cepas que se mantuvieron a lo largo del estudio. Sin embargo L10, que también forma parte del género *Dietzia*, fue de las cepas con mayor halo de degradación del estudio. En cuanto al pH observamos que todas las cepas que pertenecen a este género prefieren un pH de neutro a básico para producir una mayor degradación.

Los tres géneros encontrados en el estudio, *Dietzia*, *Gordonia* y *Arthrobacter* son microorganismos que anteriormente no se reportaban en sedimentos marinos, pero con los avances de la biología molecular ya se han informado en estudios más recientes. (Maldonado, 2005) Sin embargo no se ha reportado que ni el género *Dietzia* ni *Gordonia* sean productores de una gran actividad lipolítica, lo cual se halló en este estudio. Lo que si se encontró en la bibliografía es la utilización de Tween 80, en pruebas de caracterización para estos microorganismos (le Roes, 2008)

En los resultados obtenidos con los Estándares de McFarland, se observó que las suspensiones realizadas se encuentran en el mismo ciclo logarítmico, por lo que se puede afirmar que las preparaciones de estas fueron muy parecidas. Esto es fundamental para el experimento, ya que si se hubiera encontrado una diferencia significativa entre las suspensiones, la degradación habría sido muy variable para cada microorganismo evaluado.

6. Conclusiones

Al finalizar este estudio y la evaluación de los diferentes factores abióticos que afectan la actividad lipolítica, se puede concluir que:

- Las condiciones óptimas para la actividad lipolítica para cada aislado fueron muy variadas tanto de pH como de concentración de sal y ácido graso, mientras que la temperatura óptima fue constante (30 °C).
- Durante este estudio se encontró que las mejores fuentes de ácido graso para inducir la actividad lipolítica fueron: Tween 20, Tween 40 y Tween 60, mientras que la utilización de Trioleína y Tributirina no fue adecuada.
- Existe una mayor degradación de Tween 20, 40 y 60, por lo que se puede decir, de acuerdo a Giudice y colaboradores (2006), que las enzimas producidas por los microorganismos en estudio son carboxilesterasas y no lipasas. Sin embargo, lo anterior sólo constituye un primer acercamiento y para confirmarlo se deben realizar experimentos adicionales.
- Se estableció que el pH al cual se produce la mayor actividad depende de cada microorganismo ya que algunos aislados mostraron degradación de los ácidos grasos desde valores de pH 5 hasta pH 9. Por lo tanto, no es posible establecer un pH único que sea más efectivo para producir actividad lipolítica en los microorganismos de estudio. Cabe mencionar que a pH neutro siempre se presentó degradación del ácido graso y las condiciones óptimas de cada aislado van desde un pH 6 hasta un pH 8.
- En cuanto a los medios de cultivo, MB contra MBD, se encontró que es conveniente utilizar MBD ya que podría representar un ahorro de reactivos y la diferencia en el halo de degradación no es mayor.

- Con respecto a la temperatura de incubación se encontró que la actividad lipolítica fue casi nula a 4°C, mientras que la óptima para todas las cepas fue de 30°C.
- Para el caso de la concentración de sal se da un fenómeno parecido al del pH, en donde la dependencia de un ambiente salado es claramente propio de cada aislado de trabajo. Las condiciones óptimas varían en un rango de 0.0 a 3.5% de sal.
- De los doce microorganismos estudiados los tres que presentaron mayor degradación de los ácidos grasos analizados fueron L4, L6, L7
- De las doce cepas en estudio, el género que presentó mayor actividad lipolítica fue *Gordonia* mientras que el de menor actividad fue *Arthrobacter*.

7. Recomendaciones

Este proyecto se realizó como plataforma de una investigación dirigida a la producción de enzimas lipolíticas a partir de microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de sedimentos marinos para diversos usos industriales, como en la industria de alimentos. Debido a que es un trabajo conformado por varias etapas, y en esta tesis únicamente se exploró una primera parte, la presente investigación permite sugerir que en un futuro se realicen las siguientes investigaciones:

- Efectuar una fermentación con las condiciones óptimas encontradas para la producción de enzimas, utilizando los microorganismos que presentaron una mayor degradación de los ácidos grasos.
- Realizar el aislamiento y la purificación de las enzimas provenientes de la fermentación.
- Identificar y caracterizar las enzimas para establecer si son lipasas o carboxilesteras, así como sus características.
- Para llevar a cabo este proyecto a mayor escala sería conveniente realizar una producción de las enzimas a nivel piloto.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.M. & Brawley, T.G.1981. Factors Influencing the Activity of a Heat-Resistant Lipase of *Pseudomonas*. *Journal of Food Science* 46, 677-679
- Anderson, R.E. 1980. Microbial Lipolysis at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 36-40
- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 73-81
- Bull, A.T. & Stach, J.E. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS in Microbiology* 15, 492-499
- Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 573-606
- Chen, M., Xiao, X., Wang, P., Zeng, X., Wang, F. 2005. *Arthrobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. *Archives in Microbiology* 183, 301-305
- Cifuentes, J.L., Torres, G.M., Frías, M.M. 1997. *El océano y sus recursos IX. La pesca*. Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México, pp.182.
- Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18, 499-514

- Duangmal, K. 2004. Systematics and comparative genomics of members of the *Streptomyces violaceoruber* 16S rRNA Gene Clade. Ph.D. Thesis. Universidad de Newcastle, Newcastle upon Tyne, Reino Unido pp. 250

- Duxbury, A.C. & Duxbury A.B. (1997) *An introduction to the world's oceans*. McGraw-Hill, USA pp. 115

- Fennema, O.R. 1993. *Química de Alimentos*. Acribia, Zaragoza pp. 497-499

- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82, 1033-1041

- Frago Yáñez, D.M. 2009. Caracterización fenotípica y genotípica de bacterias Gram (+) aisladas del Pacífico mexicano. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Ciudad universitaria, pp. 16

- Garrison, T. 2004. *Essentials of Oceanography*. Thomson Brooks Cole, USA. pp 82-89

- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., Feller, G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18, 103-107

- Gershter, M., Sharples, K., Edwards, R. 2006. Carboxylesterase activities toward pesticide esters in crops and weed. *Phytochemistry* 67, 2561-2567

- Gío, A.R. 1999. La formación de recursos humanos para la oceanografía y las ciencias del mar. *Ciencia Ergo Sum* 6, 183-189

- Giudice, A.L., Michaud, L., Pascale, D., De Domenico, M., Prisco, G., Fani, R., Bruni, V. 2006. Lipolytic activity of Antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Journal of Applied Microbiology* 101, 1039-1048

- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-Positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3272- 3282

- Goodfellow, M. & Maldonado, L.A. 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds). *The Prokaryotes. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer New York 3, 843-888

- Goodfellow, M., Kumar, Y., Maldonado, L.A. 2009. The genus *Gordonia*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag. Vol. 5. (Accepted)

- Gordon, R.E. & Mihm, M.J. 1962. Identification of *Nocardia caviae* (Erikson) nov. comb. *Annals of the New York Academy of Science* 98, 628-636

- Haefner B. 2003. Drug from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug discovery today* 8, 536-544

- Hardin S.H. 2001. DNA sequencing. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing group, EUA. pp. 5

- Hasan, F. Shah, A.A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 235-251

- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, P., Wellington, E.M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233-3241

- Hopwood, D.A. 2007. *Streptomyces* in Nature and Medicine. Oxford University Press, United Kingdom, pp. 1-250

- Illanes, A., Álvarez, L., Álvaro, G. 2008. Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10, 17-35

- Jaeger, K.E. & Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 390-397

- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Review* 15, 29-63

- Jonsson, U. & Snygg, B.G. 1974. Lipase production and activity as a function of incubation time, pH and temperature of four lipolytic microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* 37, 571-581

- Kademi, A., Abdelkader, N.A., Fakhreddine, L., Baratti, J.C. 1999. A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. *Enzyme and Microbial Technology* 24, 332-338

- Kademi, A., Leblanc, D., Houde, A. 2006. Lipases en: *Enzyme Technology* (Pandey, A.). Springer, Nueva York pp. 303-305

- Kaiser, P., Raina, C., Parshad, R., Johri, S., Verma, V., Andrabi, K.I., Qazi, G.N. 2006. A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and characterization of the enzyme. *Protein Expression and Purification* 45, 262-268

- Keneally, P.M., Leuschner, R.G., Arendt, E.K. 1998. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology* 84, 839-846

- Kennish, J.M. 2001. *Practical handbook of marine science*. CRC Press. New Jersey, pp. 441-444

- Klatté, S., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M. 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the Genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 769-773

- Klausen, C., Nicolaisen, M.H., Strobel, B.W., Warnecke, F., Nielsen, J.L., Jørgensen, N.O.G. 2005. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisobornel in Danish streams of fish ponds. *FEMS Microbiology Ecology* 52, 265-278

- Ko, W.H., Wang, I.T., Ann, P.J. 2004. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 597-599

- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 9, 245-251

- le Rose, M., Goodwin, C.M., Meyers, P.R. 2008. *Gordonia lucunae* sp. nov., isolated from an estuary. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 17-23

- Levisson, M., Sun, L., Hendriks, S., Swinkels, P., Akveld, T., Bultema, J.B., Barendregt, A., van den Heuvel, R.H.H., Dijkstra, B.W., van den Oost, J., Kengen, S.W.M. 2009. Crystal Structure and Biochemical Properties of a Novel Thermostable Esterase Containing an Immunoglobulin-Like Domain. *Journal of Molecular Biology* 385, 949-962

- Li, X. & Qin, L. 2005. Metagenomics-based drug discovery a marine microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 23, 539-543

- Logan, N. 1994. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 272

- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. 2009. *Brock. Biology of Microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings. Twelfth Edition, pp. 1-1061

- Maldonado, L.A. 2009. Manual de “Biología Molecular y Bioinformática en Microorganismos Marinos”. Proyecto DGAPA-PAPIME PE206207.

- Maldonado, L.A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., Quintana, E.T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 95, 111-120

- Maldonado, L.A. & Quintana, E.T. 2009. Actividad lipolítica de actinobacterias aisladas de sedimentos marinos del golfo de México, en: *Avances en el Estudio de la Biotecnología* (Narváez, J.A., Villegas-Hernández, M.C. & Mendoza, A.). Eds. Editorial Instituto Politécnico Nacional, pp. 62-65

- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 11-18

- Maragoni, A.G. 2002. Lipases: Structure, Function and Properties en: *Lipid Biotechnology* (Kwo, T.M. & Garder, H.W.) Marcel Dekker, Inc. Nueva York pp. 357-369

- McCarthy, A.J. & Williams, S.T. 1990. Methods for studying the ecology for Actinomycetes en: *Methods in Microbiology* (Grigorova, R. & Norris, J.R.) Techniques in Microbial Ecology. Academic Press Limited, Cambridge University Press pp. 535 - 538

- McVeigh, H.P., Munro, J., Embley, T.M. 1996. Molecular evidence for the presence of novel actinomycete lineages in a temperate forest soil. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 197-204

- Micklos, D.A. & Freyer, G.A. 1990. DNA Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. pp. 477

- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5005-5012

- Mohamed, M.A., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A., Fahmy, A.S. 2000. Distribution of lipases in the *Gramineae*. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology* 73, 227-234

- Munn, C.B. 2004. Marine Microbiology. BIOS Scientific Publishers, pp. 1-282.

- Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J., Pfaller, M., Tenover, R. 2003. *Manual of clinical microbiology*. ASM PRESS pp. 358

- Odibo, F.G., Okereke, U.O., Oyeka, C.A. 1995. Influence of culture conditions on the production of lipase of *Hendersonula toruloides*. *Bioresource Technology* 54, 81-83

- OLADE Organización Latinoamericana de Energía. 2006. *Introducción al tema de Biocombustibles*. Extraído el 040809 de www.olade.org.ec

- Oliszewski, R., Medina, R.B., Gonzalez, S.N., Perez-Chaia, A.B. 2007. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goat's milk and cheeses. *Food Chemistry* 101, 1446-1450

- Paiva, A.L. Balcao, V.M., Malcata, X. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 187-204

- Papon, M. & Talon, R. 1988. Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* 64, 107-115

- Quintana, E.T. 2004. Biosystematics of clinically and industrially significant actinomycetes, Ph. D. Thesis. Universidad de Newcastle, Newcastle upon Tyne, Reino Unido. pp. xiii

- Sharma, N.K., Srivastava, A.K., Gill, J.P.S., Joshi, D.V. 1994. Differentiation of meat from food animals by enzyme assay. *Food Control* 5, 219-222

- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on the influence of the contact between cells and fatty acid substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23, 15-22

- Sijtsma, L. & Swaaf, M.E. 2003. Production of polyunsaturated fatty acids by heterotrophic marine microorganisms en Abstracts of Marine Biotechnology: Basics and Applications. *Biomolecular Engineering* 20, 37-82

- Soddell, J.A., Stainsby, F.M., Eales, K.L., Seviour, R.J., Goodfellow, M. 2006. *Gordonia defluvii* sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2265–2269

- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welck, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12115-12120

- Stach, J.E., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bull, A.T. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 5, 828-841

- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 479-491

- Susuki, Y., Miyamoto, K., Ohta, H . 2004. A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *FEMS Microbiology Letters* 236, 97-102

- Torres, S., Baigorí, M.D., Swathy, S.L., Pandey, A., Castro, G.R. 2008. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase, *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2008.12.005

- Yakimov, M.M., Timmis, K., Golyshin, P. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 257-266

- Ward, A.C. & Bora, N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Ecology and Industrial Microbiology* 9, 279-286

- Weber, N., Weitkamp, P., Mukherjee, K.D. 2002. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Research International* 35, 177-181

- Weete, J.D. 2002. Microbial lipase en: *Food Lipids* (Akoh, C.C. y Min, D.B.) Marcel Dekker, N.Y. pp. 814-829

- Zhi, X.Y., Li, W.J., Strackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 589-608

9. Apéndice

Búffer GTE (100mL; Micklos & Freyer, 1990)

Glucosa al 40% (m/v)	2.27 mL
EDTA 0.5M pH 8	2.0 mL
Tris-HCl pH 8	2.5 mL
H ₂ O	93.23 mL

Búffer TBE 10x (Micklos & Freyer, 1990)

Tris Base	11.6 g
Ácido bórico	8.42 g
EDTA sódico	0.98 g
H ₂ O	1000 mL

Medio GYEA (Gordon & Mihm, 1962)

Glucosa (SIGMA)	1%
Extracto de Levadura (SIGMA)	1%
Agar Bacteriológico (BIOXON)	1.2%
pH	7.0-7.2

Medio Basal (MB) (Sierra, 1957; Giudice *et al.*, 2006)

Peptona Bacteriológica (SIGMA)	1%
CaCl ₂ (SIGMA)	0.01%
Agar Bacteriológico (BIOXON)	1.2%
pH	7.4

Medio Basal Diluido (MBD)

Peptona Bacteriológica (SIGMA)	0.667%
CaCl ₂ (SIGMA)	0.0667%
Agar Bacteriológico (BIOXON)	0.8%
pH	7.4

Estándares de McFarland

Se prepara una solución de BaCl₂ (SIGMA) al 1% y otra de H₂SO₄ (BAKER) puro al 1%. Estas dos soluciones se ponen en las cantidades establecidas de acuerdo a la tabla. Estas dos soluciones se mezclan perfectamente y la densidad de cada tubo corresponde a la densidad de las suspensiones microbianas, indicadas en la última columna.

Tabla 10. Relación entre los estándares de McFarland y la suspensión bacteriana
(adaptada de Murray *et al.*, 2003)

Estándar	Volumen BaCl ₂ 1% (ml)	Volumen H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Suspensión Bacteriana Correspondiente (10 ⁸ UFC/ml)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

Resultados del programa BLAST para cada uno de los aislados del presente trabajo (sólo se indican los 10 primeros resultados de cada búsqueda)

1. Lipo-1

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	93%	0.0	93%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	891	891	93%	0.0	93%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	891	891	93%	0.0	93%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	891	891	93%	0.0	93%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	93%	0.0	93%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene	891	891	93%	0.0	93%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	891	891	93%	0.0	93%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	891	891	93%	0.0	93%	
GQ009483.1	Uncultured bacterium clone nbw777b02c1 16S ribosomal RNA gene,	891	891	93%	0.0	93%	
GQ009482.1	Uncultured bacterium clone nbw777b01c1 16S ribosomal RNA gene,	891	891	93%	0.0	93%	

2. Lipo-2

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU734601.1	Arthrobacter sp. VC-YC6632 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	606	606	84%	2e-170	96%	
EU730943.1	Arthrobacter aqillis strain 234 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	603	603	84%	3e-169	96%	
AY526658.1	Arthrobacter sp. Muzt-E04 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	603	603	84%	3e-169	96%	
AF197057.1	Arthrobacter sp. 'SMCC ZAT277' 16S ribosomal RNA gene, partial s	603	603	84%	3e-169	96%	
EU647541.1	Uncultured Arthrobacter sp. clone 27 16S ribosomal RNA gene, part	597	597	84%	1e-167	96%	
EU135687.1	Arthrobacter sp. YIM C818 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	597	597	84%	1e-167	96%	
EF612302.1	Arthrobacter sp. OS-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	597	597	84%	1e-167	96%	
DQ513408.1	Arthrobacter sp. B-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	597	597	84%	1e-167	96%	
AY526677.1	Arthrobacter sp. Muzt-F95 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	597	597	84%	1e-167	96%	
AY526639.1	Arthrobacter sp. Muzt-C11 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	597	597	84%	1e-167	96%	

3. Lipo-3

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1101	1101	96%	0.0	99%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1101	1101	96%	0.0	99%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1101	1101	96%	0.0	99%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1101	1101	96%	0.0	99%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene	1101	1101	96%	0.0	99%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	1101	1101	96%	0.0	99%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	1101	1101	96%	0.0	99%	
GQ009483.1	Uncultured bacterium clone nbw777b02c1 16S ribosomal RNA gene,	1101	1101	96%	0.0	99%	
GQ009482.1	Uncultured bacterium clone nbw777b01c1 16S ribosomal RNA gene,	1101	1101	96%	0.0	99%	
FJ876398.1	Dietzia maris strain 3536BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1101	1101	96%	0.0	99%	

4. Lipo-4

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ828877.2	Gordonia terrae strain M-Bti-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	902	902	96%	0.0	99%	
GU084407.1	Gordonia sp. IITR 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	
EU554301.1	Gordonia sp. HVG22B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	96%	0.0	99%	
GQ342299.1	Gordonia terrae strain CG-T6 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	902	902	96%	0.0	99%	
FJ959396.1	Gordonia terrae strain MRbS27 16S ribosomal RNA gene, partial seq	902	902	96%	0.0	99%	
GQ036279.1	Uncultured bacterium clone nbu362c11c1 16S ribosomal RNA gene,	902	902	96%	0.0	99%	
GQ057100.1	Uncultured bacterium clone nbw1060b09c1 16S ribosomal RNA gene,	902	902	96%	0.0	99%	
GQ008674.1	Uncultured bacterium clone nbw119c04c1 16S ribosomal RNA gene,	902	902	96%	0.0	99%	
FJ218348.1	Gordonia terrae strain S14-10 16S ribosomal RNA gene, partial seq	902	902	96%	0.0	99%	
FJ200387.1	Gordonia terrae strain 3269bBRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial	902	902	96%	0.0	99%	

5. Lipo-5

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	736	736	90%	0.0	92%	
GQ505330.1	Dietzia maris strain 5-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	736	736	90%	0.0	92%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	736	736	90%	0.0	92%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial seque	736	736	90%	0.0	92%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial seque	736	736	90%	0.0	92%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	736	736	90%	0.0	92%	
GQ144841.1	Uncultured actinobacterium clone a-65 16S ribosomal RNA gene, pa	736	736	90%	0.0	92%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene,	736	736	90%	0.0	92%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	736	736	90%	0.0	92%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	736	736	90%	0.0	92%	

6. Lipo-6

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ828877.2	Gordonia terrae strain M-Bti-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	795	795	87%	0.0	98%	
GU084407.1	Gordonia sp. IITR 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	795	795	87%	0.0	98%	
EU554301.1	Gordonia sp. HVG22B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	795	795	87%	0.0	98%	
GQ342299.1	Gordonia terrae strain CG-T6 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	795	795	87%	0.0	98%	
FJ959396.1	Gordonia terrae strain MRbS27 16S ribosomal RNA gene, partial seq	795	795	87%	0.0	98%	
GQ036279.1	Uncultured bacterium clone nbu362c11c1 16S ribosomal RNA gene,	795	795	87%	0.0	98%	
GQ057100.1	Uncultured bacterium clone nbw1060b09c1 16S ribosomal RNA gene,	795	795	87%	0.0	98%	
GQ008674.1	Uncultured bacterium clone nbw119c04c1 16S ribosomal RNA gene,	795	795	87%	0.0	98%	
FJ218348.1	Gordonia terrae strain S14-10 16S ribosomal RNA gene, partial seq	795	795	87%	0.0	98%	
FJ200387.1	Gordonia terrae strain 3269bBRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial	795	795	87%	0.0	98%	

7. Lipo-7

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ828877.2	Gordonia terrae strain M-BtI-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	861	861	94%	0.0	97%	
GU084407.1	Gordonia sp. IITR 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	861	861	94%	0.0	97%	
EU554301.1	Gordonia sp. HVG22B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	861	861	94%	0.0	97%	
GQ342299.1	Gordonia terrae strain CG-T6 16S ribosomal RNA gene, partial seq	861	861	94%	0.0	97%	
FJ959396.1	Gordonia terrae strain MRbS27 16S ribosomal RNA gene, partial seq	861	861	94%	0.0	97%	
GQ036279.1	Uncultured bacterium clone nbu362c11c1 16S ribosomal RNA gene,	861	861	94%	0.0	97%	
GQ057100.1	Uncultured bacterium clone nbw1060b09c1 16S ribosomal RNA gene,	861	861	94%	0.0	97%	
GQ008674.1	Uncultured bacterium clone nbw119c04c1 16S ribosomal RNA gene,	861	861	94%	0.0	97%	
FJ218348.1	Gordonia terrae strain S14-10 16S ribosomal RNA gene, partial seq	861	861	94%	0.0	97%	
FJ200387.1	Gordonia terrae strain 3269bBRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial	861	861	94%	0.0	97%	

8. Lipo-8

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	798	798	86%	0.0	98%	
GQ505330.1	Dietzia maris strain 5-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	798	798	86%	0.0	98%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	798	798	86%	0.0	98%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial seque	798	798	86%	0.0	98%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial seque	798	798	86%	0.0	98%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	798	798	86%	0.0	98%	
GQ144841.1	Uncultured actinobacterium clone a-65 16S ribosomal RNA gene, pa	798	798	86%	0.0	98%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene,	798	798	86%	0.0	98%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	798	798	86%	0.0	98%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	798	798	86%	0.0	98%	

9. Lipo-9

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	944	944	91%	0.0	96%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	944	944	91%	0.0	96%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial seque	944	944	91%	0.0	96%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial seque	944	944	91%	0.0	96%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	944	944	91%	0.0	96%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene,	944	944	91%	0.0	96%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	944	944	91%	0.0	96%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	944	944	91%	0.0	96%	
GQ009483.1	Uncultured bacterium clone nbw777b02c1 16S ribosomal RNA gene,	944	944	91%	0.0	96%	
GQ009482.1	Uncultured bacterium clone nbw777b01c1 16S ribosomal RNA gene,	944	944	91%	0.0	96%	

10. Lipo-10

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	△ E value	Max ident	Links
AF537361.1	Dietzia maris strain RE20 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	889	889	95%	0.0	96%	
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	94%	0.0	97%	
GQ505330.1	Dietzia maris strain 5-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	889	889	94%	0.0	97%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	889	889	94%	0.0	97%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial seque	889	889	94%	0.0	97%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial seque	889	889	94%	0.0	97%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	94%	0.0	97%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene	889	889	94%	0.0	97%	
GQ016442.1	Uncultured bacterium clone nbw773d11c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	94%	0.0	97%	
GQ016334.1	Uncultured bacterium clone nbw772c02c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	94%	0.0	97%	

11. Lipo-11

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	△ E value	Max ident	Links
FJ435351.1	Dietzia sp. H0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	460	460	77%	2e-126	97%	
GQ505330.1	Dietzia maris strain 5-5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	460	460	77%	2e-126	97%	
EU977823.1	Dietzia maris strain 1P07AC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	460	460	77%	2e-126	97%	
EU977750.1	Dietzia maris strain 1P07PC 16S ribosomal RNA gene, partial seque	460	460	77%	2e-126	97%	
EU977748.1	Dietzia maris strain 1P07PA 16S ribosomal RNA gene, partial seque	460	460	77%	2e-126	97%	
EU977600.1	Dietzia maris strain 1P07MB 16S ribosomal RNA gene, partial seque	460	460	77%	2e-126	97%	
EU873262.1	Dietzia sp. N21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	460	460	77%	2e-126	97%	
GQ183842.1	Dietzia sp. C-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	460	460	77%	2e-126	97%	
GQ144841.1	Uncultured actinobacterium clone a-65 16S ribosomal RNA gene, pa	460	460	77%	2e-126	97%	
GQ057453.1	Uncultured bacterium clone nbw1058c11c1 16S ribosomal RNA gene	460	460	77%	2e-126	97%	

12. Lipo-12

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	△ E value	Max ident	Links
FJ828877.2	Gordonia terrae strain M-BH-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	911	911	90%	0.0	98%	
GU084407.1	Gordonia sp. IITR 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	90%	0.0	98%	
EU554301.1	Gordonia sp. HVG22B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	90%	0.0	98%	
GQ342299.1	Gordonia terrae strain CG-T6 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	911	911	90%	0.0	98%	
FJ959396.1	Gordonia terrae strain MRBS27 16S ribosomal RNA gene, partial seq	911	911	90%	0.0	98%	
GQ036279.1	Uncultured bacterium clone nbu362c11c1 16S ribosomal RNA gene,	911	911	90%	0.0	98%	
GQ057100.1	Uncultured bacterium clone nbw1060b09c1 16S ribosomal RNA gene	911	911	90%	0.0	98%	
GQ008674.1	Uncultured bacterium clone nbw119c04c1 16S ribosomal RNA gene,	911	911	90%	0.0	98%	
FJ218348.1	Gordonia terrae strain S14-10 16S ribosomal RNA gene, partial seq	911	911	90%	0.0	98%	
FJ200387.1	Gordonia terrae strain 3269bBRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial	911	911	90%	0.0	98%	