



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
ACTINOMICETOS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA
AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DEL
GOLFO DE MÉXICO**

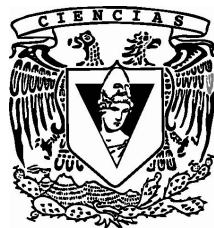
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TANIA PASCOE ORRALA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno. Pascoe Orrala Tania 56 07 74 21 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 98058060</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Luis Ángel Maldonado Manjarrez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Adolfo Gracia Gasca</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M en C Alfonso José Vilchis Peluyera</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Erika Teresa Quintana Cano</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Mario Alejandro Gómez Ponce</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Identificación molecular de actinomicetos con actividad lipolítica aislados de sedimentos marinos del Golfo de México. 56 p 2008</p>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma México, institución que me brindó la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, a mi querida Facultad de Ciencias, al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, donde fue posible concluir el presente trabajo de investigación y a las personas involucradas en Taller de Ecología y Paleoecología Marina impartido por la Facultad de Ciencias pues a partir de éste me incliné hacia los estudios del medio marino.

A todas las personas que me apoyaron a lo largo de mi trabajo, mis profesores, sinodales y especialmente a mi asesor Luis Ángel Maldonado Manjarrez que me abrió las puertas para trabajar con él y concluir esta tesis. Por su paciencia, apoyo y conocimiento transmitido, gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarlo con todo mi amor a mis padres, Beatriz y Santiago, por los sólidos cimientos con los que me educaron, pues gracias a ellos he llegado hasta donde estoy ahora. Gracias por confiar en mí siempre, por permitirme crecer en lo que más me gusta y por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, a toda mi hermosa familia y amigos que fueron un apoyo esencial y que cada uno en su momento me dio la fuerza y energía para continuar siempre adelante, muchas gracias.

*"If you take care of your microbial friends,
they will take care of your future".*

David Pearlman

*"Never underestimate
the power of the microbe".*

Jackson W. Foster

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMEN.....	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Generalidades e importancia de las bacterias.....	8
1.2 Clasificación de las bacterias.....	11
1.2 Hipótesis.....	16
1.4 Objetivos.....	16
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Orden <i>Actinomycetales</i>	17
2.2 Enzimas lipasas.....	19
2.3 Aislamiento selectivo.....	20
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Esquema general.....	21
3.2. Área de estudio y toma de muestras	23
3.3. Experimento 1. Determinación de la actividad lipolítica.....	25
3.4. Experimento 2. Efecto de la concentración de sal sobre la actividad lipolítica.....	28
3.5. Identificación molecular.....	24
3.5.1 Extracción de DNA.....	29
3.5.2 Electroforesis horizontal.....	31
3.5.2 PCR con primers específicos para la clase <i>Actinobacteria</i>	31
3.5.3 Secuenciación.....	32
3.5.4 Construcción de árboles filogenéticos.....	33
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
4.1. Experimento 1. Aislamiento selectivo de bacterias marina.....	34
4.2. Experimento 2. Efecto de la concentración de sal sobre la actividad lipolítica.....	39
4.3. FILOGENIAS.....	45
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51
7. MESOGRAFÍA.....	56

RESUMEN

Las lipasas son un grupo importante de enzimas las cuales pueden ser utilizadas como aditivos en detergentes, biocatalizadores en procesos de bioremediación y en la industria de alimentos para mejorar el sabor en productos lácteos, en la digestión de grasas y de aceites, entre otros.

Actualmente existe una demanda por encontrar nuevas fuentes de lipasas con cierta especificidad hacia sustratos dependiendo del fin que se quiera obtener. Las nuevas fuentes de lipasas son un tema de investigación importante, dentro del cual las bacterias marinas del orden *Actinomycetales* son capaces de producirlas.

En este proyecto se aislaron 12 microorganismos de la clase *Actinobacteria* a partir de muestras de sedimentos marinos del Golfo de México. Se reconoció que existe actividad lipolítica en los 12 aislados obtenidos y se observó que existe un efecto de esta actividad a diferentes concentraciones de agua marina; posteriormente se realizó un estudio filogenético para establecer la relación molecular de los microorganismos aislados, los cuales pertenecen a los géneros *Gordonia*, *Dietzia* y *Arthrobacter*, proponiéndolos como nuevos potenciales taxa.

Palabras clave: *Actinobacteria*, *Actinomycetales*, lipasas, estudios filogenéticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades e Importancia de las bacterias

Las bacterias son microorganismos que forman parte del grupo de los protistas, siendo una de las formas de vida más sencillas que existen estrictamente hablando de su estructura celular, ya que en cuanto a su metabolismo y evolución son organismos altamente complejos. Estas formas de vida han sido muy exitosas, por lo que actualmente las encontramos viviendo en casi cualquier lugar del planeta por lo que se dice que tienen una distribución cosmopolita.

Los microbios juegan un papel esencial para la sustentabilidad del planeta. En aproximadamente 2 millones de años estos ancestros fueron la única forma de vida en la Tierra y a partir de esta larga historia también se desarrolló toda la bioquímica que envuelven a todos los seres vivos y todas las formas de vida fueron evolucionando a partir de ellos. Se ha estimado que el 50% de la vida en la Tierra son bacterias y soportan los procesos básicos de todos los ecosistemas como por ejemplo en los ciclos biogeoquímicos y las cadenas tróficas, donde protagonizan diversos papeles como colonizadores, degradadores, parásitos, simbiosis y de vida libre (CME, 2003). La temperatura podría ser uno de los principales factores que limita si pueden habitar o no en un ecosistema (Hunter-Cevera, 1998).

Los ecosistemas oceánicos no son una excepción, dentro del gran reservorio microbiano que existe en el mundo, se han encontrado desde la superficie oceánica hasta lugares considerados hostiles para la vida como las ventilas hidrotermales o dentro de rocas del Antártico. También juegan un papel muy importante en la mineralización de detritus sedimentado y en el intercambio de nutrientes mineralizados a el agua, para ser utilizados por los productores primarios (Sleigh, 1987). Sin embargo, existe evidencia basada en datos de secuencias del gen 16S rRNA que señalan de que un 99% de los microorganismos no han sido cultivados aún, lo que nos evidencia una enorme diversidad genética (Maldonado, *et al.*, 2005b).

Existen secuencias genéticas, altamente conservadas como las del gen 16S rRNA que proveen las bases para el estudio y la estimación de la diversidad filogenética en las bacterias y permiten generar mayor conocimiento sobre éstas (Sogin, *et al.*, 2005). Mientras mas secuencias de subunidades rDNA se encuentran disponibles existe una gran posibilidad de utilizar este conocimiento para un mejor entendimiento acerca del funcionamiento dentro de las relaciones del ecosistema, desarrollando nuevos métodos de cultivo y descubriendo nuevos productos y procesos (Hunter-Cevera, 1998).

Desde el punto de vista antropogénico, y a partir del descubrimiento de la fermentación, se han aprovechado productos de origen microbiano desde varios siglos atrás hasta nuestros días, como en la fabricación de queso, pan y muchos otros tipos de alimentos y bebidas. Actualmente y con el desarrollo de nuevas tecnologías el uso de estos microorganismos no solo se ha limitado al área alimentaria sino que se ha extendido a otras áreas tales como la cosmética, farmacéutica y veterinaria por mencionar solo algunas de ellas, las cuales generan a estas industrias ingresos millonarios (Demian, 2000) .

La biotecnología es una ciencia que con el desarrollo de la microbiología y en particular la biología molecular, actualmente juega un papel muy importante en el manejo y manipulación de microorganismos. Ésta puede definirse como la explotación industrial de sistemas y procesos biológicos para generar bienes y servicios al ser humano y representa *per se* la base de la búsqueda y descubrimientos para la aplicación de recursos biológicos. Además, es una herramienta potencial en disciplinas tales como la genética, bioquímica, electrónica, ingeniería bioquímica, ingeniería química, ingeniería en alimentos, ingeniería mecánica, etc. De ésta manera la biotecnología es capaz de implementarse a gran escala dentro de diversos sectores industriales (Demian, 2000).

Los usos y aplicaciones que ha tenido esta ciencia son muy extensos ya que van desde aplicaciones en salud humana y animal con la creación de vacunas, antibióticos, hormonas, vitaminas, drogas hasta terapia génica o medicina molecular. En lo que se refiere al ecosistema marino, su importancia como gran reservorio de mucha de la riqueza biológica del planeta recupera actualidad desde la perspectiva de la utilización de

la biotecnología marina, que permite vislumbrar una potenciación en el uso de los vastos recursos marinos para la producción de alimentos, fármacos, energía y otros bienes y necesidades antropogénicas (Gracia, 2001).

En agricultura inclusive se han desarrollado diferentes pesticidas, herbicidas, plantas transgénicas, cultivo de tejidos, resistencia a condiciones extremas mediante la biotecnología molecular o biotecnología moderna (Bolívar, 2004). Dentro de la industria farmacéutica, por ejemplo, más del 70 % de los antibióticos que se emplean comercialmente provienen del grupo bacteriano actinomicetos, también han sido estudiados como agentes antibacteriales y fúngicos, entre otros (Maldonado, 2007). Entre los productos químicos que se pueden generar utilizando microorganismos en procesos biotecnológicos encontramos por ejemplo a los ácidos orgánicos y detergentes (Bolívar, 2004). En la industria alimentaria los microorganismos o productos de su metabolismo (por ejemplo enzimas) se utilizan para la producción o mejoramiento de bebidas alcohólicas, quesos, vinos, productos fermentados entre otros. Respecto a la producción de energías alternativas como biogas o la producción de bioetanol a escala industrial, el uso de microorganismos para este tipo de procesos es fundamental. En lo que respecta al medio ambiente los microorganismos se han utilizado como indicadores de monitoreo de contaminantes y algunos en procesos de biorremediación.

La versatilidad de los microbios hablando en términos de biosíntesis es enorme; existen dos tipos de compuestos que se obtienen a partir del metabolismo microbiano: los metabolitos primarios, que son los producidos durante la fase primaria del crecimiento de un microorganismo, los más importantes en la industria son los aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, solventes y ácidos orgánicos. El segundo tipo de compuestos, se refiere a los metabolitos secundarios, los cuales se obtienen de la fase estacionaria o en la parte final del crecimiento de las bacterias (Figura 2), tales como antibióticos, antihelmínticos, antitumorales, biopesticidas, inhibidores enzimáticos e inmunosupresores. De éstos, millones de toneladas por año son producidas por los microbios, en particular por miembros de las actinobacterias grupo mejor conocido como Actinomicetos (Demian, 2000).

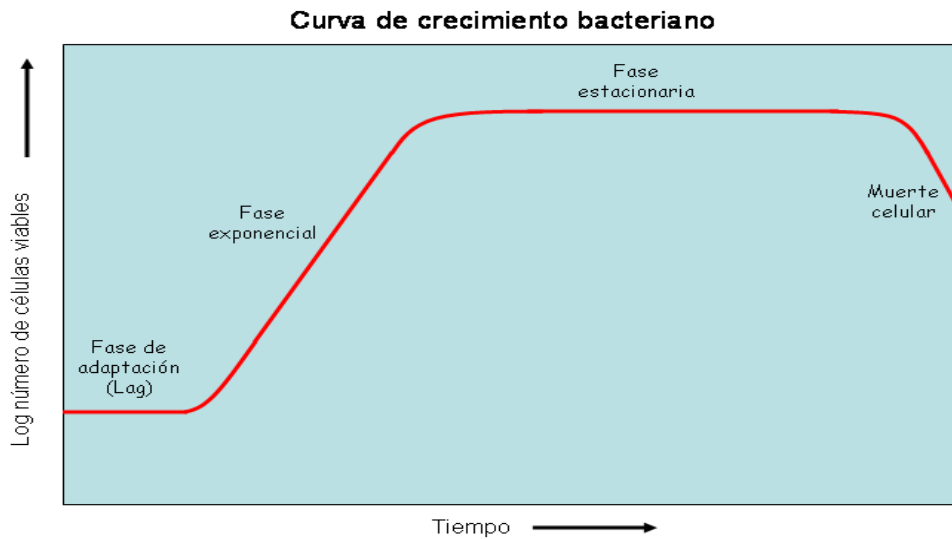


Fig.2. Curva de crecimiento bacteriano (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Curva_de_crecimiento.png)

1.2 Clasificación de las bacterias

En un principio la clasificación de los procariontes, es decir, microorganismos que como característica principal no tienen un núcleo rodeado de una doble membrana, sólo se tomaban en cuenta los caracteres fenotípicos generales y características de tinciones ya fueran simples o específicas. Posteriormente y con el desarrollo de la disciplina de clasificación se fueron utilizadas otras características y técnicas. Sin embargo, no es hasta que las técnicas moleculares se desarrollan y aplican en todas las ramas de las ciencias biológicas que comienza una revolución del conocimiento de estos seres microscópicos y a partir de la construcción de árboles filogenéticos que se complementan las capacidades bioquímicas y metabólicas de los microorganismos (Curtis, *et al.*, 2007).

En la década de los 70's Carl R. Woese y colegas utilizaron diferencias y similitudes del gen ribosomal 16S rRNA (una molécula altamente conservada en términos evolutivos) para medir una distancia evolutiva entre distintos grupos de bacterias; poder establecer filogenéticamente sus relaciones y desarrollar una herramienta que revolucionaría la forma de ver a la diversidad procariótica (Munn, 2004). Woese, descubre que al construir árboles filogenéticos con base en el 16S rRNA existen

tres dominios clasificados en: 1) Archea, 2) Bacteria y 3) Eukarya. Los dos primeros corresponden al grupo de los procariontes y dentro del dominio Bacteria se encuentran incluidos microorganismos con alto contenido de guanina y citosina (G+C) que corresponden a miembros de la clase *Actinobacteria* (Stackebrant *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009).

Se ha estudiado que la distribución de la diversidad microbiana y de todos los demás organismos en los océanos se extiende a lo largo de la columna de agua; esta distribución dependerá de la profundidad y de todas las variables que se vean implicadas dentro. La división del perfil batimétrico se observa en la figura 1.

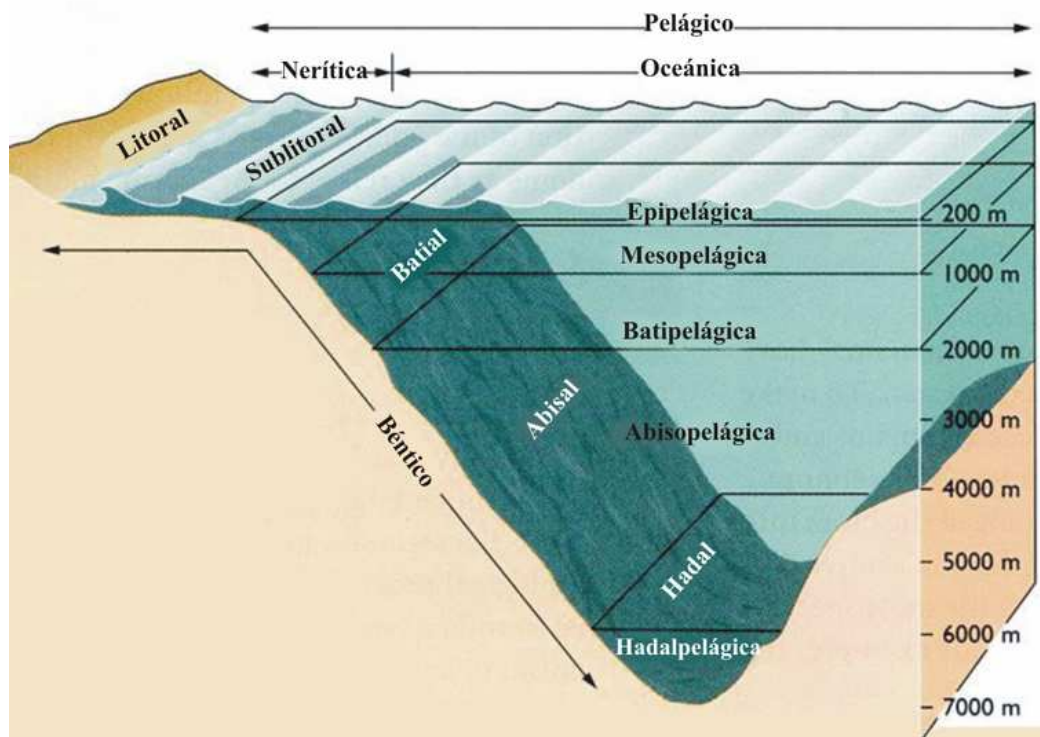


Figura 1. Esquema del perfil oceánico.

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/141/img/141_56.gif

Existe una subdivisión de las bacterias que consiste en dos grandes grupos; en el primero se encuentran las que usan al dióxido de carbono como única fuente de carbono llamadas autótrofas; donde se encuentran las que utilizan energía solar son llamadas fotoautótrofas y quimioautótrofas las que utilizan la energía de la oxidación de compuestos inorgánicos. La segunda gran división se refiere a las bacterias heterótrofas

que utilizan a los compuestos orgánicos complejos como fuente de energía, y donde se encuentran también las saprófitas y parásitas (Kennish, 2001).

En los sedimentos marinos también existe un gran reservorio bacteriano, colonizando tanto hábitats aeróbicos como anaeróbicos. Este hábitat se ve influenciado por variables como la luz, temperatura, el grado de turbulencia en el suelo marino, permeabilidad del sedimento, bioturbación y contenido de materia orgánica que determinaran su distribución tanto vertical como horizontal (Kennish, 2001).

El presente trabajo está orientado al estudio de actinomicetos aislados de ambientes marinos (sedimentos recuperados del Golfo de México) que posean actividad lipolítica para así profundizar y ampliar el conocimiento de este tipo de microorganismos en el ambiente marino.

La búsqueda y el descubrimiento de productos naturales obtenidos de microorganismos no es necesariamente un área nueva, como lo hemos visto a lo largo de la historia, sino un tema que se va reinventando y complementando para mantenerse a la vanguardia del avance biotecnológico (Bull, 2004). Antes de la era genómica, ésta búsqueda se enfocaba en microorganismos de origen terrestre pues la inaccesibilidad de las aguas profundas orientaba los estudios únicamente a la porción costera. En la actualidad existe evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a éste ecosistema. Evidentemente el descubrimiento del género *Salinispora* ha contribuido a la apertura de una nueva era en el redescubrimiento de microorganismos de la clase *Actinobacteria* en lo que se refiere al hábitat marino.

Hablando específicamente de la República Mexicana, cuenta con un área marina superior a la terrestre: 3,178,638 kilómetros cuadrados, de los cuales 2,946,825 pertenecen a la zona económica exclusiva, mientras que el mar territorial comprende un área de 231,813 kilómetros cuadrados (Figura 3) que se extienden por el océano Pacífico, el mar Caribe y el Golfo de México (<http://www.mcx.es>). A pesar de su

extensión, es la parte menos estudiada del país debido, principalmente, a su difícil accesibilidad.

Los microorganismos de origen terrestre han sido mayormente estudiados en nuestro país, sin embargo, y por lo que se mencionó en el párrafo anterior, el ambiente marino representa una excelente fuente de investigación que puede ser aprovechada de una manera responsable. México es un país megadiverso donde se ha establecido que mas del terreno determinado como “zona comercial territorial” esta cubierta bajo el agua, por lo que estudios relacionados con el ecosistema marino nacional bien pueden constituir una prioridad como fuente importante de productos bajo el uso sustentable de sus recursos.

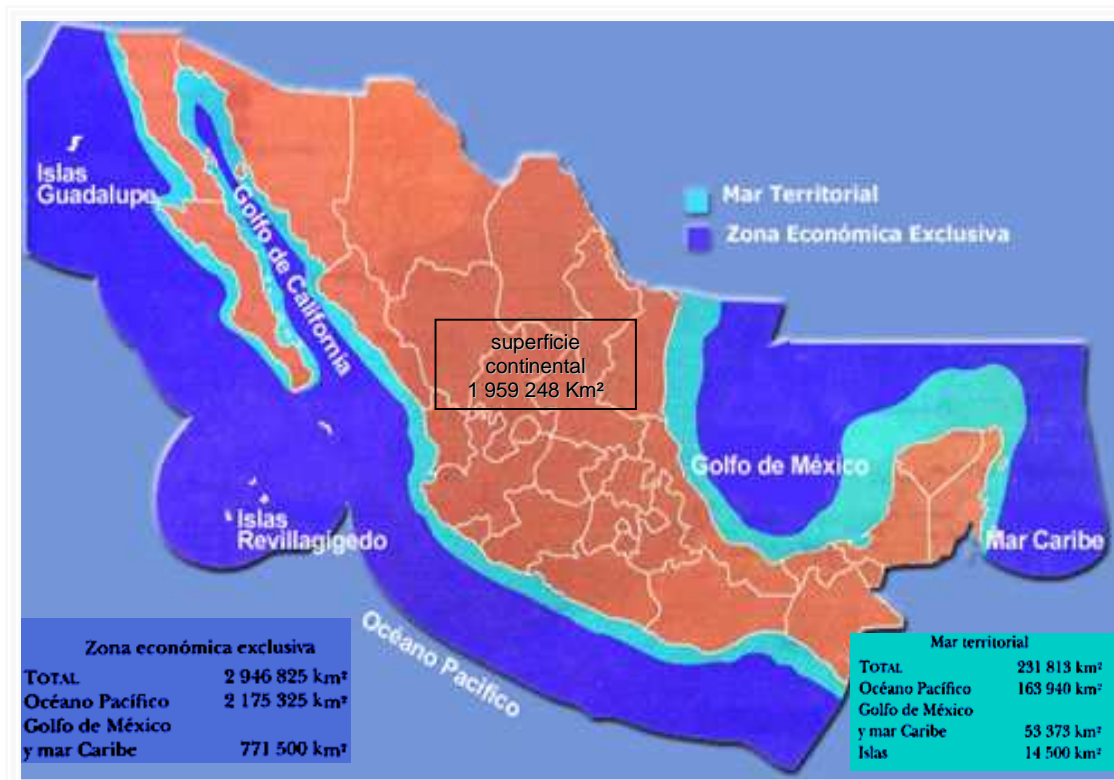


Figura 3. Mapa de México que compara la superficie continental contra la marina (<http://www.elbalero.gob.mx>).

Dado que el 71% de la superficie terrestre es agua (Hunter-Cevera, 1998), la búsqueda de productos nuevos provenientes de éste ecosistema y clasificados como recursos biológicos comercialmente explotables se ha visto recientemente favorecida.

Esta orientación esta enfocada a estudios que permitan explorar la micro-biodiversidad marina dadas las crecientes necesidades de la población mundial de nuevos antibióticos tanto para enfermedades conocidas como aquellas emergentes, que paradójicamente los microorganismos causantes de las enfermedades se han vuelto resistentes a los antibióticos conocidos o rutinariamente utilizados para combatirlas (De Fountaubert & Downes, 1996).

1.3 HIPÓTESIS

Aislados microbianos provenientes del Golfo de México identificados molecularmente dentro de la clase *Actinobacteria* mostrarán actividad lipolítica dependiente de la concentración de sal.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar e identificar miembros del orden Actinomycetales a partir de sedimentos marinos del Golfo de México y evaluar su posible actividad lipolítica.

Objetivos Particulares

- Aislar actinomicetos de sedimentos marinos del Golfo de México.
- Evaluar la presencia de actividad lipolítica de los aislados.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio sobre la actividad lipolítica de los aislados.
- Establecer la relación filogenética molecular de los microorganismos aislados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Orden *Actinomycetales*

El orden Actinomicetales está constituido por un grupo diverso de bacterias Gram positivas de alto contenido de Guanina y Citosina (G+C >55%) se les nombra Gram positivas ya que tienen una pared celular gruesa a base de peptidoglucano y por la cual en la tinción de gram se retiene el colorante tomando un color violeta; éstos, se encuentran tanto en ambientes terrestres, dulceacuícolas y marinos (Wood *et al.*, 2006). Entre los ambientes marinos, existen diferentes trabajos donde estos organismos han sido aislados desde agua de mar hasta en muestras de invertebrados marinos y sedimentos, incluyendo los de mar profundo, que han sido encontrados como los principales hábitats de donde han sido recuperados (Gontang, *et al.* 2007).

Su clasificación según el LPSN (del inglés List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) se compone de la siguiente manera (<http://www.bacterio.cict.fr/classifsuborders.html>).

Dominio: *Bacteria*

Filo: *Actinobacteria*

Clase: *Actinobacteria*

Subclase: *Actinobacteridae*

Orden: *Actinomycetales*

Los *Actinomycetes* se encuentran dentro del grupo de bacterias anaeróbicas filamentosas y algunas desarrollan micelio, debido a esto, anteriormente se encontraban clasificadas dentro del grupo de los hongos.

La comparación de las secuencias del rRNA es una herramienta de suma importancia en la sistemática de las bacterias. Las comparaciones de las secuencias de rRNA también han sido esenciales para entender aspectos relacionados con la transferencia horizontal de genes en los microorganismos. Estos genes son altamente conservados dentro de las bacterias.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de DNA a partir de cantidades inferiores a 1µg del DNA de muestra (teóricamente a partir de una molécula de DNA). El PCR amplifica (multiplica) exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario.

Comprende ciclos divididos en tres etapas: 1) la desnaturalización, 2) la hibridación y 3) extensión del cebador. De manera general, la primera fase que es la desnaturalización se da por calor (90°C aproximadamente), a continuación la temperatura baja de modo que los extremos 3' de las hebras, separadas anteriormente, puedan ser apareadas con los oligodesoxinucleótidos perfectamente complementarios y cuya longitud sea suficiente (20 a 30 nucleótidos) para formar híbridos estables con la molécula que sirve de molde. Estos oligodesoxinucleótidos funcionan como cebadores (*primers*, del inglés), de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la polimerasa Taq (su nombre proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, de la que fue aislado por primera vez) extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos utilizando las hebras del DNA bacteriano como molde. A este proceso se llama extensión del cebador o primer. Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da origen al siguiente. Al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del ácido nucleico original. EL ciclo anterior se repite varias veces (de 25 a 30 veces en un PCR típico), sin añadir mas cantidad de enzima y usando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como plantilla. De ésta manera se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos. Existen varios factores muy importantes para el PCR: la concentración de nucleótidos, la especificidad y la longitud de los cebadores (18 y 30 bases aproximadamente) y la concentración del ion magnesio. Por sus características intrínsecas, este método es muy sensible en presencia de moléculas de DNA contaminante, por lo que se debe ser sumamente cuidadoso a lo largo del protocolo para evitar amplificaciones inespecíficas o aparición de falsos positivos (Saladrigas *et al.*,2005)

2.2 Enzimas Lipasas

Las enzimas lipasas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son producidas por un gran número de microorganismos a partir de las cuales se obtienen para fines comerciales (Gerday, 2000). Las lipasas (acilglicerolhidrolasas) catalizan la hidrólisis de uniones éster de triglicéridos a diacilglicerol, monoacilglicerol y ácidos grasos (Byong, 1966; Thomson *et al.* 1999). Actúan en la interfase entre la fase acuosa (donde la enzima es soluble) y la fase del sustrato insoluble. Por la reversidad de la acción de las lipasas, simultáneamente ocurre la síntesis e hidrólisis de los triglicéridos cuando se incuban aceites con dicha enzima, dando productos de interesterificación (Veeraragavan, 1990; Byong, 1996). Algunas lipasas son no específicas, esto quiere decir que catalizan reacciones en cualquier posición de los triacilgliceroles y otras de ellas son específicas, es decir, que catalizan reacciones únicamente en regiones determinadas de la molécula lipídica (Faber, 2000).

El interés por estas enzimas se ha caracterizado en los últimos años debido a sus diversas propiedades catalíticas, ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales; además, son comúnmente utilizadas en la industria de alimentos para modificar grasas y aceites y así mejorar sabores, en la elaboración de productos lácteos, en la maduración de quesos y elaboración de mantequilla, donde se liberan ácidos grasos de cadena corta (Badui, 2006) que contribuyen al aroma o que sirve como sustrato para reacciones secundarias, así como también en la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, productos de panadería que incrementan la firmeza y elasticidad, bebidas alcohólicas, en digestión de aceites y grasa de alimentos (Coca *et al.*, 2001); en el desarrollo de productos químicos de interés por medio de enlaces éster, polimeración e investigación del biodiesel.

La producción de actinomicetos productores de lipasas varia en un intervalo de 21.6 a 64.3% de la población total de actinomicetos en suelos (Ko *et al.*, 2005). Otros microorganismos como los hongos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum* y levaduras como *Candida* y *Torulopsis* son utilizados comercialmente en la producción de estas enzimas, pero el tipo de actividad es diferente y en ocasiones inestable. Actualmente se investigan nuevas fuentes de lipasas y esterases, que presenten una

selección tanto cuantitativa como específica, como son las lipasas provenientes de actinomicetos, debido a que tienen un metabolismo muy versátil, sin embargo, la mayoría de estudios de éste tipo se enfocaron en microorganismos de origen terrestre, como lo hemos mencionado anteriormente por accesibilidad principalmente.

La principal área de estudios de actinomicetos, sean terrestres o marinos, se basa, como se mencionó anteriormente, en la producción de metabolitos, ya sean primarios o secundarios (Demian, 2000). Se les conoce como poseedores de rutas metabólicas únicas, lo que pudiera conllevar al estudio de la producción de lipasas (Ko, *et al.*, 2005) por nuevos aislados recuperados de muestras nacionales.

2.3 Aislamiento Selectivo

El aislamiento selectivo de cualquier grupo bacteriano de muestras ambientales es una actividad sobre-evaluada, dado el empleo indiscriminado de técnicas de cultivo sustentadas únicamente en bases empíricas (Bull, 2004). Establecer nuevos métodos para el aislamiento y la caracterización de los microorganismos presentes en los ecosistemas que pudieran ser de nuestro interés, es un área en constante movimiento y que ha avanzado notablemente con la previa evaluación del área de estudio empleando técnicas moleculares.

La finalidad del presente trabajo fue identificar a nivel molecular microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de muestras de sedimentos del Golfo de México que presentaran actividad lipolítica. De esta manera, se trabajó tomando en cuenta la relevancia y amplia versatilidad de estos organismos y sus productos microbianos en aplicaciones industriales y otros estudios científicos con diferentes enfoques, como biológicos, ecológicos y evolutivos por citar algunos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizaron diferentes experimentos tanto de microbiología clásica, como son: aislamiento selectivo, cultivo y purificación de cepas así como tinciones diferenciales y actividad lipolítica de los aislados. Para la clasificación e identificación se llevaron a cabo experimentos de extracción de ADN, electroforesis horizontal, amplificación por PCR del gen ribosomal 16S rRNA, secuenciamiento y construcción de árboles filogenéticos.

3.1 Esquema general

A continuación, se presenta el esquema general de la metodología aplicada en este trabajo (figura 4).

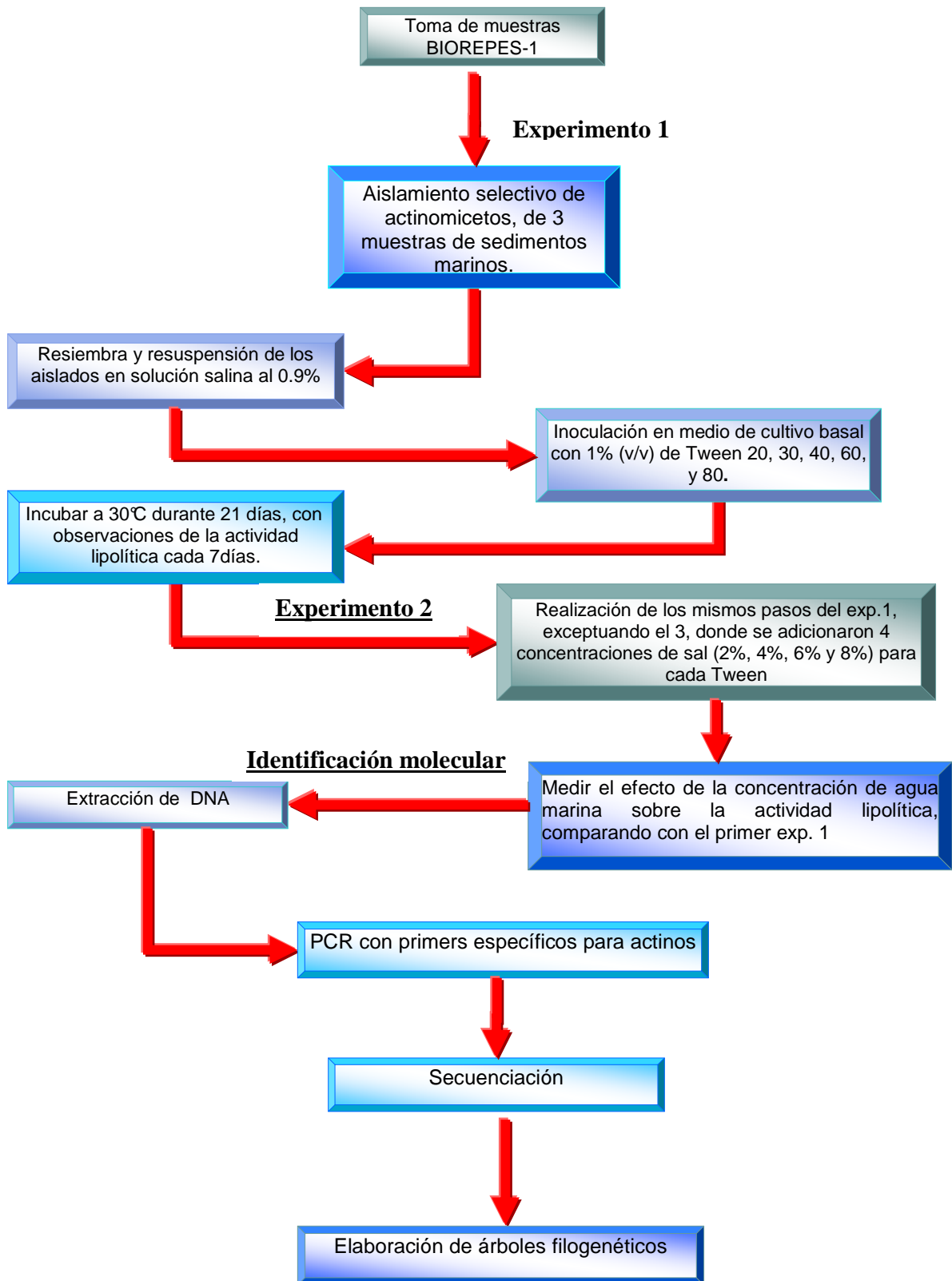


Figura 4. Diagrama de flujo general de la metodología aplicada en el desarrollo del proyecto.

3.2 Área de estudio y toma de muestras

Las muestras de sedimento se obtuvieron a bordo del B/O "Justo Sierra" propiedad de la Universidad Nacional Autónoma de México (fig.5) durante la campaña BIOREPES-1 en la zona sureste del Golfo de México. La profundidad a la que se colectó fue de 271m y el sitio de muestreo correspondió a la estación (e2) con las siguientes coordenadas (fig. 6): 23 36.41' LN, 89 40.22' LW.



Fig.5. Buque oceanográfico "Justo Sierra", perteneciente a la UNAM.

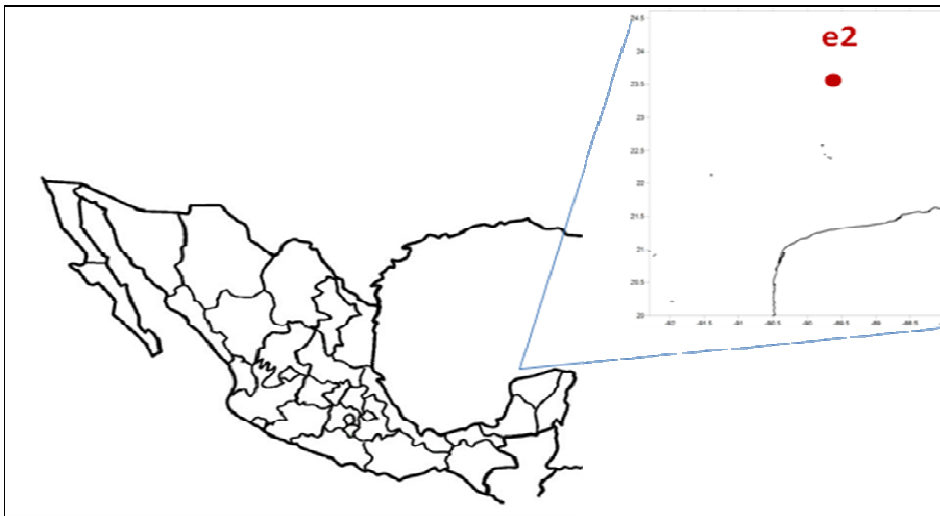


Figura 6. Visualización de la estación de estudio, localizada a partir del software Surfer .

Las muestras se colectaron de la parte superior del sedimento extraído con el nucleador de caja (fig.6). Inmediatamente se tomaron tubos estériles de 50ml, y con un movimiento en posición de un ángulo aproximado de 45° con respecto al sedimento, se introdujo el sedimento dentro; utilizando guantes de látex para evitar contaminación en la muestra (fig. 7).

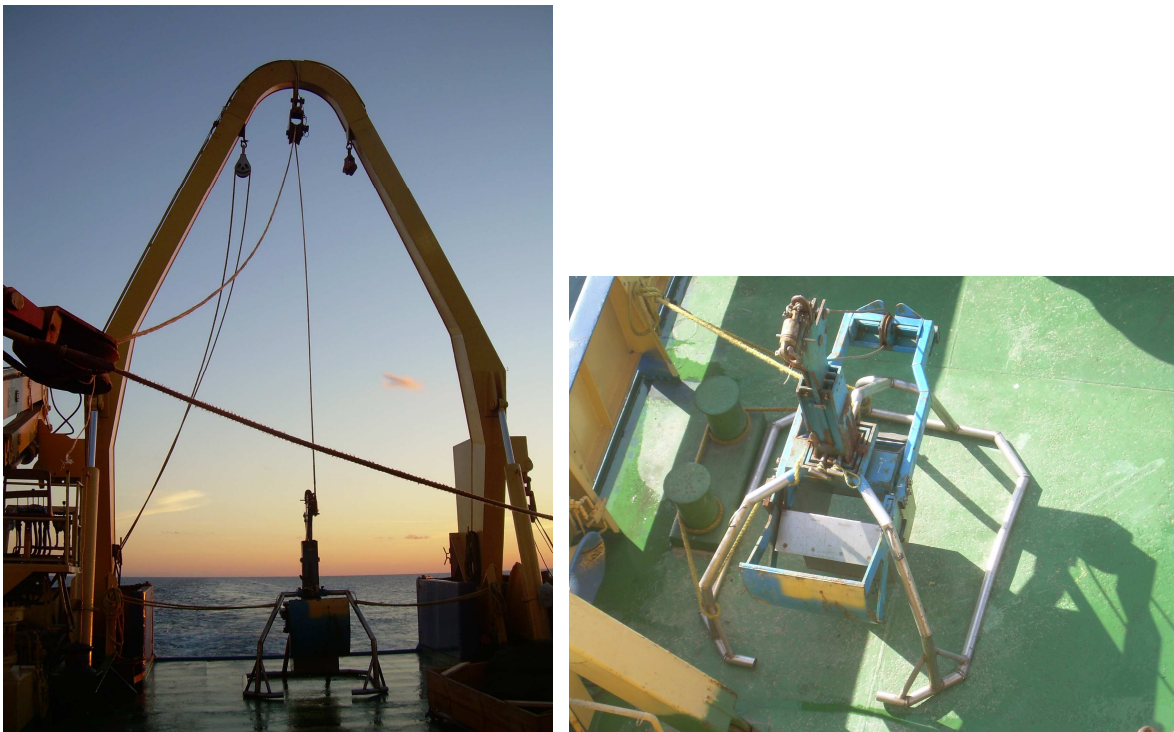


Figura 7. Nucleador de caja, vista frontal y superior.

a)



b)



Figura 8. a) Toma de muestras. b) Muestras de sedimento recién tomadas a bordo del buque oceanográfico Justo Sierra.

Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a -20°C , hasta el momento de su utilización posterior en el laboratorio.

3.3 Experimento 1. Determinación de la actividad lipolítica

1. Aislamiento selectivo de bacterias marinas

- I) Se colocó 1 g de sedimento marino en un tubo de centrifuga (Eppendorf) con capacidad de 15 ml y se adicionaron 9 ml de solución salina para lograr una suspensión de 10^{-1} . Se realizaron tres diluciones consecutivas de la suspensión, se tomó 1 ml de la suspensión 10^{-1} y se transfirió a un nuevo tubo estéril, al cual previamente, se le agregaron 9 ml de solución isotónica estéril (10^{-2}); se repitió lo anterior para obtener la dilución 10^{-3} .
- II) Teniendo las diluciones de los sedimentos; éstos se sembraron por triplicado y se dispersaron por estriado (fig.9), con ayuda de una varilla estéril, en medio de cultivo M3 un volumen de 50 μl . Se dejó incubar a 30°C durante 4 semanas.
- III) Al término del periodo de incubación se realizó la observación microscópica para tomar las colonias con crecimiento característico de actinomicetos. Posteriormente

se realizó una tinción de Gram para realizar la observación microscópica; se codificó y reportó.

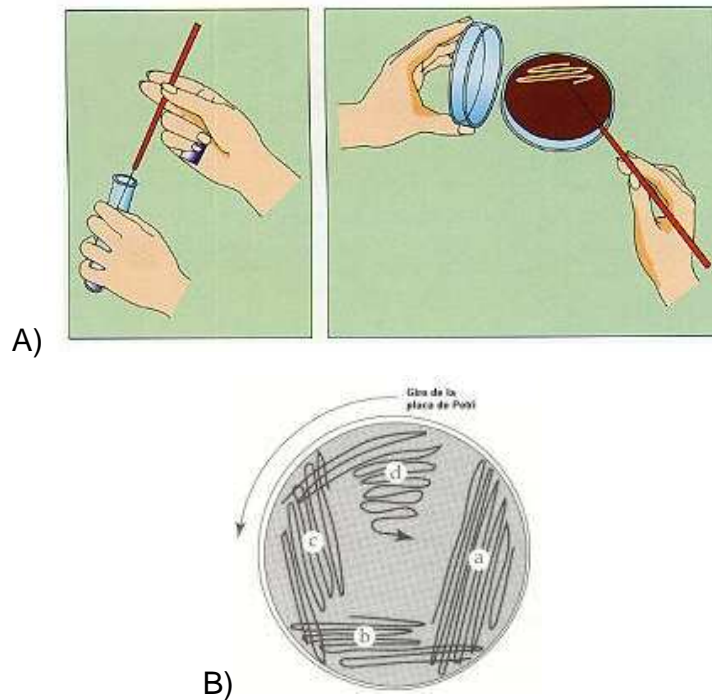


Fig. 9. A) Resiembra de colonias en medios de cultivo GYEAa y M3. B) Técnica de siembra por estría en placa.
http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap309.htm

2. Resiembra de colonias puras y resuspensión

- I) Se tomó una asada de cada una de las colonias aisladas y se resembró en medios de cultivo GYEAa, por estriado (fig.9) y posteriormente fueron incubados a 28°C durante siete días.
- II) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó un volumen de 80 µl de solución salina al 0.9% con una micro pipeta de 1000 µl en 12 tubos Eppendorf con capacidad de 1500 µl.
- III) Se tomó biomasa de cada una de las resiembras con asas bacteriológicas desechables y se resuspendió en la solución salina (fig. 10), preparada en el inciso II. Una vez resuspendidos, fueron guardados en refrigeración hasta el momento que se requirieron para ser inoculados.

3. Inoculación en medio de cultivo para observar la actividad lipolítica.

- I) Se prepararon 800 ml de un medio de cultivo basal _b suficiente para cada una de las fuentes de ácidos grasos tales como Tween 20, Tween 40, Tween 60 y Tween 80_c al 1% (v/v) (Giudice *et al.*, 2006). Una vez preparado el medio se prosiguió a esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 20 min. Posteriormente estando los medios a una temperatura aproximada entre 40-50°C se vaciaron en cajas Petri de 100 x 15 mm que se dejaron enfriar hasta solidificarse.
- II) Después de enfriado y solidificado los medios, se inocularon los microorganismos que fueron resuspendidos en el paso 2. Se utilizó una micropipeta Gilson de 20 µl, con puntas estériles se tomó un volumen de 7µl de cada microorganismo resuspendido y fueron inoculados en el medio basal que fue preparado en el inciso I, que contenía la fuente de los ácidos grasos a evaluar.
- III) Una vez inoculados los microorganismos en estudio, se dejaron incubar a 30°C por 21 días (Di Prisco *et al.*, 2006).

4. Determinación de la actividad lipolítica

- I) Las cajas Petri fueron observadas cada 7 días durante 3 semanas para determinar la actividad lipolítica de los aislados. Esta actividad se determinó por la presencia de halos o precipitación por debajo del crecimiento microbiano de acuerdo con lo descrito por Ko *et al.* (2005).
- II) Se midieron los diámetros de los halos formados y se reportaron para el posterior análisis de la actividad con cada una de las fuentes de ácidos grasos.

3.4 EXPERIMENTO 2. Efecto de la concentración de sal sobre la actividad lipolítica

Se realizaron los pasos del 2 al 4 descritos para el primer experimento, excepto en el inciso I); paso 3, con una variación que consistió en adicionar 4 concentraciones de cloruro de sodio (NaCl, J.T. BAKER, EUA). Las concentraciones que se evaluaron fueron 2, 4, 6 y 8 para cada fuente de ácidos grasos. Los incisos del paso 3 se realizaron de la misma forma en que fueron descritos previamente. Las observaciones se realizaron de la misma forma en que se llevó a cabo en el paso 4, es decir, se tomaron las lecturas del diámetro de la actividad y se reportó para observar de qué forma se vio afectada la actividad lipolítica bajo estas condiciones.

Tabla 1. Medio de cultivo GYEAa (Gordon & Mihm, 1962). Composición por cada 1000 ml.

SUSTANCIA	CANTIDAD
Glucosa (Bioxon, EUA)	10 g
Extracto de levadura (Bioxon, EUA)	10 g
Agar (Difco,EUA)	12 g
Ph	6.8

Tabla 2. Medio basal por cada 1000 M^a (Di Prisco *et al.*, 2006).

SUSTANCIA	CANTIDAD
Bacto peptona (Idg, EUA)	10 g
CaCl ₂ (Sigma-Aldrich, EUA)	0.1 g
Agar (Difco,EUA)	12 g
pH	7.4

Tabla 3. Composición de las fuentes de ácidos grasos

SUSTANCIA	COMPOSICIÓN
Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA)	Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitan Ácido láurico $\geq 40\%$ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$)
Tween 40 (Sigma-Aldrich, EUA)	Monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitan Ácido palmítico $\sim 90\%$ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$)
Tween 60 (Sigma-Aldrich, EUA)	Monoestearato de polioxietileno (20) sorbitan Ácido estearico $\sim 50\%$ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$)
Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA)	Monooleato de polioxietileno (20) sorbitan Ácido oleico $\sim 70\%$ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$)

3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

3.5.1 Extracción de DNA

1. Se prepararon y etiquetaron doce tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml para cada aislado, con 100 μg de perlas de vidrio (SIGMA, USA) y 500 μl de Búffer Glucosa-Tris-EDTA.
2. Posteriormente a cada tubo se adicionaron dos asas de biomasa fresca, con asas bacteriológicas desechables estériles (Sigma-Aldrich,EUA), y se colocó en cada uno de los tubos Eppendorf preparados en el paso (1).
3. Los tubos se mantuvieron a 4°C durante 12 horas .
4. Al término de dicho tiempo los tubos se agitaron constantemente durante 15 minutos a máxima velocidad en un Vórtex (DAIGGER, USA).
5. Los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, USA).

6. El líquido de cada tubo (400-500 μ l, aproximadamente) se transfirió a nuevos tubos Eppendorf estériles (1.5 ml). Los tubos con las perlas de vidrio y la biomasa residual se desecharon.
7. A los nuevos tubos se les adicionó Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24: 24: 1; v/v; Sigma-Aldrich, USA) en proporción 1:1 respecto al volumen de líquido transferido.
8. Los tubos con los dos componentes se mezclaron en un Vórtex a velocidad máxima durante 5 minutos.
9. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 12 minutos.
10. Se repitieron los pasos del 6 al 9.
11. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril (1.5 ml) estéril (aproximadamente 250-300 μ l).
12. Los ácidos nucleicos se precipitaron con la adición de etanol absoluto frío en una relación 2:1 (v/v).
13. Los tubos con alcohol se invirtieron suavemente 3 veces y se centrifugaron a una velocidad de 14,500 rpm por 15 minutos.
14. El líquido residual se decantó y la pastilla de DNA (formada en el fondo del tubo).
15. Se lavó la pastilla con 300 μ l de etanol al 70%, a temperatura ambiente (EtOH, Sigma-Aldrich, EUA).
16. La pastilla fue resuspendida varias veces con ayuda de la micropipeta (Gilson, 0-200 μ l) evitando que la pastilla pase por la punta.
17. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 14,500 rpm por 15 minutos.
18. Repetir los pasos 15 al 18.
19. Se descartó el sobrenadante por decantación y se invirtió cada uno de los tubos con papel absorbente de 45 a 60 minutos.
20. La reconstitución del DNA se llevó a cabo adicionando entre 80-100 μ l de búffer Tris-EDTA 1X (TE).
21. El DNA extraído se visualizó mediante una electroforesis horizontal (que se describe en detalle en el siguiente inciso) y una alícuota se conservó a -20°C hasta realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.5.2 Electroforesis horizontal

Preparación de gel de agarosa. Se disolvieron 2.5 g de agarosa en 250ml de amortiguador TBE: Tris-ácido bórico-EDTA (etil-diamino tetraacético) en un matraz Erlenmeyer. Se utilizó el horno de microondas para la disolución, poco a poco para evitar ebullición, hasta disolver completamente la agarosa y observar un líquido homogéneo, agitando constantemente. A continuación se agregó 0.75 µl de bromuro de etidio (10mg/ml) para la tinción del gel. La mezcla fue vertida sobre la cámara de electroforesis. Una vez que el gel se polimerizó (aproximadamente 30 a 45 min.) fueron retirados los peines para inmediatamente cargar las muestras.

Dentro de la cámara de electroforesis se agregó un amortiguador TBE 1X y a continuación fueron cargadas las muestras, así como el marcador (Bioline, EUA). Una vez terminada la carga, fueron conectados los electrodos a la fuente de poder (100 V, 35min.)

Preparación de las muestras para electroforesis. Se preparó aproximadamente 4µl de buffer de corrida (Bioline, USA); se añadió una gota para cada muestra en donde además del buffer se agregó 4µl de DNA resuspendido. Cada gota de la mezcla fue resuspendida un poco y cargada, cada una en un pozo del gel de agarosa. Al terminar la corrida (alrededor de 35 min.) el gel fue colocado cuidadosamente en un transluminador de luz ultravioleta para la observación y confirmación de DNA en cada muestra. Al ser confirmada la existencia de DNA en las muestras antes mencionadas, se procedió a realizar la PCR para la amplificación exclusiva del gen 16S rRNA bacteriano empleando primers específicos para la clase *Actinobacteria*.

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos para la clase *Actinobacteria*

La amplificación del gen 16S rRNA de cada muestra se realizó utilizando los cebadores (primers) ACT-F (5'-CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG-3') y ACT-R (5'-CCG TAC TCC CCA GGC GGG G-3') de acuerdo al protocolo descrito por Stach y

colaboradores (2003). La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 µl de acuerdo a lo descrito en la tabla 5.

Tabla 4. Componentes del cocktail de PCR para la realización de cada tubo.

REACTIVOS	VOLÚMEN (µL)
Buffer 10x	5
MgCl ₂	1.5
dNTPs	1.25
Primer-1 (Act-F)	0.5
Primer-2 (Act-R)	0.5
DNA	0.5
Taq polimerasa	0.15
H ₂ O	Hasta obtener un volumen final de 50

La amplificación se realizó en un Termociclador (Techne, USA), bajo el programa “*Actino*”. El producto de la PCR se observó realizando una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (100 Volts, 30 minutos) preparado de una forma idéntica al mencionado para comprobar la presencia de DNA pero sustituyendo el DNA por el producto de PCR esperado (fragmento de aproximadamente 650 pares de bases).

3.5.4 Secuenciación.

El producto de PCR fue purificado directamente utilizando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dos µg del producto de PCR purificado fue utilizado para cada reacción de secuenciamiento de acuerdo con la siguiente metodología: la secuenciación de los fragmentos de PCR fue llevado a cabo usando el ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq FS DNA Polymease (Applied Biosystems, EUA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Lo anterior se llevó a cabo en el Instituto de Biología a cargo de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, responsable de la unidad de Biología Molecular de dicho Instituto.

3.5.5 Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas en el Instituto de Biología se enviaron por correo electrónico en formato ZIP. Al descomprimirse, los archivos con las secuencias correspondientes se encontraban en formato ABI que se leyeron con el Software Chromas Lite Version 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia) y el texto correspondiente a cada secuencia se exportó en formato de Texto al procesador 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 cual permite comparar la secuencia “desconocida” contra todas aquellas presentes en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information, del inglés).

Las secuencias nucleotídicas ya en formato de texto se importaron ahora en el Software Phydit el cual permite alinear la secuencia con base en la estructura secundaria del gen ribosomal 16S rARN. De acuerdo a los resultados del BLAST, se recuperaron también las secuencias de los representantes más cercanos a partir de la base de datos NCBI. Se construyeron varios árboles filogenéticos con diferentes algoritmos; con el método del “vecino más cercano” (Neighbour-joining, del inglés; Saitou & Nei, 1987) y el método de la parsimonia (Swofford & Olsen, 1990; Swofford, *et al.*, 1996).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen evidencias importantes de los diferentes papeles que juegan las bacterias a diferentes niveles tróficos y ecológicos, entre otros. Además, el impacto en el ámbito antropogénico, y sin dejar de lado la inevitable convivencia como organismos habitantes de este planeta, los hemos insertado como parte importante en el crecimiento social y económico de nuestras civilizaciones a través de varios siglos.

De esta manera y siguiendo la línea en la importancia que conlleva el estudio de Actinomicetos en las aguas marinas mexicanas y para los fines prácticos de este trabajo, fueron logrados los objetivos generales propuestos en este estudio de identificación molecular de aislados bacterianos que mostraron alguna actividad que pudiera ser explotada de manera biotecnológica a futuro.

4.1 Experimento 1. Aislamiento selectivo de bacterias marinas.

De las muestras extraídas del Golfo de México, se lograron aislar 12 microorganismos con actividad lipolítica se evaluaron empleando ensayos rápidos; lo que muestra que los medios de cultivo contenían los nutrientes indispensables para su crecimiento. En la tabla 6 se muestran los resultados del Gram, realizado a los doce aislados en estudio, como puede observarse todos resultaron ser Gram positivos y la morfología microscópica fue de bacilos sin agrupamiento, cocos sin agrupamiento y cocos junto con bacilos. Lo que es corroborado con lo reportado en la literatura para algunos grupos de actinomicetos (Goodfellow & Maldonado, 2006).

Tabla 5. Resultados de las observaciones de la tinción de Gram.

Código del microorganismo	Tinción diferencial	Observación y descripción microscópica
16.61	Gram +	Bacilos
16.63 ^a	Gram +	Cocos sin agrupamiento
36.37	Gram+	Cocos y bacilos
Col 4 35M 310 ⁻¹	Gram+	Cocos y bacilos
35.33	Gram +	Cocos y bacilos
32a.10.14	Gram +	Cocos y bacilos
32a.10.22	Gram +	Cocos y bacilos
32.28 ^a	Gram +	Cocos y bacilos
35M 310 ⁻¹	Gram +	Cocos y bacilos
Col 4 36M 310 ⁻¹	Gram +	Bacilos
Col 1A 36M 310 ⁻¹	Gram +	Cocos y bacilos
35b.12.15	Gram +	Bacilos

Resiembra y resuspensión. Los organismos marinos aislados, después de resembrar en medios de cultivo Gea e incubados por siete días, fueron resuspendidos por separado en solución salina al 0.9% dentro de tubos Ependorff como se muestra en la figura 10.

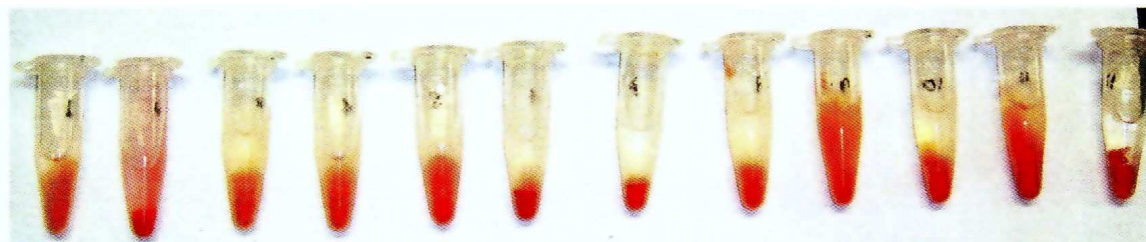


Figura 10. Microorganismos aislados en resuspensión.

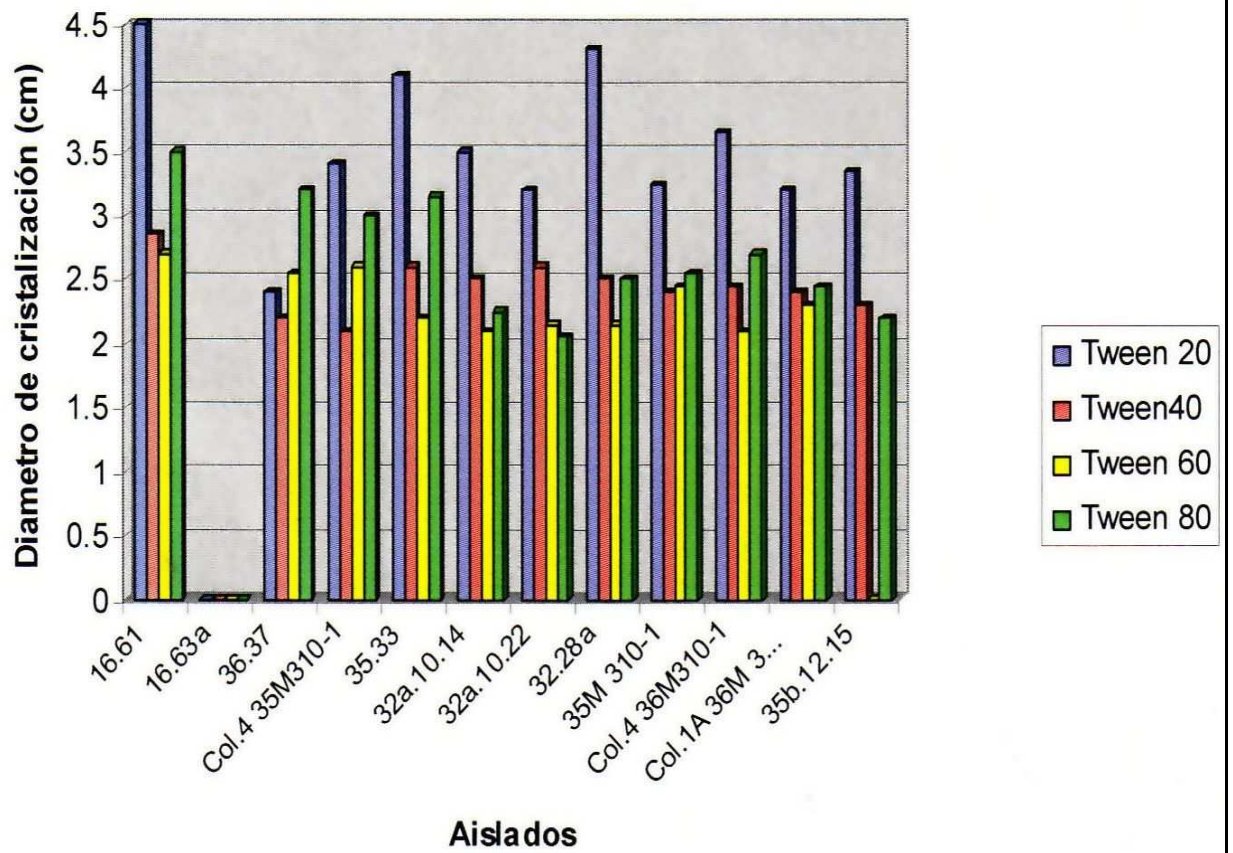
Actividad lipolítica. Para la determinación de la actividad lipolítica, se observa que alrededor del crecimiento se formó un halo con una aglomeración (o precipitado) particular que corresponde a la cristalización de los ácidos grasos como se observa en la figura 10, en donde se puede ver claramente para A, E e I la formación de dichos cristales de color blanco alrededor del crecimiento bacteriano.

A los 21 días de incubación, se registró que los microorganismos mostraron actividad para la mayoría de los tratamientos aplicados a partir del crecimiento de un halo de cristalización (Tabla 7), exceptuando el “16.63a” y al “35b.12.15” con el Tween 60. Además, el diámetro de cristalización formado, en general, fue mayor con la aplicación del Tween 20 (gráfica 1) para la mayoría de los aislados.

Tabla 6. Actividad lipolítica a los 21 días.

Código	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
16.61	+	+	+	+
16.63 ^a	-	-	-	-
36.37	+	+	+	+
Col 4 35M 310 ⁻¹	+	+	+	+
35.33	+	+	+	+
32a.10.14	+	+	+	+
32a.10.22	+	+	+	+
32.28 ^a	+	+	+	+
35M 310 ⁻¹	+	+	+	+
Col 4 36M 310 ⁻¹	+	+	+	+
Col 1A 36M 310 ⁻¹	+	+	+	+
35b.12.15	+	+	-	+

Actividad lipolítica a los 21 días de incubación



Gráfica 1. Actividad lipolítica de los aislados a los 21 días de incubación.

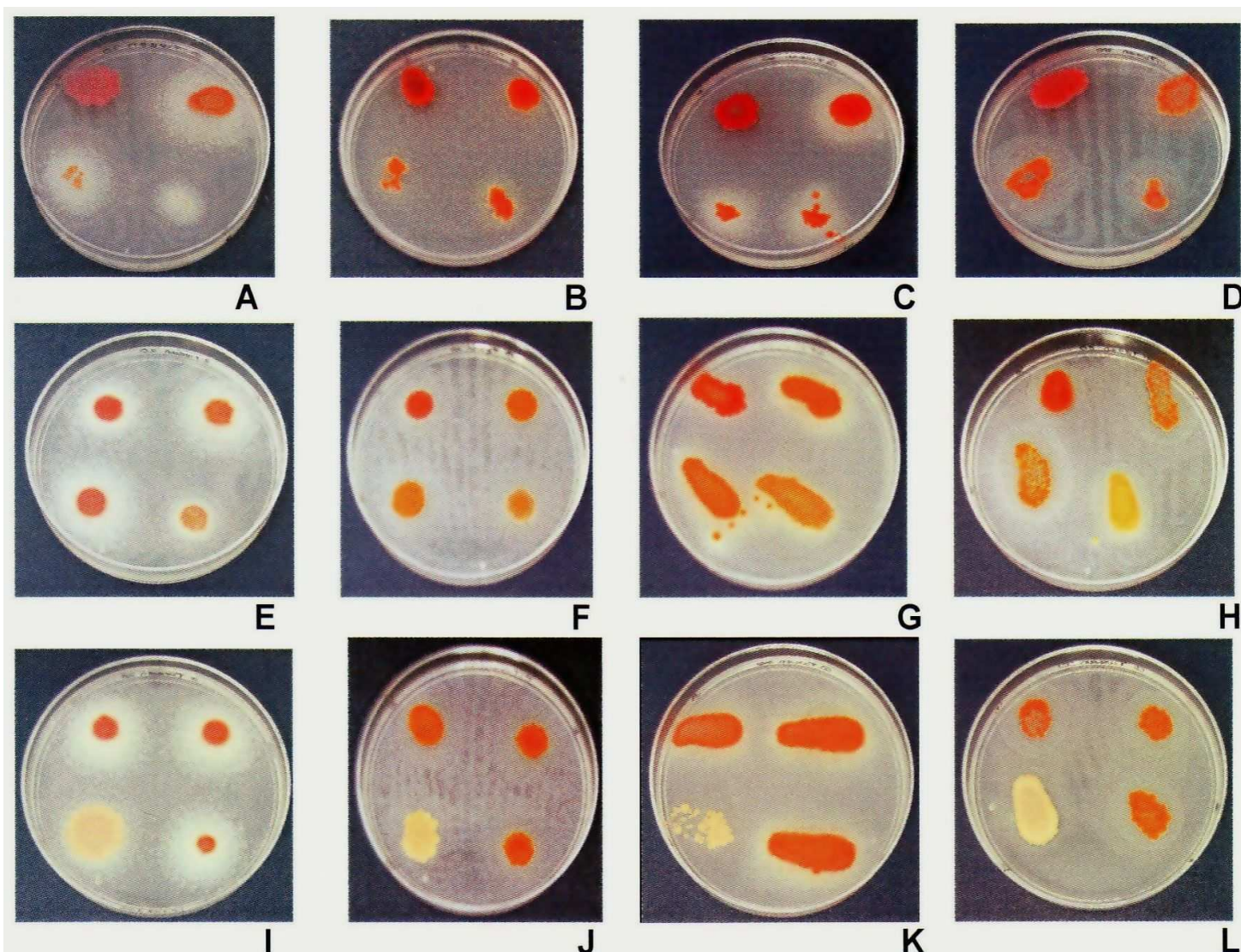


Figura 11. Actividad lipolítica que presentaron los aislados con cada una de las fuentes de ácidos grasos, a los 14 días de incubación.

Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
A) 16.63a, 16.61, col. 4 35M 310-1, 36.33	B) 16.63a, 16.61, col. 4 35M 310-1, 36.33	C) 16.63a, 16.61, col. 4 35M 310-1, 36.33	D) 16.63a, 16.61, col. 4 35M 310-1, 36.33
E) 32a.10.14, 35.33, 32.28 a, 32 a.10.22	F) 32a.10.14, 35.33, 32.28 a, 32 a.10.22	G) 32a.10.14, 35.33, 32.28 a, 32 a.10.22	H) 32a.10.14, 35.33, 32.28 a, 32 a.10.22
I) Col.4 36M310-1, 35M 310-1, 35b.12.15, Col.1A 36M 310-1	J) Col.4 36M310-1, 35M 310-1, 35b.12.15, Col.1A 36M 310-1	K) Col.4 36M310-1, 35M 310-1, 35b.12.15, Col.1A 36M 310-1	L) Col.4 36M310-1, 35M 310-1, 35b.12.15, Col.1A 36M 310-1

Los aislados tuvieron un comportamiento diferente con respecto a cada una de las fuentes de ácidos grasos. En la tabla 7, puede observarse que la mayoría de los aislados si presentan la enzima lipasa con todas las fuentes de ácidos grasos que fueron probadas a excepción del aislado con el código 16.63 el que en ninguno de los medios presentó actividad, así como también el 35b.12.15 que no mostró actividad con Tween 60, lo que podría deberse a que las fuentes de ácidos grasos que fueron utilizadas no son afines a su metabolismo.

La variación de la actividad que presentó cada microorganismo en cada una de las fuentes de ácidos grasos, se debió básicamente a la longitud de la cadena del ácido graso en mayor proporción de los Tween. Por lo tanto, los microorganismos que tuvieron mejor actividad fueron los inoculados en el medio de cultivo con Tween 20 (que contiene ácido laúrico en mayor proporción) pues consta de una cadena corta de 14 carbonos a diferencia de los Tween 40 y 60 que son cadenas de 16 y 18 carbonos, respectivamente; mientras que el Tween 80 tiene una cadena de 18 carbonos con una insaturación.

En la gráfica 7 se muestra la actividad que tuvieron los aislados con las fuentes de ácidos grasos a los 21 días de haberse incubado. Se puede observar que la mayoría de los aislados tuvieron mayor actividad con Tween 20 y Tween 80 que con los demás Tweens, por lo que podemos suponer que la actividad enzimática es mayor cuando la cadena hidrocarbonada del ácido graso es más pequeña o bien si ésta presenta insaturaciones.

4.2 EXPERIMENTO 2. Efecto de la concentración de sal sobre la actividad lipolítica.

En el segundo experimento se observó el efecto que tuvo la concentración de sal sobre la actividad de los aislados, existiendo mucha variación para cada una de las fuentes.

Dentro de las siguientes tablas se muestran dos características, concentraciones de sal y tiempo en tres fases, 7,14 y 21 días, a las cuales fueron sometidos los microorganismos

estudiados. Partiendo de la concentración al 2%, en la tabla 7 se distingue, que la mayoría de los aislados se definieron mejor a partir de los 14 días con la aplicación del tween 20 (fig. 12A), 40 y 60; en el caso contrario, para el tween 80, se observó crecimiento en todas las fases de los tres tratamientos solo en los organismos con la numeración 6 y 7.

Tabla 7. Efecto de la concentración de NaCl al 2% sobre la actividad lipolítica

Número	Clave	7 días				14 días				21 días			
		Tween				Tween				Tween			
		20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
1)	16.61	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
2)	16.63 ^a	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
3)	36.37	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
4)	Col.4 35M310-1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
5)	35.33	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
6)	32a.10.14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7)	32a.10.22	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8)	32.28 ^a	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
9)	35M 310-1	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
10)	Col.4 36M310-1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
11)	Col.1A 36M310-1	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
12)	35b.12.15	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Tabla 8. Efecto de la concentración de NaCl al 4% sobre la actividad lipolítica

	7 días				14 días				21 días			
	Tween				Tween				Tween			
4% NaCl	20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
16.61	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
16.63 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
36.37	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Col.4 35M310-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
35.33	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
32a.10.14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32a.10.22	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
32.28 ^a	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
35M 310-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Col.4 36M310-1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Col.1A 36M310-1	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
35b.12.15	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Para el caso de la concentración de NaCl al 4%, se notó un retraso en el crecimiento de los aislados en tratamiento con el tween 20 en la primera fase, para tween 80 el crecimiento aumentó en la observación del día 14 (tabla 8).

Tabla 9. Efecto de la concentración de NaCl al 6% sobre la actividad lipolítica

	7 días				14 días				21 días			
	Tween				Tween				Tween			
6% NaCl	20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
16.61	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
16.63 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36.37	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Col.4 35M310-1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
35.33	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
32a.10.14	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+
32a.10.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
32.28 ^a	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
35M 310-1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Col.4 36M310-1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Col.1A 36M310-1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
35b.12.15	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

En la prueba con 6% de NaCl, se distinguió un aminoramiento en el crecimiento para los tween 20, 40 y 60. Para el tween 80, el crecimiento aumentó, excepto para la cepa con la clave 35b.12.15 (tabla 9).

Tabla 10. Efecto de la concentración de NaCl al 8% sobre la actividad lipolítica

	7 días				14 días				21 días			
	Tween				Tween				Tween			
8% NaCl	20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
16.61	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
16.63 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36.37	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Col.4 35M310-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
35.33	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
32a.10.14	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
32a.10.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.28 ^a	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
35M 310-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Col.4 36M310-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Col.1A 36M310-1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
35b.12.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La prueba al 8% de NaCl (tabla 10), respondió con una merma semejante a la anterior, esta vez incluyendo al tratamiento con tween 80 (algunas excepciones fueron los microorganismos con las claves 16.61 en la última fase y 35.33 en la primera fase, ambos con el tween 20). Un ejemplo que compara la disminución del crecimiento de la primera a la última prueba con el Tween 20 se nota en la figura 12.



Figura 12. a) Actividad lipolítica con Tween 20 al 2% de NaCl; b) Actividad lipolítica con Tween 20 al 8% de NaCl.

A una concentración de 4% la actividad lipolítica disminuye, pues a los 7 días no se apreciaba el halo característico de la actividad (Tabla 8). Sin embargo a los 14 días comenzó a definirse mejor y se mantuvo así hasta los 21 días. A una concentración de 6 y 8% (tablas 9 y 10) el crecimiento de los aislados se vio afectado drásticamente, por lo que casi no se apreciaba el halo característico a los 7 días, además de que la coloración que producen los microorganismos al crecer no fue detectada. Al llegar al día 21 el crecimiento fue regular y si se observó actividad lipolítica, sin embargo el diámetro del halo era menor. Seguramente la producción enzimática fue proporcional al desarrollo del microorganismo, ya que en la figura 11 se pueden observar las diferencias entre los aislados al 2 y al 8%.

De acuerdo a lo realizado y analizado en el presente trabajo, se puede asumir que la concentración de sal es un factor determinante en la actividad lipolítica, sobre todo que los aislados con los que se trabajó muestran además un cierto grado de tolerancia a la sal aunque estudios mas profundos deberían ser realizados para establecer si los microorganismos son dependientes de agua marina para su crecimiento.

El crecimiento favorable de estas bacterias en ciertas concentraciones de agua salina, nos habla de las adaptaciones especializadas en su metabolismo para su extenso desarrollo en ambientes marinos, éstas pueden ser de interés en áreas de investigación como evolución, taxonomía, fisiología, aplicación en la industria, entre otras.

4.3 FILOGENIAS

En lo que se refiere a los datos arrojados del estudio filogenético, con base en la secuencia del gen 16s rRNA, que se realizó tanto con datos de secuencias obtenidas del NCBI, como con las secuencias de los aislados del Golfo de México; se puede deducir que las cepas con las que se trabajó corresponden a tres grandes géneros que son *Gordonia*, *Dietzia* y *Arthrobacter*. A partir de éstos se realizó una búsqueda minuciosa para cada género en la base de datos GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) de la página web de bases de datos de libre acceso NCBI (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information). Se compilaron todas aquellas secuencias que estuvieran presentes en la base de datos de GenBank para la construcción de los árboles filogenéticos correspondientes. De ésta manera se obtuvo una base de datos con las secuencias de las cepas representantes de cada uno de los géneros encontrados.

A continuación se muestran, en recuadros, las relaciones filogenéticas entre las secuencias del gen 16rRNA de los aislados del Golfo de México (fig. 13 y 14) y los géneros *Arthrobacter*, *Dietzia* y *Gordonia*.

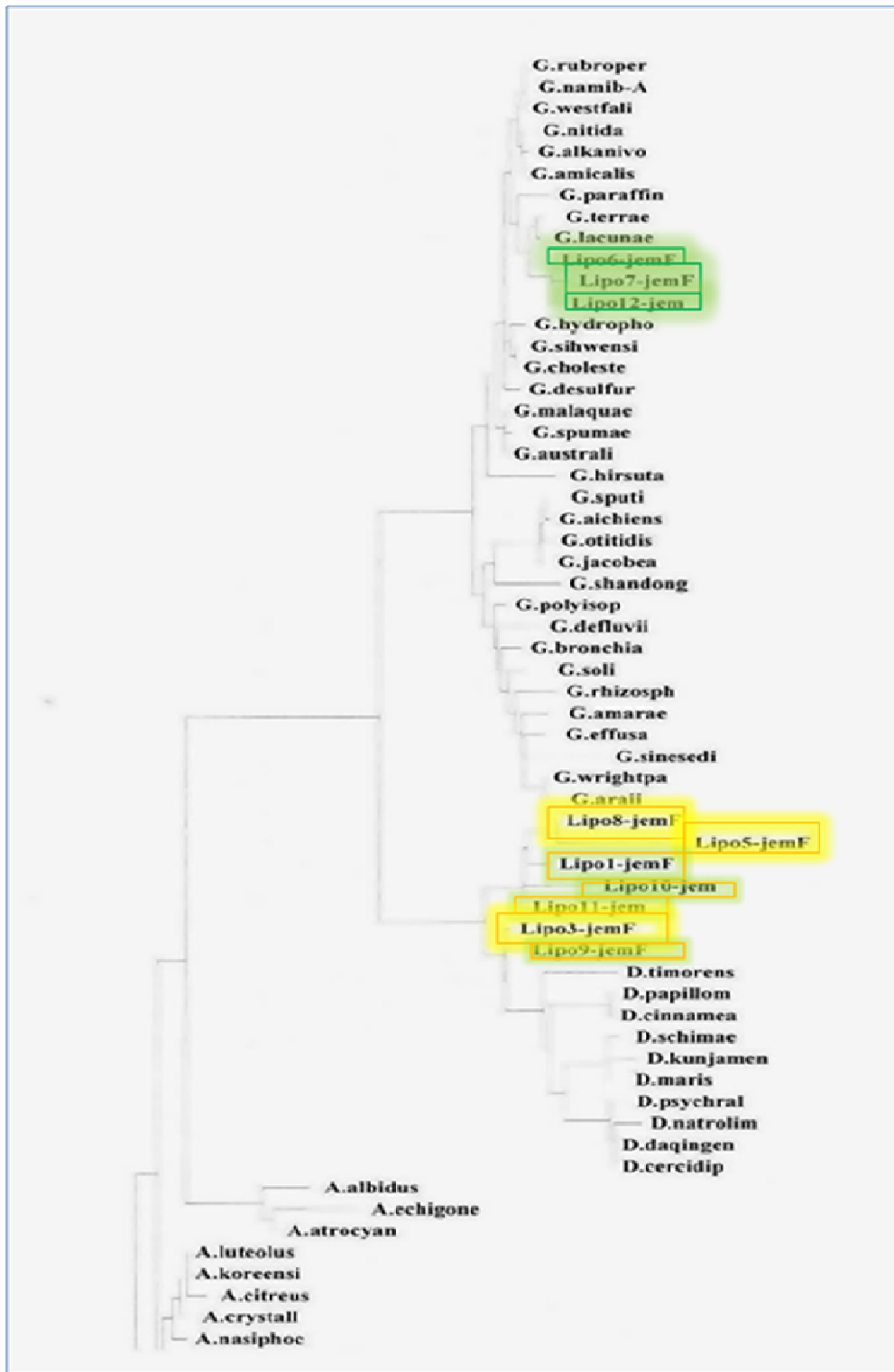


Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16rRNA comparando los aislados del Golfo de México con especies ya descritas tomadas de NCBI de los géneros *Gordonia* y *Dietzia*.

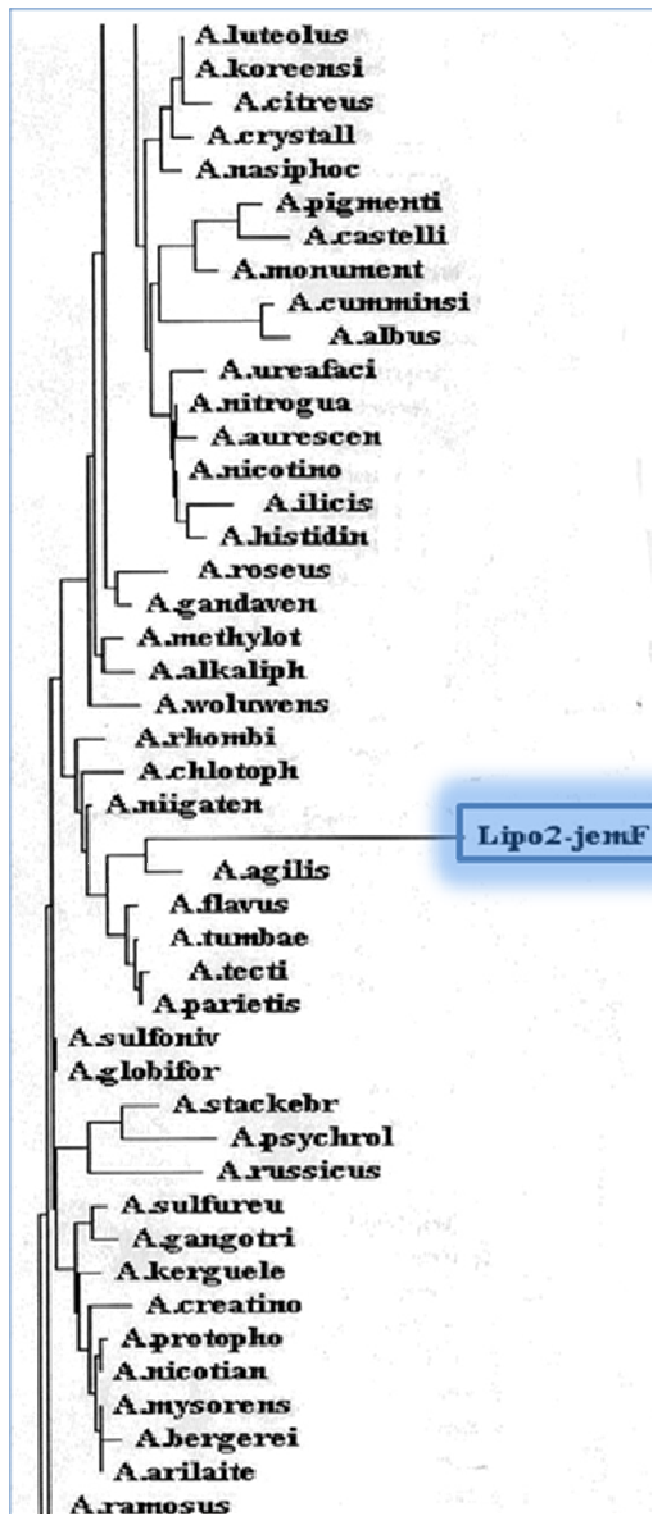


Figura 14. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16rRNA comparando los aislados del Golfo de México con especies ya descritas tomadas de NCBI del genero Arthrobacter.

Los resultados del primer árbol (fig. 13), arrojaron que los microorganismos nombrados como Lipo6-jemF, Lipo7-jemF y lipo12-jem, correspondientes a las claves 32a.10.14; 32a.10.22 y 35b.12.15 respectivamente, se encuentran muy cercanamente relacionadas (en el mismo bloque) formando parte de las *Gordonias*. El siguiente grupo lo integran miembros de la clase *Dietzia*, dentro de la cual se observan los microorganismos marinos Lipo8-jemF, Lipo5-jemF, Lipo1-jemF, Lipo10-jem, Lipo11-jem, Lipo3-jemF, Lipo9-jemF, con claves 16.61; Col 4 35M 310-1; 35.33; 32.28a; 35M 310-1; Col 4 36M 310-1 y Col 1A 36M 310; respectivamente. En el árbol filogenético de la figura 14 muestra a Lipo2-jemF, con la clave 16.63^a, mas alejada de las anteriores dentro del género *Arthrobacter*. La secuencia del aislado Lipo-4 se descartó ya que no fue posible alinearla con la de las otras. Esto propone 11 probables especies nuevas, que pudieran ser estudiadas más a fondo y nombradas como nuevos potenciales taxa en trabajos posteriores.

Basadas en la secuenciación del gen 16s rRNA se han logrado identificar miembros de los géneros *Gordonia*, *Dietzia* y *Arthrobacter*. Entre los miembros de estos géneros, *Gordonia* es de los más estudiados, aunque la mayoría pertenecen a ecosistemas terrestres, entre los que se encuentran trabajos de detección molecular, filogenias, diversidad metabólica de gran importancia en biotecnología, desarrollo de patentes y en la industria, entre otras. De igual forma para los géneros *Arthrobacter* y *Dietzia* los estudios han sido realizados en ambientes terrestres, entre los que destacan los de metabolismo anaeróbico (Ludwig, 2003) lo que nos habla de la relación con organismos marinos ya que también fueron hallados en condiciones anaeróbicas. Lo anterior, refuerza la importancia de éste trabajo debido a que no existen de éste tipo de estudios en los ecosistemas marinos y en específico son pioneros en nuestros mares mexicanos. Pasadas y futuras investigaciones se han visto y pueden verse restringidas por diversas limitaciones, tales como la detección de técnicas para su aislamiento, diseño de nuevos primers específicos para la detección de especies del género (Shen, 2005), entre otras, por lo que nuevas investigaciones en estas áreas tendrían una gran importancia biotecnológica.

La mayor parte de trabajos realizados en ambientes marinos se encuentran alrededor de los grupos *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Maldonado, et al, 2005), por lo que los resultados aquí mostrados fortalecen a la diversidad y al vasto ecosistema bacteriano nacional que aún tenemos por estudiar y mas aún por explorar.

5. CONCLUSIONES

- Se lograron aislar y reconocer actinobacterias de sedimentos obtenidos del Golfo de México.
- Se estableció la actividad lipolítica de 12 actinobacterias aisladas.
- Se realizó una medición cualitativa sobre el efecto que tienen diferentes concentraciones de agua salina, observando que existen diversos intervalos de tolerancia, respecto a la concentración de NaCl, sobre la actividad lipolítica.
- La secuenciación mostró que nuestros aislados se encontraron dentro de los géneros *Gordonia*, *Dietzia* y *Arthrobacter*.
- Los árboles filogenéticos correspondientes sugieren que los aislados tal vez constituyen nuevas especies microbianas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Badui D.S. 2006. Química de los alimentos. 3era ed. Editorial Prentice Hall. México págs. 213-215.
2. Bode H. B. & Müller R. 2005. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angewandte Chemie*. 14:6828-6846.
3. Bolívar F. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Editorial Colegio Nacional, pp. 718.
4. Bull, T.A., Ward, C.A. & Goodfellow, M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular biology review* 64: 1366-1376.
5. Bull, A.T. 2004. *Microbial Diversity and Bioprospecting*, ASM Press, Washington, DC. pp. 1-496.
6. Byong H. 1996. Fundamentos de Biotecnología de los alimentos. Editor Acribia, España Zaragoza, pp 14-15,330-331,257.
7. Coca J. Hernández O., Berrio R., Martínez S., Díaz E. & Dustet J. 2001. Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus nigersi* y *A. fumigatus*. *Biotecnología aplicada*. pp. 18,216-220.
8. Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K. & Bull, A.T. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 27-40.
9. Curtis, H., Barnes,S., Schnek, A. & Massarini, A. 2007. *Biología*. 7ªed. editorial Panamericana. Pp. 520-530.
10. De Fountaubert, A.C. & Downes, D. R. 1996. Biodiversity in the Seas: Conservation and Sustainable Use Through International Cooperation, CIEL Brief No. 4.

11. Demian, L.A. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, 18: 499-514.
12. Di Prisco, G., Michaud, L., Fani, R., De Domenico, M., De Pascale, D., Lo Giudice, A. & Bruni, V. 2006. Lipolytic activity of Antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Journal of Applied Microbiology*. 101: 1039-1048.
13. Downes, D. & De Fountaubert, C. 1996. Biodiversidad en los mares: conservación y su uso sostenible a través de la cooperación internacional. Center for International Environmental Law. CIEL BRIEF.
14. Eschbach, M., Möbitz, H., Rompf, A. and Jahn, D. 2006. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiology letters*. 227: 227-230.
15. Faber K. 2000. *Biotransformation in organic chemistry*. 4th ed. Springer Berlin / Heidelberg. University of Otago.
16. 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, A. & Feller, G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trens Biotechnol.* 18: 103-107.
17. 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.
18. Goodfellow, M. & Maldonado, L.A. 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. En Dworkin, M. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds). *The prokaryotes. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer New York., 843-888.

19. Gordon, R.E. & Mihm, J.M. 1962. The type species of the genus *Nocardia*. J. gen. Microbiology. 27: 1-10.
20. Gracia, A. 2001. Biotecnología marina y acuicultura, en Bolívar-Zapata, F. (editor), Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades, México, SEP/Conacyt.
21. Gracia, A., Gío, R. & Gaytán, A. 2007. El agua marina. Ciencia, 58.No.3,52.
22. Hunter-Cevera J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*. 1:278-285.
23. Kennish J. M. 2001. Practical handbook of marine science. CRC Press. New Jersey, USA. Pp. 440-444.
24. Ko. W. H., I.T. Wang, I. T. & Ann, P. J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37. 596-599.
25. Ludwig, J., Blencke, H., Mader, U., Hecker, M., Stulke, J. 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering*. 5:133-149.
26. Madigan M. T. & Martinko J. M. 2006. Brock Biology of microorganisms. 11th Ed. Pearson Prentice Hall, USA. Pp. 88-94.
27. Maldonado L. A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:1759-1766.
28. Maldonado L. A., Stach J. E., Pathom-aree W., Ward A. C., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87:11-18.

29. Maldonado L. A. 2007. El 70% de los antibióticos comerciales provienen de un solo grupo bacteriano. Boletín UNAM-DGCS-469 Ciudad universitaria.
Localizado en red: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2007_469.html
30. Munn, C.B. 2004. Marine Microbiology. Ecology and Applications. BIOS Scientific Publishers, USA. Pp. 3-13.
31. Okazaki, T. & Okami, Y. 1972. Studies on marine microorganisms. II. Actinomicetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. *Journal of Antibiotics*. 25: 461- 466.
32. Report of a Workshop held at Michigan State University. 2003. Priorities for Microbial Biodiversity Research. Summary and Recommendations. Center for Microbial Ecology. USA.
33. Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4): 406-25.
34. Saladrigas, M.V., Claros, M.G. & González, D. 2005. Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular. Panacea. pp. 263.
35. Shen, F.T. & Young, C.C. 2005. Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus *Gordonia* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *FEMS Microbiology letters*. 250: 221-227.
36. Sleight, M.A. 1987. *Microbes in the sea*. Ellis Horwood Limited Publishers. Pp 12-14.
37. Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch 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 of the United States of America*. 32:12115-12120.

38. Stackebrandt , E., Rainey , FA. & Ward-Rainey NL. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Microbiology* . 47: 479–491.
39. Swofford, D.L. & Olsen, G.J. 1990. Phylogenetic reconstruction. In *Molecular Systematics*, pp. 411-501. Hillis, D & Moritz, C. (Eds). Sinauer Associates, Sunderland.
40. Swofford, D.L., Olsen, G.J., Wadell, P.J. & Hillis, D.M. 1996. Phylogenetic reconstruction. In, *Molecular Systematics*, Hillis, D & Moritz, C. (Eds). Sinauer Associates, Sunderland. pp. 411-501.
41. Thomson CA., Delaquis PJ. & Mazza G. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Critical Review. Food Science and Nutrition* 39; 165-187.
42. Veeraragavan K. 1990. A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Analytical Biochemistry* 183; 301-305.
43. Vickers, J.C., Williams S.T. & Ross, G.W. 1984. A taxonomy approach to selective isolation of streptomycetes from soil. In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F., y Yakoleff, V. (eds), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press, London. Pp 553-551.
44. Wood, S. A., Kirby, B.M., Goodwin, C. M., Le Roes, M. & Meyers, P.R. 2006. PCR Screening Reveals Unexpected Antibiotic Biosynthetic Potential In *Amycolatopsis* sp. Strain UM16. *Journal of Applied Microbiology*. 102; 245-253.
45. Zhi, XY., Li, WJ. & Stackebrandt, 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.

8. MESOGRAFÍA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

<http://www.mcx.es/turismo/infopais/mexico/Mexico.html#A.-%20Dat>

<http://www.elbalero.gob.mx/explora/html/atlas/marpatri.html>

<http://www.bacterio.cict.fr/classifsuborders.html>

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/141/img/141_56.gif

<http://www.cme.msu.edu/PUBLICATIONS/BIODIVERSITY/biodiversity.report.htm/>

http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap309.htm