



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA
EN AISLADOS DEL GÉNERO *Micromonospora***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:
EDUARDO GILES VELÁZQUEZ**



MÉXICO, D.F.

2014



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: ROSALBA ESQUIVEL COTE

SECRETARIO: Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

2do. SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana. Ciudad Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

SUSTENTANTE: EDUARDO GILES VELÁZQUEZ

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Biodiversidad microbiana marina	2
1.2. Clase <i>Actinobacteria</i>	4
1.2.1. Morfología.....	6
1.2.2. Estructura	7
1.3. Género <i>Micromonospora</i>	8
1.3.1. Morfología.....	9
1.3.2. Estructura	10
1.4. Enzimas	11
1.4.1. Hidrolasas.....	12
1.4.1.1. Lipasas	13
1.4.1.2. Esterasas.....	18
1.5. Efecto de la concentración de sales en el crecimiento bacteriano	20
1.6. Efecto de la concentración de sales sobre la actividad lipolítica	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo General	24
3.2. Objetivos particulares.....	24
4. HIPÓTESIS	25
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
5.1. Aislamiento Microbiano	27
5.2. Resiembra y resuspensión	27
5.3. Evaluación de la actividad lipolítica.....	28
5.3.1. Inoculación en medio sólido	28

5.3.2 Determinación de la actividad lipolítica.....	29
5.4. Efecto de la concentración de NaCl y SM en el crecimiento de los aislados	29
5.4.1. Curva de tolerancia.....	29
5.4.2. Determinación del crecimiento de los aislados.....	30
5.5. Efecto de la concentración de NaCl y SM en la actividad lipolítica.....	31
5.5.1. Experimento 1	31
5.5.2. Experimento 2	31
5.5.3. Determinación del crecimiento y de la actividad lipolítica	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Experimento 1: Evaluación de la actividad lipolítica	32
6.1.1. Selección de aislados y ácidos grasos.	37
6.2. Experimento 2: Curvas de tolerancia	39
6.2.1. Selección de concentraciones de NaCl y SM.....	45
6.3. Experimento 3: Efecto de la concentración de NaCl y SM en la actividad lipolítica	45
6.3.1. Experimento A.....	46
6.3.2. Experimento B.....	47
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
7.1. Evaluación de la actividad lipolítica.....	52
7.2. Evaluación del crecimiento de los aislados sometidos a estrés salino.....	55
7.3. Efecto de la concentración de sales sobre la actividad lipolítica	58
8. CONCLUSIONES	62
9. PERSPECTIVAS	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	65
11. APÉNDICE	77

RESUMEN

La clase *Actinobacteria* comprende un grupo amplio de bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina (G) y Citocina (C). En años recientes un gran número de nuevas especies y géneros de ésta clase han sido aislados de ecosistemas marinos por lo que este ambiente es definitivamente una fuente rica de estos microorganismos, como ejemplo claro es el caso del género *Micromonospora*; quimiorganótrofo, aerobio y, como el resto de la clase *Actinobacteria*, se caracteriza por tener un alto contenido de G + C en su genoma. Entre las características distintivas de este género se encuentran la producción de hifas septadas y la formación de esporas individuales. Este grupo es reconocido por su capacidad innata para la síntesis de metabolitos secundarios, pero es también reconocida su capacidad para la síntesis de enzimas con actividad catalítica útil en distintas industrias. Dentro de este ámbito, no hay estudios acerca de la actividad lipolítica en aislados del género *Micromonospora* por lo que el presente trabajo evaluó aislados recuperados del Golfo de California para establecer cómo ésta actividad -en caso de que se presentara- pudiera verse afectada por factores tales como la salinidad del medio de cultivo. En este trabajo, se evaluó la influencia de la concentración de NaCl y sal marina (SM) sobre la actividad lipolítica de 30 aislados del género *Micromonospora* y se estableció una tendencia de esta actividad al ser evaluada frente a diferentes ácidos grasos (Tweens 20, 40, 60, 80 y 85). Los resultados mostraron que los aislados pertenecientes a este género son capaces de generar enzimas lipolíticas, bajo diferentes factores de composición del medio de cultivo. Se reportó que las concentraciones de sales afectan directamente el crecimiento de los microorganismos, sin embargo estos aislados presentan un mejor crecimiento al ser sometidos a cierto grado de estrés salino, en especial si tienen nutrimentos. Se encontró que la actividad lipolítica fue muy variable en cada aislado y no está relacionada con el origen, con la especie o con el género de estudio.

Palabras clave: *Actinobacteria*, *Micromonospora*, actividad lipolítica

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biodiversidad microbiana marina

Avances recientes muestran que los microorganismos son el grupo biológico más importante en el planeta en términos filogenéticos y de diversidad funcional. Estudios basados en el análisis de la secuencia 16S ribosomal, el árbol filogenético muestra que existen tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eucarya (Woese *et al.*, 1990). Estos dominios juegan colectivamente un papel significativo en el medio ambiente marino (Das *et al.*, 2006).

El mundo marino constituye un extraordinario reservorio microbiano aunque representa una fuente poco estudiada. Existen reportes en donde se describe que entre el 90% y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos lo que establece un punto de gran importancia si recordamos que los mares y océanos cubren más del 70% de la superficie terrestre (Sogin *et al.*, 2006).

Hasta hace varios años, el aislamiento de nuevos microorganismos estuvo orientado hacia aquellos provenientes de ecosistemas en su mayoría terrestres. Sin embargo, de los últimos 10 años a la fecha el descubrimiento de nuevos microorganismos también se ha ido orientando hacia el estudio de ambientes inusuales o con condiciones poco comunes. En este sentido el aislar especies microbianas metabólicamente adaptadas a un ecosistema diferente realza la importancia de estudio de nuevas áreas microbiológicas tales como la microbiología marina y molecular, así como la diversidad microbiana en ecosistemas específicos o muy particulares (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2009).

El medio marino se caracteriza por tener parámetros hostiles para el ser humano como alta presión y salinidad, baja temperatura, ausencia de luz, etc, Existen bacterias heterótrofas marinas que tuvieron que adaptarse para sobrevivir

en este entorno, un ejemplo es el requerimientos de Na^+ para el crecimiento, ya que es esencial para mantener el medio ambiente osmótico y para la protección de la integridad celular (González & Peña, 2002).

Los microorganismos heterótrofos son los agentes principales que conforman la composición orgánica del océano. Estas bacterias heterótrofas comprenden la mayor parte de las poblaciones microbianas que habitan la columna de agua de los océanos y son responsables de gran parte de la transformación biológica de la materia orgánica y la producción de dióxido de carbono. Las bacterias no sólo mantienen la naturaleza prístina del medio ambiente, sino que también sirven como mediadores biológicos a través de su participación en los procesos biogeoquímicos (Das *et al.*, 2006).

Se estima que entre el 90 y 99% de los microorganismos marinos no pueden ser cultivados bajo condiciones estándar de laboratorio y por lo tanto, su crecimiento y fisiología no pueden ser estudiados en la forma que comúnmente se hace. Así mismo se sugiere, mediante estudios con técnicas moleculares, que la biodiversidad alcanza los 3.6×10^{29} células microbianas/mL en los océanos (Sogin *et al.*, 2006). Por esta razón, debe considerarse que las técnicas tradicionales de muestreo y subsecuente cultivo deben ser constantemente actualizadas para así proporcionar nueva información con respecto a la diversidad de los microorganismos que existen en muestras ambientales del planeta.

La enorme diversidad microbiana también da lugar a una cantidad sin explotar de información genética, compuestos bioactivos y biomateriales que podría ofrecer importantes beneficios y aplicaciones utilizables en la biotecnología capaces de producir una gran cantidad de compuestos para su uso en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Sijtsma & Swaaf, 2003). Así mismo, algunas de las bacterias aisladas del ambiente marino muestran la capacidad de degradar hidrocarburos, lípidos y ésteres (Li & Quin, 2005; Yakimov *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de la clara importancia de estos organismos marinos y las

oportunidades que brindan, actualmente se sabe muy poco sobre la microbiota marina y sus funciones e interacciones ecológicas.

1.2. Clase *Actinobacteria*

La clase *Actinobacteria* comprende un amplio grupo de bacterias Gram positivas cuya composición de bases de ADN es de 63% a 78% guanina más citosina (G + C), encontrándose en el extremo superior de este límite con el porcentaje de G + C más alto que cualquier otro grupo bacteriano. La mayoría de estos organismos son aerobios (oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (fermentativos) (Logan, 1994). Las actinobacterias (antes llamadas “actinomicetos”) comprenden al grupo *Corineforme* y al orden de los *Actinomycetales* (Zhi *et al.*, 2009).

El origen de la palabra “actinomiceto” tiene una larga historia taxonómicamente confusa. Su origen proviene de los siguientes vocablos griegos: actino “rayo, haz” y myces “hongo”, por lo que una definición estricta sería “hongo radiado”. La primera clasificación formal de este vasto grupo de microorganismos la realizaron Waksman y Henrici (1943), al considerar dichos microorganismos como un “puente evolutivo entre bacterias y hongos”, aunque estudios basados en la composición química de su pared celular y secuencias del gen 16S ribosomal ahora los sitúan como un grupo distinto a los firmicutes o bacterias Gram positivas de bajo contenido de G + C (Madigan *et al.*, 2009). Fue precisamente la conjunción de los estudios mencionados que permitieron a Stackbrandt *et al.*, (1997) proponer la clase *Actinobacteria* (Figura 1).

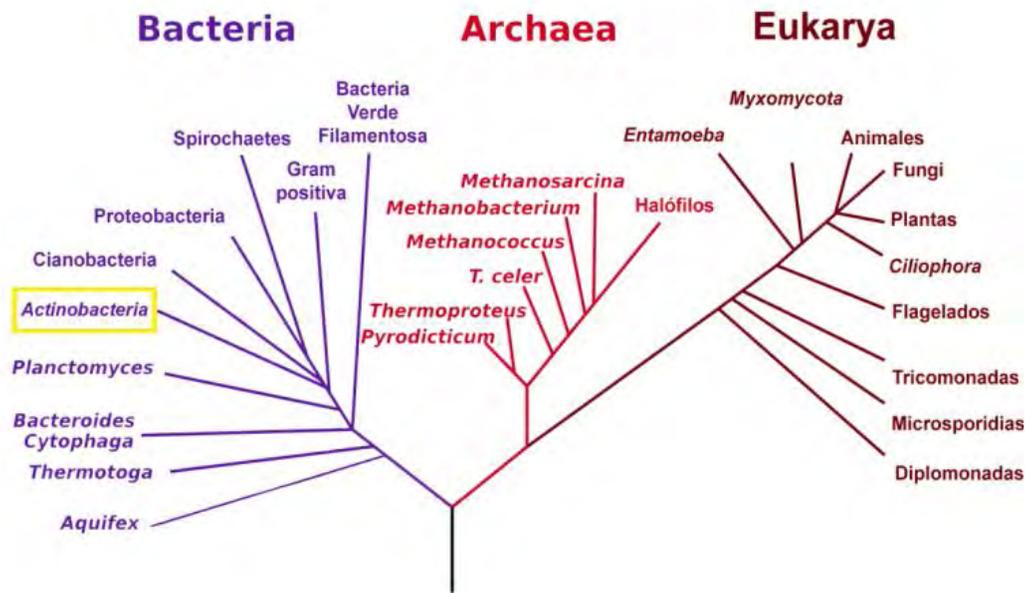


Figura 1. Árbol filogenético de los seres vivos (visión global) mostrando la posición de la clase *Actinobacteria* (Zurita, 2012).

La clase *Actinobacteria* tiene un gran valor biotecnológico ya que son los responsables de la producción de la mitad de muchos de los metabolitos secundarios encontrados (Lam, 2006). Entre los metabolitos secundarios que pueden llegar a producir se encuentran antibióticos, antitumorales, inmunosupresivos y 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).

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*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Streptosporangium* y *Williamsia* (Chen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005; Gontag *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 (Sogin *et al.*, 2006). Desafortunadamente, se sabe poco acerca de la diversidad de las actinobacterias en hábitats marinos, aunque la descripción del primer género actinobacteriano dependiente del agua de mar (es decir, *Salinispora* Maldonado *et al.*, 2005) apoya la idea de que el ecosistema marino todavía es una fuente de diversidad microbiana sin explotar de importancia económica. Por lo tanto, la evaluación de nuevos enfoques que pudieran mejorar la tasa de recuperación de actinobacterias marinas podría ampliar nuestra comprensión actual de la "verdadera" diversidad de este grupo microbiano. Sin lugar a dudas, estos puntos son un requisito previo para estudios sobre la estructura de la biogeografía y la comunidad de *Actinobacteria* aceleraría las posibilidades del descubrimiento de metabolitos secundarios (Baltz, 2007).

El éxito en la recuperación de nuevas actinobacterias depende fundamentalmente de la utilización y mejoras en las estrategias de aislamiento selectivos, pretratamientos de muestra y la eliminación de réplicas de aislar colecciones (Maldonado *et al.*, 2005, 2008).

1.2.1. Morfología

Los diferentes géneros que forman parte de este phylum presentan una enorme diversidad en términos de su morfología, fisiología, y capacidades metabólicas (Embley *et al.*, 1994; Stach & Bull, 2005; Ventura *et al.*, 2007). La morfología de las especies de actinobacteras varían de cocoides (*Micrococcus*) o varilla-cocoides (*Arthrobacter*) a fragmentar las formas de hifas (*Nocardia*) o altamente diferenciados micelios ramificados (*Streptomyces*) (Atlas, 1988). Macroscopicamente, algunos miembros presentan morfología colonial similar a las típicas colonias bacterianas pero con consistencia particularmente dura o rugosa mostrando colores característicos que puede ser crema, amarilla, anaranjada, verde, pardo o incluso negro (Logan, 1994) como se observa en la figura 2.

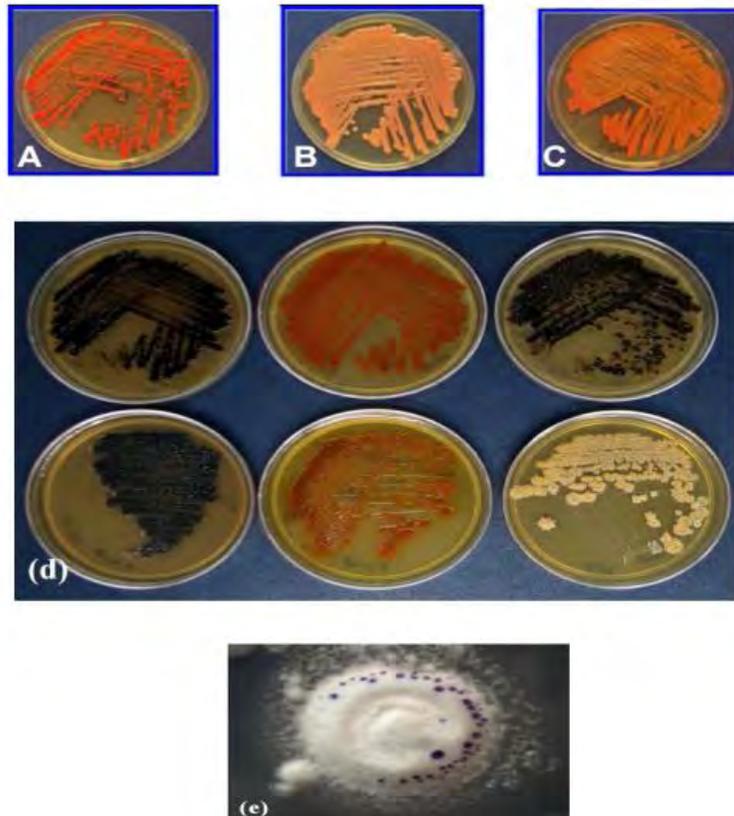


Figura 2.- Diferentes Morfologías macroscópicas de algunas colonias de *Actinobacteria*. (a) y (b) *Dientzia*, (c) *Gordonia*, (d) *Micromonospora* y (e) *Streptomyces*. (Maldonado, sin publicar).

1.2.2. Estructura

Las actinobacterias son microorganismos filamentosos, que crecen en forma de red llamado micelio; esta estructura puede permanecer en la superficie y se le denomina *micelio aéreo*, o bien, unida a la superficie del sustrato y se llama *micelio de sustrato*. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina *septación* y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN; su micelio aun siendo de dimensiones bacterianas es análogo al micelio que forman los hongos filamentosos. Una característica particular de las actinobacterias es que la reproducción lleva a la formación de esporas que son producidas en hifas especializadas, muchas de las cuales se desarrollan sobre el

filamento aéreo. De manera general estas estructuras carecen de movilidad, aunque algunos géneros producen esporas flageladas, según lo indica *Bergey's Manual of determinative bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

1.3. Género *Micromonospora*

Micromonospora, es un género de bacterias de la familia *Micromonosporaceae* (Orskov, 1923). Son gram-positivos, formadoras de esporas, generalmente aeróbico, y formar un micelio ramificado.

El género *Micromonospora* son un grupo de actinobacterias de crecimiento lento encontrados tanto en ambientes terrestres como acuáticos, marinos y abundantes en los suelos y sedimentos de agua dulce (Kawamoto, 1984). Las *Micromonosporas* son bien conocidas por su capacidad para degradar materiales complejos, tales como celulosa y quitina (Jendrossek *et al.*, 1997; Kawamoto, 1984; Wohl & McArthur, 2001), lo que confiere a estos organismos un papel potencialmente importante en el reciclaje de la materia orgánica particularmente en ambientes de agua dulce.

Los miembros de este género han sido aislados en número creciente, varios han sido clasificados en función de las características químico-taxonomías en sus secuencias de ADN de los genes *gyrB* y 16S rRNA, (Kroppenstedt, 1985; Kawamoto, 1989; Koch *et al.*, 1996; Kasai *et al.*, 2000). Actualmente, el género abarca la publicación de 47 especies con nombres validados (Euzéby, 2012). Hay algunas especies del género *Micromonospora* que se han aislado del suelo de manglares, por ejemplo, *M. rifamycinica* (Huang *et al.*, 2008), *M. rhizosphaera* (Wang *et al.*, 2011) y *M. pattaloongensis* (Thawai *et al.*, 2008).

El género *Micromonospora* ha atraído la atención como fuente útil para la producción de antibióticos desde el descubrimiento de la gentamicina complejo C (Weinstin *et al.*, 1963). Del mismo modo, se han encontrado y se siguen reportando algunos antibióticos obtenidos, por ejemplo, un nuevo complejo

actinomicina (Wagman *et al.*, 1976), sisonomicina (Itoh *et al.*, 1988), mycinamicina I y II (Kinoshita *et al.*, 1992), arisostatina A y B (Igarashi *et al.*, 2000) y kosinostatin (Furumai *et al.*, 2002). Otras moléculas activas sintetizadas por especies de *Micromonospora* son la vitamina B12 (Hirsch *et al.*, 2009) y compuestos antifúngicos (Ismet *et al.*, 2004). Es por esto que el género *Micromonospora* se ha estudiado para entender si puede producir varios tipos de antibióticos, como es el caso de *Streptomyces* y *Nocardia lata* (Kawamoto, 1979).

1.3.1. Morfología

Entre las características distintivas de este género se encuentra la ausencia de micelio aéreo, la producción de hifas septadas y la formación de esporas individuales. Como parte del ciclo de vida de las especies del género *Micromonospora*, durante el desarrollo de la colonia la mayoría de las especies presentan una coloración naranja, la cual se va tornando negruzca durante la esporulación (Suarez & Hardisson, 1985). Parte del proceso está caracterizado por un micelio ramificado bien desarrollado (0.2-0.6 μm de diámetro) con esporas que nacen como únicas sobre esporóforos cortos ya sean estas esféricas u ovales (0.5-1.5 μm de diámetro) (Figura 3).

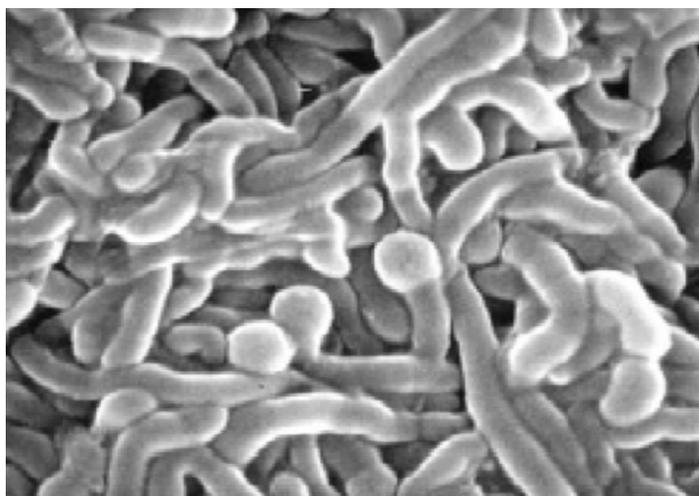


Figura 3. Morfología microscópica. *Micromonospora fulviviridis* mostrando esporas individuales. (Microscopía electrónica; Kroppenstedt *et al.*, 2005).

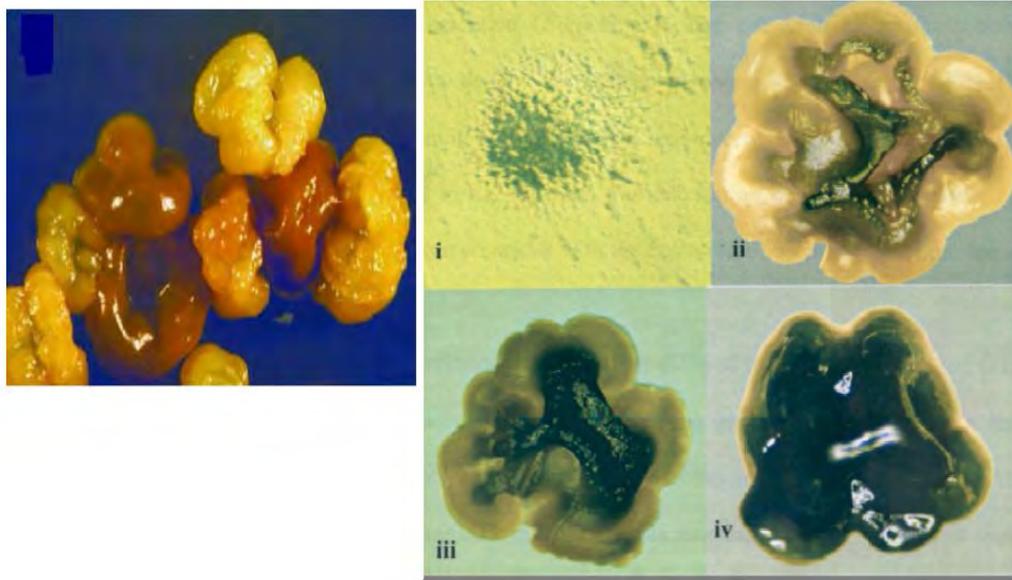


Figura 4. Izquierda; Morfología macroscópica colonias de *Micromonospora* L5 mostrando diferentes tonalidades (Hirsch & Valdés, 2009). Derecha; crecimiento- maduración de una colonia de *M. echinospora* (Hoskisson, 2002).

1.3.2. Estructura

Los miembros de este género se consideran especialmente adaptados para un estilo de vida acuático debido a la ausencia de hifas aéreas y la producción de esporas hidrófilas, en la pared celular contiene glicina y meso (o meso-3-hydroxy)-ácido diaminopimélico y se clasifica por su pared celular de tipo II por Lechevalier y Lechevalier. Así mismo se reportó, en algunos de los primeros estudios, que las *Micromonosporas*, eran las actinobacterias aisladas más comunes a partir de sedimentos lacustres (Cross, 1981).

1.4. Enzimas

Las enzimas son moléculas que tienen la función de catalizar todas las reacciones del metabolismo celular para preservar la integridad de los sistemas biológicos (Wiseman, 1985); como cualquier catalizador, éstas actúan reduciendo la magnitud de la barrera energética para llevar a cabo la conversión química de una sustancia en otra. Su estructura molecular les permite tener ventajas en comparación a los catalizadores químicos como son; alta selectividad, capacidad de catalizar una amplia gama de reacciones, obtención de productos con un alto rendimiento sin la formación de subproductos y actuar bajo diferentes valores de pH y temperatura. Estas características provocan que sean cada vez más utilizadas por diversos sectores entre los que se encuentran: la industria farmacéutica, de alimentos, de detergentes y la producción de “químicos finos” (Loughilin, 2000; Bornscheuer, 2002).

Las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos por reglas enunciadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), de acuerdo a la reacción química que catalizan, independientemente de su origen o de la presencia de grupos prostéticos. Estos grupos se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de enzimas de acuerdo a la IUBMB

Clasificación	Tipo de reacción catalizada	Subclases representativas
(1)Oxidorreductasas	Reacciones de óxido-reducción	Oxidasa, oxigenasa, peroxidasa, deshidrogenasa
(2)Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	Glicosiltransferasas, metiltransferasas, transaldolasas, transetolasas, aciltransferasas, alquiltransferasas, transaminasas, sulfotransferasas, fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas
(3)Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas, lipasas, glicosidasas, proteasas, sulfatasas, fosfatasas, aminoacilasas, endo y exo-nucleasas, halohidrolasas.
(4)Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles	Descarboxilasas, Aldolasas, cetolasas, hidrolasas, deshidratasas, polisacárido liasas, moniaco liasas
(5)Isomerasas	Isomerización	Racemasas, epimerasas, isomerasas
(6)Ligasas	Formación de enlace acoplada con la hidrólisis de ATP	Sintetasas, carboxilasas

Los nombres de las enzimas van precedidos de las iniciales EC e inician con alguno de los seis números anteriores. Dentro de estos grupos, las hidrolasas tienen un papel importante dentro de aplicaciones industriales, por lo que sus propiedades más importantes se describen a continuación.

1.4.1. Hidrolasas

Las Hidrolasas (EC 3) son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de un enlace por la adición de una molécula de agua, y se dividen en 12 subgrupos dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan. Son enzimas de importancia biológica ya que participan en el catabolismo proveyendo de nutrientes asimilables a la célula (Bornscheuer & Kazlauska, 2006; Illanes, 2008).

La mayor parte de las biotransformaciones realizadas en síntesis orgánica son llevadas a cabo por las hidrolasas, por presentar características como: una amplia especificidad por el sustrato, aceptando como sustratos algunos intermediarios sintéticos; presenta alta estereoselectividad incluso hacia los sustratos no naturales. Además de la reacción de hidrólisis, las hidrolasas también pueden catalizar reacciones como condensación (reacción inversa a la hidrólisis) y alcoholisis (ruptura de enlaces utilizando una molécula de alcohol en lugar de agua). Muchas de ellas se encuentran comercialmente disponibles y toleran la adición de disolventes miscibles en agua lo que permite que sean estables y activas en matrices orgánicas. Además presentan un gran potencial tecnológico ya que son enzimas robustas que les permite actuar bajo condiciones de proceso, no requieren de cofactores y muchas de ellas son extracelulares, por lo que su producción es simple y de bajo costo (Bornscheuer & Kazlauska, 2006; Illanes, 2008).

Dos clases principales de hidrolasas son las de mayor importancia: Lipasas (EC 3.1.1.1, hidrolasas triacilglicerol) y esterasas (EC 3.1.1.3, hidrolasas de éster carboxilo).

La principal diferencia entre estas dos enzimas radica en que las esterasas prefieren sustratos más solubles en agua, como ésteres y triacilgliceroles pequeños, mientras que las lipasas prefieren sustratos insolubles en agua como son los triacilgliceroles grandes (Fojan *et al.*, 2000). Mientras las esterasas obedecen una cinética Michaeliana clásica en las lipasas se observa que necesitan un mínimo de concentración de sustrato antes de mostrar alta actividad (Bornscheur, 2002).

1.4.1.1. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlace éster de triacilgliceroles de cadena larga, resultando la liberación de glicerol y ácidos grasos (Figura 5).

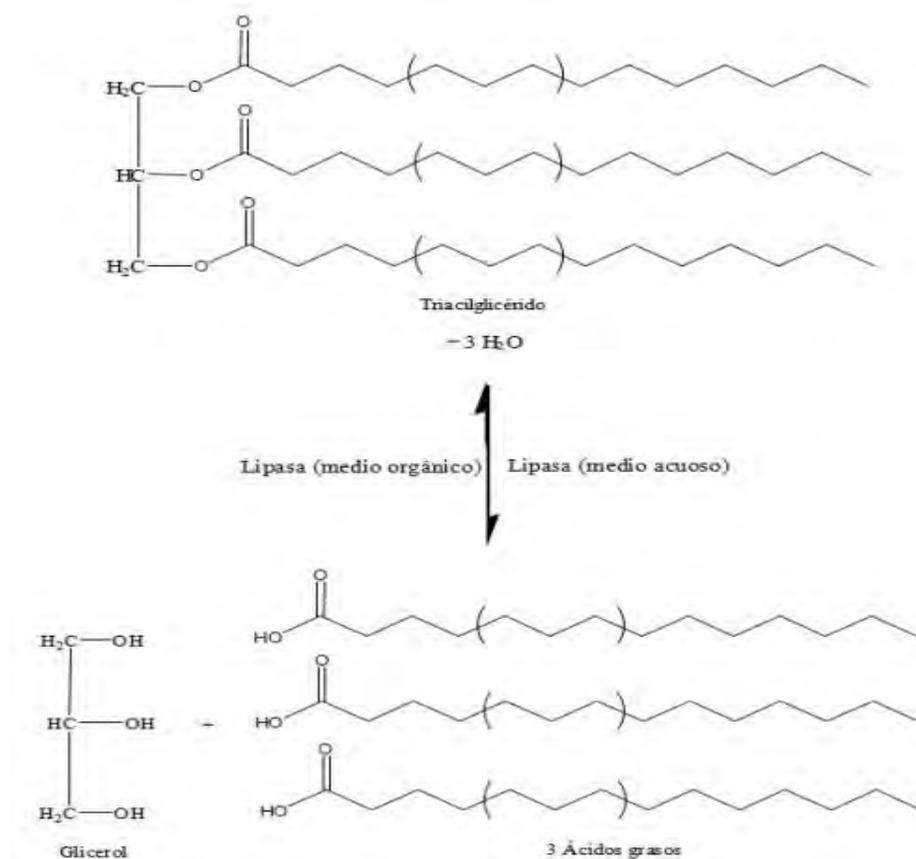


Figura 5. Hidrólisis de triacilgliceroles por lipasas (Vergara, 2010).

Las lipasas son enzimas versátiles ya que aceptan un amplio rango de sustratos, poseen regio- y estereoselectividad, además de que pueden actuar en disolventes orgánicos, por lo que ofrecen una alternativa para ser explotadas en síntesis orgánica en reacciones como esterificación, transterificación y aminólisis (Chen y Tsai, 2000; Koeller & Wong, 2001; Grogan, 2008).

A partir de estudios de elucidación de la estructura 3D y estudios de cristalografía de lipasas de algunos organismos como *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Humicola lanuginosa*, *Candida antarctica*, entre otras, se ha observado la presencia de una estructura o “tapa” que cubre el sitio activo de estas enzimas cuando se encuentran en un medio acuoso pero cuando interaccionan en la interface aceite/agua la “tapa” se abre, este comportamiento es conocido como “actividad interfacial”, el cual permite una conformación activa de la enzima haciendo accesible el centro catalítico para el sustrato (Smith *et al.*, 1992; Derewenda *et al.*, 1994; Schrag & Cygler, 1997). En el caso de algunas lipasas, la apertura de la “tapa” es responsable de la formación de la actividad oxianiónica, la cual está involucrada en la estabilización de los intermediarios durante la reacción de catálisis (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas lipasas no presentan activación interfacial o no presentan la estructura de “tapa”.

Las lipasas están presentes en todos los organismos vivos pues tienen un importante papel metabólico. En bacterias pueden ser intracelulares secretadas con la finalidad de degradar sustratos lipídicos presentes en el medio. En algunos organismos patógenos, como *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, así como en especies de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, actúan como factores de virulencia (Reetz, 2002).

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 maneras: 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 cuales a su vez pueden inhibir a la enzima (Weete, 2002).

1.4.1.1.1. Características catalíticas de las lipasas

En el contexto de la síntesis enzimática en sistemas de reacción no acuosos, cabe señalar la gran estabilidad que muestran las lipasas en presencia de solventes orgánicos, resultando altamente eficientes para procesos de hidrólisis inversa. Otra de las cualidades que hacen a las lipasas uno de los biocatalizadores más usados es su “promiscuidad catalítica” (Figura 6). Es decir, la capacidad de transformar diversos sustratos con grupos funcionales diferentes manteniendo a su alta regio-, quimio- y enantioselectividad (Garcia-Urdiales *et al.*, 2000).

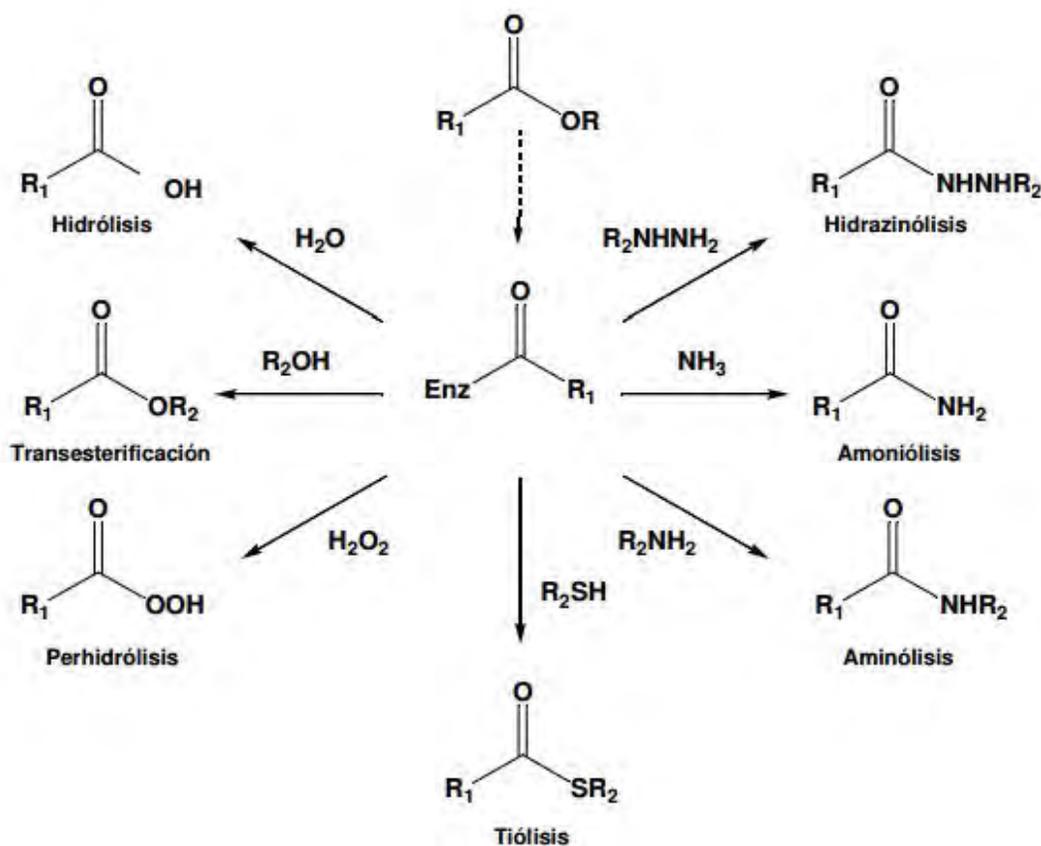


Figura 6. Reacciones de acilación más usuales catalizadas por lipasas en medios orgánicos sobre aminas y alcoholes (Garcia-Urdiales *et al.*, 2000).

1.4.1.1.2. Importancia comercial de las lipasas

A nivel industrial, las hidrolasas son los biocatalizadores más empleados, abarcando el 55% de las enzimas utilizada en este sector, de las cuales el 25% son lipasas.

Las lipasas, además de su uso en el procesamiento de grasas, son capaces de catalizar un número importante de reacciones alternas, son estables en un amplio rango de pH's, temperatura y distintos disolventes orgánicos; resistentes a diferentes detergentes, iones y otros agentes químicos. Estas enzimas en general se ha reportado como catalizadores exitosos y destacables en diferentes sectores industriales, tales como: la textil, farmacéutica, papelera, cosmética y de detergentes. (Pouilloux *et al.*, 1999). En la tabla 2 se resumen algunas aplicaciones industriales.

Tabla 2. Aplicaciones industriales de las lipasas.

Industria	Función	Producto	Referencia
Lácteos	Hidrólisis de grasa en leche Maduración de quesos y de mantequillas	Agentes saborizantes en queso y mantequilla	Paiva <i>et al.</i> , 2000
Panificación	Mejoramiento de sabor Prolongación de vida de anaquel	Productos de panificación	Hasan <i>et al.</i> , 2006
Confitería	Mejora de textura	Caramelos suaves y chiclosos	Hasan <i>et al.</i> , 2006
Química	Síntesis de compuestos ópticamente activos	Derivados del retinol (vitamina A)	Hasan <i>et al.</i> , 2006
Combustibles	Transesterificación de los aceites	Biodisel	Pouilloux <i>et al.</i> , 1999
Limpieza	Hidrólisis	Surfactantes Removedores de grasa	Paiva <i>et al.</i> , 2000

Las enzimas de origen bacteriano o fúngico generalmente son fáciles de producir por fermentación y de extraer del medio de cultivo. Como consecuencia, un gran número de enzimas microbianas se encuentran disponibles comercialmente. Los principales géneros de hongos utilizados para la producción

de lipasas de origen fúngico son *Candida humicola*, *Penicillium yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus* (Reetz, 2002; Polaina & MaxCabe, 2007).

En el ámbito de la industria farmacéutica, las lipasas resultan de gran interés debido a su capacidad de realizar reacciones regioselectivas, así como su alta enantioselectividad (Hernaiz *et al.*, 1999). De hecho, se han reportado reacciones de alcoholisis y aminólisis en fármacos, resolviendo esteres y amidas ópticamente activas (tabla 3) (Kazlauskas, 1994).

Tabla 3. Ejemplo de procesos industriales catalizados por lipasas de uso comercial

Microorganismo	Clasificación microbiana	Aplicación	Referencia
<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria	Producción de sabores	Jaeger & Eggert 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacteria	Productos de biodiesel	Jaeger & Eggert 2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria	Medicina	Hasan <i>et al.</i> , 2006
<i>Gordonia hirsuta</i>	Bacteria	No especificado	Goodfellow <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida antarctica</i>	Levadura	Transesterificación de aceites	Jaeger & Eggert 2002
<i>Candida rugosa</i>	Levadura	Síntesis de compuestos	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

1.4.1.2. Esterasas

Las esterases (EC 3.1.1.1) son carboxil esterases que catalizan la hidrólisis del enlace éster de sustratos solubles en agua, con la liberación de un ácido carboxílico y un alcohol (Figura 7).

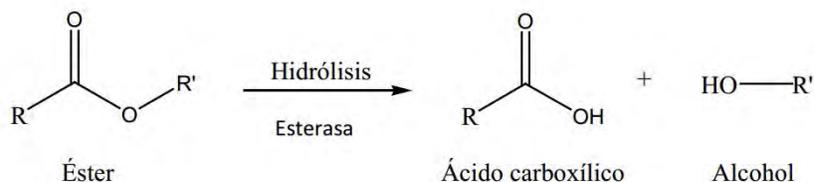


Figura 7. Reacción de Hidrólisis de enlace éster (Vergara, 2010).

Al igual que las lipasas, las esterases forman parte de la familia de las serinohidrolasas, que presentan la clásica triada catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu.

A diferencia de las lipasas, las esterases actúan preferentemente sobre el enlace éster de ácidos grasos y triacilglicerolos de cadena corta, por lo que su máxima actividad es sobre sustratos solubles. Además no presentan activación interfacial ni presentan una "tapa" que cubre el sitio activo como es el caso de las lipasas (Fojan *et al.*, 2000; Peña-Montes, 2009).

En contraste con las lipasas, sólo algunas esterases han sido utilizadas en síntesis orgánica, destacando el uso de las esterases aisladas del hígado y páncreas de puerco y las esterases de origen microbiano, como las de *Pseudomonas marginata*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus coagulans* y *Arthrobacter globiformis*, que han sido utilizados en la resolución cinética de alcoholes primarios y secundarios y ácidos carboxílicos (Bornscheuer & Kazlauska, 2006).

1.4.1.2.1. Importancia comercial de las esterasas

Las esterasas suelen presentar alta quimioselectividad y enantioselectividad en las reacciones que catalizan. Se han utilizado en las industrias de alimentos, papel, textil y detergente, así como en el tratamiento de residuos, productos de química fina y la síntesis de fármacos (Volcan *et al.*, 2008). Un resumen de aplicaciones se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Distintas aplicaciones industriales de lipasas

Industria	Función	Producto	Referencia
Bebida	Mejoramiento de aromas	Bebidas	Torres <i>et al.</i> , 2008
Cárnicos	Desarrollo de sabores Remoción de grasa Identificación de adulteración	Embutidos y demás productos cárnicos	Sharman <i>et al.</i> , 1994
Cosméticos	Síntesis	Emulsificantes Agentes humectantes	Kaiser <i>et al.</i> , 2006
Farmacéuticos	Síntesis estereoselectiva	Naproxeno, suprofenos, agentes antitumorales.	Kaiser <i>et al.</i> , 2006; Hou, 1993

Aunque se sabe de la presencia de esterasas en un número considerable de microorganismos, sólo unos pocos de ellos se han utilizado para la síntesis de compuestos ópticamente puros. La mayor razón de esto es su limitada disponibilidad comercial y su enantioselectividad moderada observada con frecuencia. Algunas esterasas han estado disponibles en los últimos años a partir de diversos proveedores por ejemplo; Fluka (Suiza), Amano Enzyme, Inc. (Japón), Jülich Fine Chemicals (Alemania), Roche Diagnostics (Alemania) y Thermogen (EUA).

Las esterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres, que son de gran importancia en la industria farmacéutica y química como por ejemplo el Naproxeno, Ketofeno y muchos intermediarios de síntesis tanto de

medicamentos como de insecticida y herbicidas (Hou, 1993), como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Ejemplo de procesos industriales catalizados por esterazas de uso comercial

Microorganismo	Clasificación microbiana	Aplicación	Referencia
<i>Gordonia amarae</i>	Bacteria	No especificada	Klatte <i>et al.</i> , 1994
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Bacteria	Modificación de triglicéridos	Bornscheur 2002
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria	Síntesis de compuestos	Bornscheur 2002
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Bacteria	No especificada	Bornscheur 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

1.5. Efecto de la concentración de sales en el crecimiento bacteriano

Dado que el sodio (Na^+) es el ion más abundante presente en el agua de mar, no es de extrañar que el requisito específico de Na^+ para el crecimiento de bacterias marinas esté implicado como una característica primaria de microorganismos marinos; a pesar de que la cantidad, especificidad, estabilidad, singularidad, y la función del Na^+ como requisito, sea un tema de gran debate (MacLeod, 1965).

El conocimiento sobre bacterias marinas Gram positivas y en especial de las actinobacterias es significativamente deficiente. Dentro de los factores fisicoquímicos que intervienen en la adaptación de las bacterias que habitan el sedimento marino se encuentra la salinidad.

La salinidad y en especial el Na^+ juega un papel fisiológico muy importante en las bacterias marinas, se ha propuesto que se genera un gradiente de Na^+ transmembranal con un potencial de energía, que puede ser utilizado para varias funciones celulares incluyendo la generación de ATP, el transporte de muchos

solutos, la respiración, la regulación del pH y la movilidad flagelar (Dimroth 1987; Nakamura *et al.*, 1992; Kogure 1998; Häse *et al.*, 2001). Además de Na⁺, requieren otros iones que mantienen la integridad celular como son el potasio, el magnesio y el calcio, que son usados en su crecimiento y en la estabilidad osmótica (Johnson & Harvey 1938; MacLeod & Matula 1961, MacLeod 1965; Unemoto *et al.*, 1973).

1.6. Efecto de la concentración de sales sobre la actividad lipolítica

En la industria, el empleo de enzimas de origen microbiano ostenta varias ventajas pues en algunos casos su uso sustituye la utilización de químicos o el gasto de agua en los procesos. Sin embargo, en la mayoría de los casos de muchos de estos procesos industriales la actividad de una enzima no puede optimizarse ajustando las condiciones físico-químicas a las cuales el proceso debe llevarse a cabo. Por consiguiente, la evaluación de factores abióticos para determinar su actividad óptima se convierte en un tema de estudio de gran importancia (Giudice *et al.*, 2006).

Uno de los factores que indiscutiblemente está implicado en el crecimiento óptimo de los microorganismos y por consiguiente en la actividad de las enzimas, es la composición del medio de cultivo y específicamente se ha reportado estudios con respecto al efecto de la concentración de sales en el medio en la actividad lipolítica.

En el trabajo realizado por Bruni y colaboradores (1982) se estudió la influencia del cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de magnesio (MgCl₂) en la actividad de esterasas y lipasas frente un grupo de ácidos grasos (Tween 20, 40, 60, 80, 85, tributirina y trioleína). En los experimentos suplementados con NaCl, la actividad lipolítica máxima se encontró bajo una concentración de 1% de NaCl en todos los Tweens y tributirina, pero para trioleína se reportó sólo en algunos casos. En concentraciones más altas la actividad fue variable, reportándose que algunas

cepas obtuvieron actividad lipolítica a concentraciones del 2,7% NaCl, que es equivalente a una salinidad del agua de marina del 3,5% aproximadamente.

Giudice y colaboradores (2006) estudiaron una serie de factores abióticos para lipasas y esterases como son, la influencia del pH, temperatura y concentración de NaCl en la lipólisis, producida por microorganismos marinos. Para el efecto de la concentración de NaCl se evaluaron valores de 0 a 11%, utilizando como sustratos Tween 20, 40, 60, 80, 85, tributirina y trioleina, midiéndose el diámetro del halo de degradación a los 21 días. Los resultados mostraron que la mayor actividad se registró en Tween 20, 40 y 60 a una concentración de 3.5%, para Tween 80 y 85 fue de 1% y para tributirina fue de 7% de NaCl. Se reportó que los aislados con mejor actividad esterasa fueron clasificados dentro del género *Vibrio* y *Psychrobacter*. De las 155 bacterias evaluados el 95.5% presentó actividad lipolítica lo que sugiere que los ambientes marinos pueden ser fuente de microorganismos con dicha actividad.

Solares (2010) evaluó la actividad lipolítica de actinobacterias bajo una serie de factores abióticos como fueron; distintos pH's, temperaturas y concentraciones de sal marina. Utilizando medio basal (MB) y medio basal diluido (MBD), adicionando como sustratos: Tween 20, 40, 60, 80, 85, tributirina y trioleina. Solares (2010) reportó que la dependencia de un ambiente salado es claramente propia de cada aislado en estudio. Las condiciones óptimas en las que se presentó mejor actividad lipolítica variaron en un rango de 0.0 a 3.5% de sal marina (SM).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enzimas constituyen una gran industria debido al amplio rango de aplicaciones. El empleo de enzimas de origen microbiano en este sector presenta amplias ventajas pues en algunos casos su uso sustituye la utilización de químicos o el gasto de agua en los procesos. Entre las enzimas más importantes las lipolíticas constituyen el grupo más importante de biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas (Hasan *et al.*, 2006).

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 microbianas son más útiles que aquellas obtenidas de plantas o animales debido a la gran variedad de actividad catalítica que presentan, en este sentido la clase *Actinobacteria* comprende un grupo reconocido por su capacidad innata para la síntesis de metabolitos secundarios pero es también reconocido por su capacidad para la síntesis de enzimas con actividad en distintos sectores industriales y por lo tanto este grupo puede llegar a mostrar mayor actividad lipolítica que los hongos u otros grupos bacterianos como sugieren Ko y colegas en su estudio del 2004.

Dentro de este ámbito, no hay estudios acerca de la actividad lipolítica del género *Micromonospora* por lo que el presente trabajo evaluó aislados recuperados del Golfo de California para establecer cómo es que esta actividad (en caso de que se presente) pudiera verse afectada por la incorporación de cloruro de sodio (NaCl) y sal marina (SM) a un medio de cultivo base.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar y establecer el efecto de las concentraciones de NaCl y SM sobre la actividad lipolítica de treinta aislados pertenecientes al género *Micromonospora*, obtenidos de sedimentos marinos del Golfo de California.

3.2. Objetivos particulares

- Establecer si los aislados actinobacterianos recuperados del Golfo de California, presentan actividad lipolítica.
- Evaluar el efecto de la actividad lipolítica en estos aislados en presencia de diferentes ácidos grasos (Tweens; 20, 40, 60, 80 y 85).
- Establecer las condiciones bajo las cuales la actividad lipolítica se expresa al máximo para los aislados marinos en estudio.
- Evaluar la tolerancia de los aislados a NaCl y SM agregadas al medio de cultivo y comparar las diferencias en el crecimiento bajo estas dos condiciones.
- Establecer la concentración máxima, para ambas sales, bajo la cual se observa evidencia de crecimiento en los aislados.

4. HIPÓTESIS

Si el crecimiento de 30 actinobacterias del género *Micromonospora* se ve afectado por la incorporación de NaCl y SM en el medio de cultivo, este factor también tendrá influencia sobre la actividad lipolítica expresada y ésta deberá ser distinta entre los diferentes aislados.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este trabajo está esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama de flujo (figura 8).

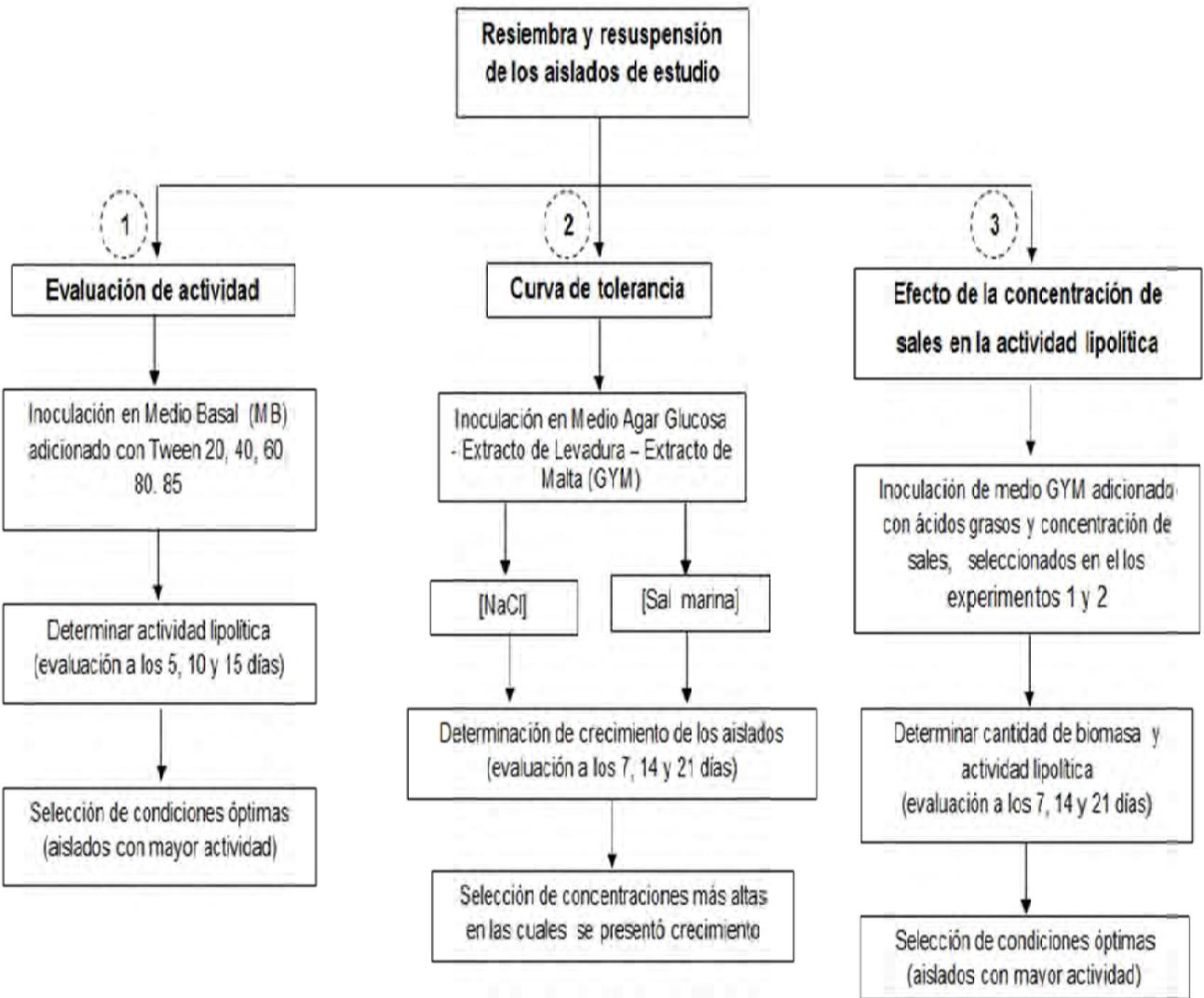


Figura 8. Diseño experimental

5.1. Aislamiento Microbiano

Los aislados se obtuvieron de sedimentos marinos recolectados en el Golfo de California en estudios previos desarrollados en el Laboratorio de Recursos Microbianos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM-CI; Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez). Las muestras de sedimento se recolectaron en el año 2006 durante la campaña oceanográfica DIPAL-1, a bordo del buque oceanográfico “El Puma” propiedad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las cepas fueron aisladas de las muestras usando el procedimiento de aislamiento selectivo descrito por Pisano y colaboradores (1989) de la siguiente forma: Con los sedimentos marinos obtenidos se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 posteriormente se tomó entre 50 y 75 μ l de ambas diluciones y se inocularon en el medio de cultivo disgregándose de manera uniforme con la ayuda de una varilla en “L”, por último los medios se incubaron de 3 a 4 semanas a una temperatura de entre 28 y 30°C. El medio de cultivo utilizado fue Agar Glucosa - Extracto de Levadura – Extracto de Malta Malta (GYM; Shirling and Gottlieb, 1966) suplementado con ciclohexamida y rifampicina con el propósito de hacerlo selectivo para *Micromonospora*. La identificación se realizó de manera visual observando la morfología macro y microscópica de las colonias y posteriormente de manera molecular con la identificación del gen 16S. Tanto los aislamientos como las identificaciones fueron realizados por Segura (2011) en un estudio previo.

5.2. Resiembra y resuspensión

Se emplearon treinta cepas de microorganismos asignados al género *Micromonospora* con base en sus características micro y macroscópicas. Los aislados se identificaron con diferentes códigos, se sembraron en medio GYM 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

% de NaCl en tubos estériles de rosca (1.5 ml de capacidad). La suspensión se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso en los diferentes medios por ser evaluados. La cantidad de microorganismos presentes en cada suspensión se estableció empleando los estándares de McFarland preparados de acuerdo a lo descrito en Murray *et al.* (2003) (ver apéndice).

A los aislados se les asignaron códigos con dos letras seguidos por un número, como se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Códigos de identificación de las cepas utilizadas en el estudio.

BA-1	BD-1	BL-8	CV-7	DU-6
BA-3	BD-3	BL-9	CV-11	DU-10
BA-9	BL-1	BL-10	CV-13	DU-11
BA-13	BL-3	BL-12	CV-20	DU-12
BA-15	BL-4	CV-4	DU-2	DX-9
BA-18	BL-6	CV-5	DU-4	DX-12

5.3. Evaluación de la actividad lipolítica

5.3.1. Inoculación en medio sólido

Se preparó el medio de cultivo basal (MB) de acuerdo al trabajo de Giudice y colegas (2006). El MB se suplementó con los diferentes ácidos grasos de estudio: Tween 20 (T20), Tween 40 (T40), Tween 60 (T60), Tween 80 (T80) y Tween 85 (T85). Los ácidos grasos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México) y se agregaron al 1% al MB. Una vez preparados los medios, éstos se esterilizaron en una autoclave, marca sterilmatic (EUA), a 121 °C durante 15 min para posteriormente vaciarse en cajas Petri de 90 x15 mm. Cada caja Petri con medio se inoculó con 4 cepas diferentes (como se observa en la figura 9), adicionando en cada una 7 µL de la suspensión microbiana con una pipeta Gilson de 20 µL (Gilson, Francia) y

puntas estériles (Axigen, EUA). Los medios se incubaron por 15 días a 30°C por tratarse de la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos de estudio realizándose lecturas cada 5 días para detectar la presencia de un precipitado blanco-grisáceo alrededor de la colonia.

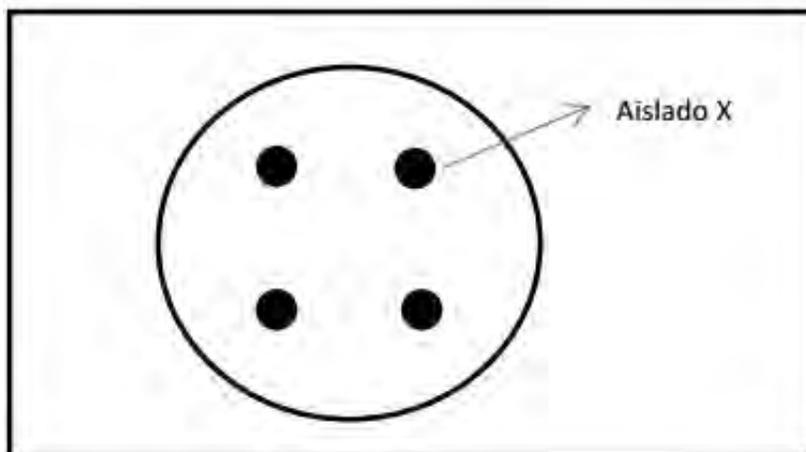


Figura 9. Esquema de la inoculación de los aislados en las cajas.

5.3.2 Determinación de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó observando la presencia de un precipitado alrededor o por debajo de las colonias. El diámetro del halo de degradación se midió utilizando una regla graduada de 10cm y las lecturas se registraron a los 5, 10 y 15 días de incubación.

5.4. Efecto de la concentración de NaCl y SM en el crecimiento de los aislados

5.4.1. Curva de tolerancia

Para observar la capacidad de crecimiento de los aislados frente a condiciones de estrés salino se prepararon diferentes lotes con medio de cultivo GYM, los cuales fueron suplementados con diferentes concentraciones de NaCl y SM. Las concentraciones de NaCl utilizadas fueron: 0, 1, 2, 3, 3.5, 4 y 5 %, por otro lado las concentraciones de SM utilizadas fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9%.

Para la preparación de concentraciones deseadas de SM se utilizó sal de acuario (Sigma-Aldrich, EUA). Las cajas se inocularon usando las suspensiones de biomasa de cada microorganismo, preparadas previamente, agregando 7 μ L de muestra con micropipeta. Estas cajas Petri inoculadas e identificadas perfectamente se incubaron a 30°C realizándose lecturas cada 7 días para detectar la cantidad de crecimiento bajo diferentes concentraciones de sales.

5.4.2. Determinación del crecimiento de los aislados

La evaluación del crecimiento se determinó observando la cantidad de biomasa presente en los medios suplementados con diferentes concentraciones de SM y NaCl, asignando valores y comparando los resultados con un "blanco" el cual, en este caso, fue medio GYM sin adición de sales (0%) por tratarse de la concentración a la cual se ha reportado un crecimiento óptimo de los microorganismos de estudio, realizándose lecturas a los 7, 14 y 21 días de incubación.

Una vez obtenidos los resultados anteriores se seleccionaron las concentraciones más altas en las que se observó crecimiento de los aislados, así como los ácidos grasos bajo los cuales se presentó un mejor desempeño de la actividad lipolítica, se procedió a combinar estos factores para observar el impacto de la concentración de sales en la actividad lipolítica de los aislados.

5.5. Efecto de la concentración de NaCl y SM en la actividad lipolítica

5.5.1. Experimento 1

Para realizar esta evaluación se prepararon dos lotes con medio de cultivo GYM; a uno se le adicionó NaCl mientras que al otro se le agregó SM. Ambas sales a una concentración del 5%. Como sustrato se utilizó Tween 40 suplementándose al 1% para ambos lotes, los cuales fueron inoculados con 7 μ L de suspensión microbiana con micropipeta y se incubaron a 30°C durante 21 días.

5.5.2. Experimento 2

Se utilizó medio de cultivo GYM suplementando con 3.5% de SM únicamente, y se realizaron tres lotes adicionándose cada uno con un sustrato diferente: Tween 40 (T40), Tween 60 (T60) y Tween 80 (T80) al 1%, por último cada medio se inoculó con 7 μ L de suspensión microbiana y se incubó a 30°C durante 21 días.

5.5.3. Determinación del crecimiento y de la actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó observando la presencia de un precipitado alrededor o por debajo de las colonias. El diámetro del halo de degradación se midió utilizando una regla graduada de 10cm y las lecturas se registraron a los 7, 14 y 21 días de incubación.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1: Evaluación de la actividad lipolítica

A continuación se presentan los resultados obtenidos, para este primer experimento, en el cual se evaluó la presencia de actividad lipolítica y, en caso de ser así, el diámetro de degradación obtenido ante los diferentes ácidos grasos a los que fueron expuestos los aislados, haciendo las mediciones a los 5, 10 y 15 días de incubación a 30 °C.

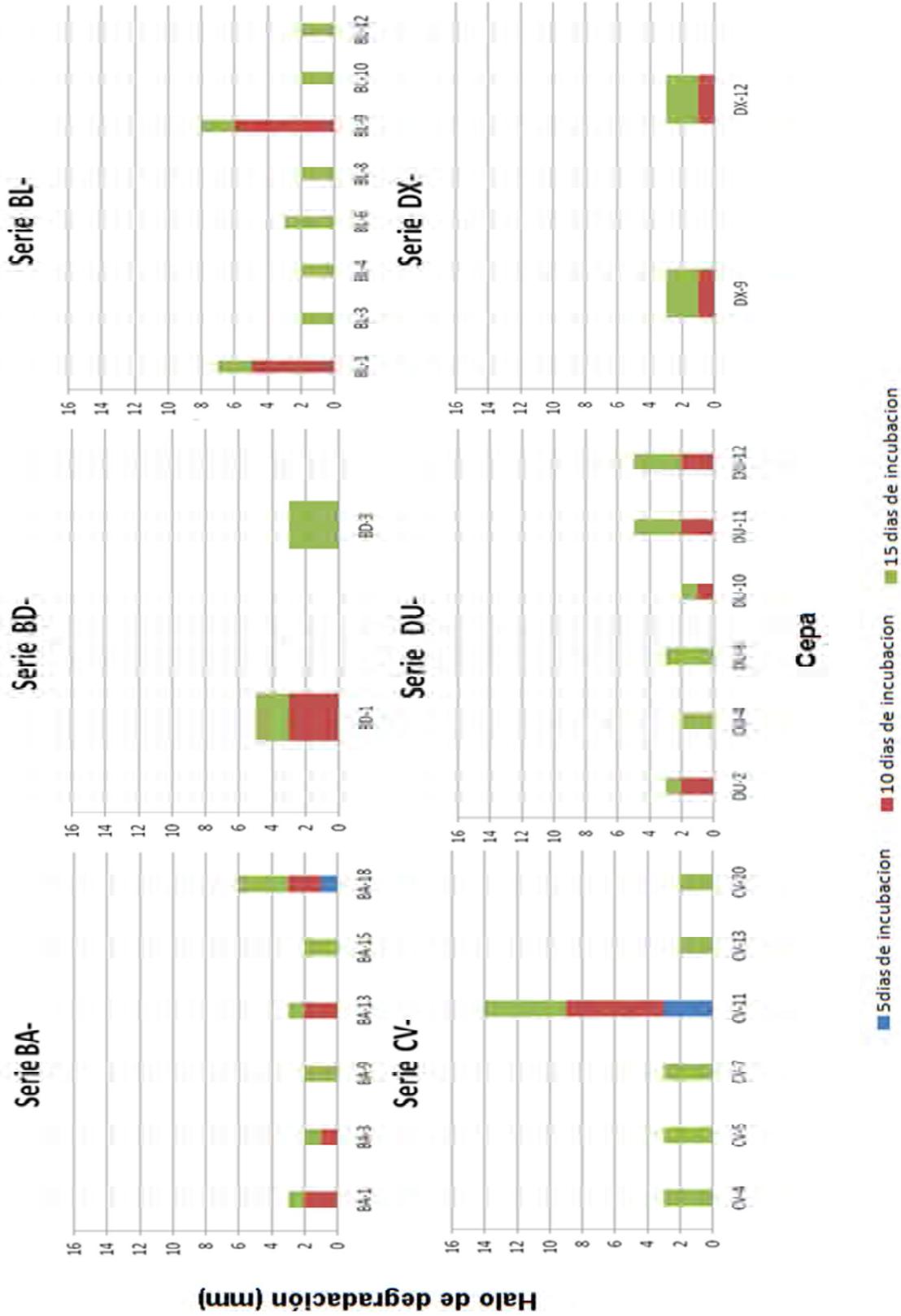
- **Ácido graso utilizado: Tween 20**

Ninguna de las colonias sembradas en medio basal (MB) adicionado con Tween 20, presentó indicio de actividad lipolítica durante los 15 días de incubación.

En los gráficos 1, 2, 3 y 4 se presentan los resultados para el resto de los ácidos grasos; T40, T60, T80 y T85. Para facilitar la visualización e interpretación de los resultados, las treinta cepas se separaron en orden alfabético de acuerdo a su código de etiquetado (BA-, BD-, BL-, CV-, DU- y DX-).

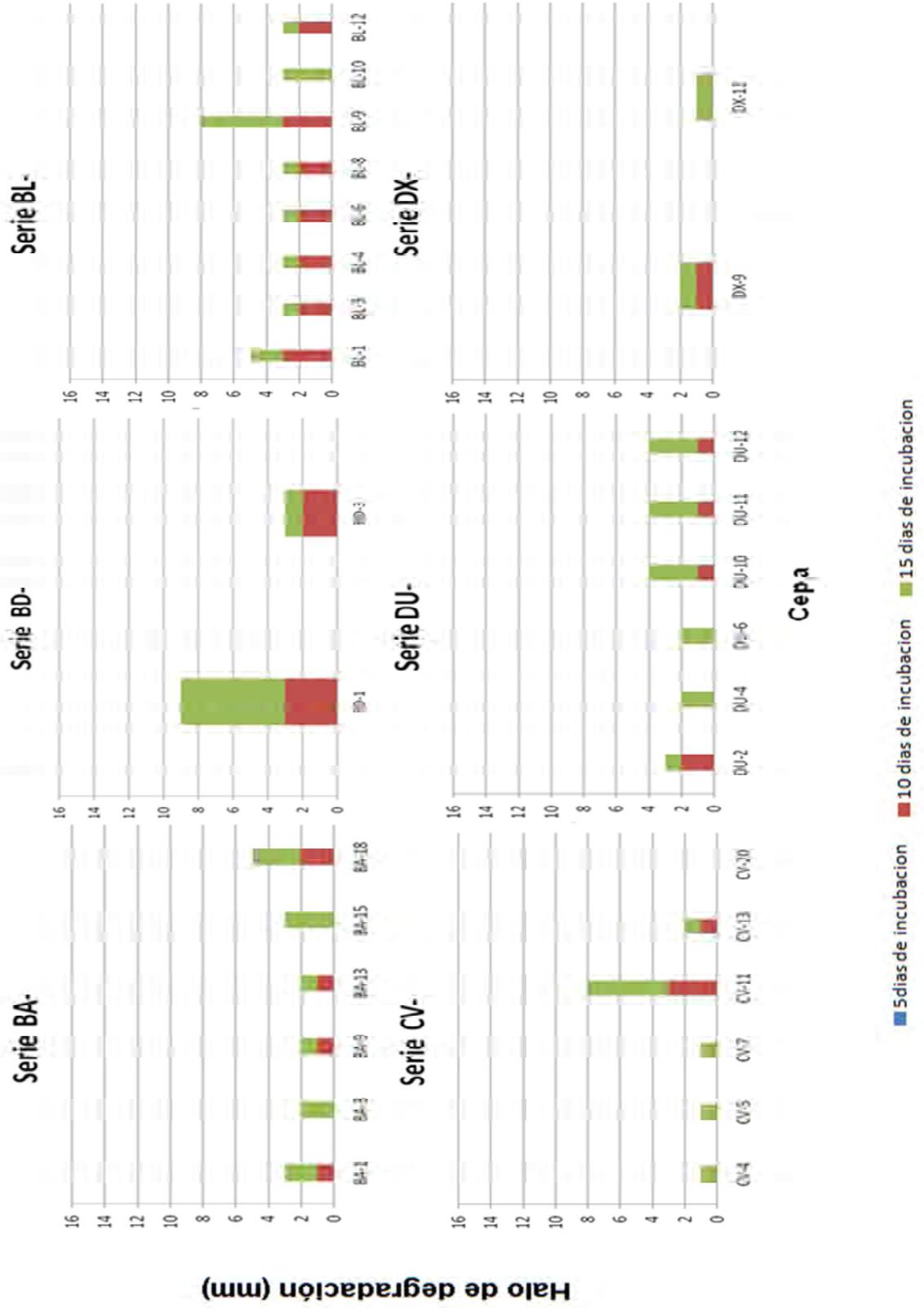
○ **Ácido graso utilizado: Tween 40**

Gráficos 1. Diámetros de degradación en MB con Tween 40, en aislados de *Micromonospora*



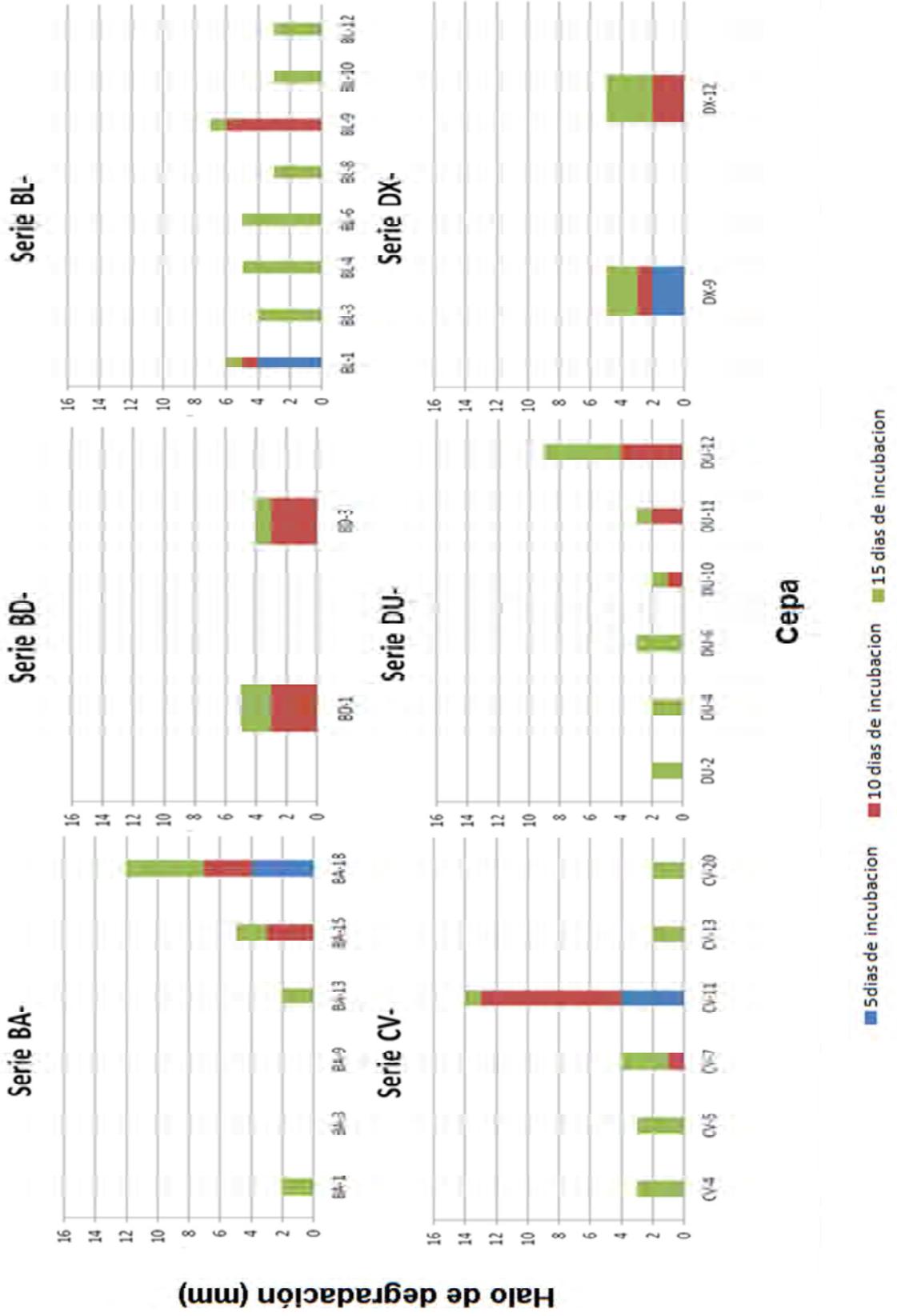
○ **Ácido graso utilizado: Tween 60**

Gráficos 2. Diámetros de degradación en MB con Tween 60 en aislados de *Micromonospora*



- **Ácido graso utilizado: Tween 80**

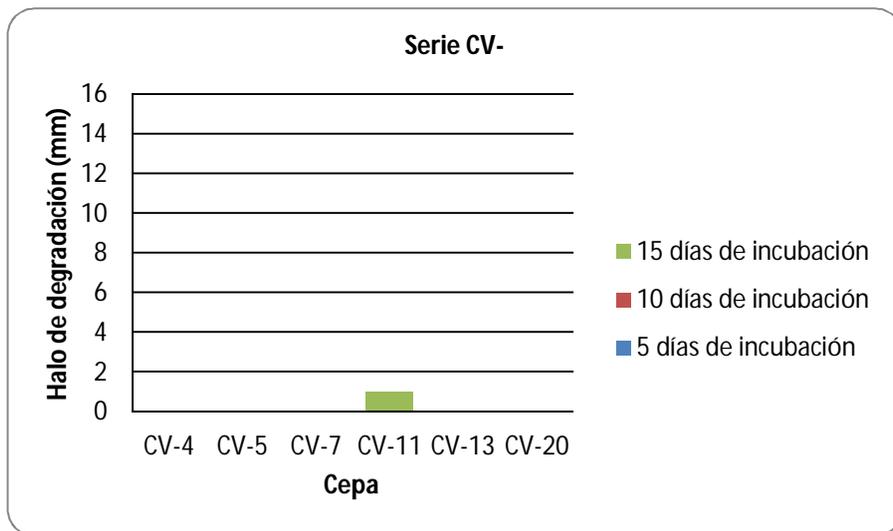
Gráficos 3. Diámetros de degradación en MB con Tween 80 en aislados de *Micromonospora*



○ **Ácido graso utilizado: Tween 85**

En el MB adicionado con T85, durante los 15 días de incubación, sólo se obtuvo degradación en la colonia con clave "CV-11", en las demás colonias no se presentó ningún tipo de degradación durante el tiempo que duro la evaluación.

Grafico 4. Diámetro de degradación en MB Tween 85 en los aislados con clave CV-



6.1.1. Selección de aislados y ácidos grasos.

De acuerdo con la actividad lipolítica observada en los 30 aislados sometidos a 5 ácidos grasos, se seleccionaron aquellos grupos en donde la actividad lipolítica fue más evidente. Esta selección se realizó haciendo una comparación entre el diámetro de degradación reportado en todos los aislados. CV-11 fue el aislado que obtuvo el mayor diámetro de degradación; con 14 mm a los 15 días de incubación, por lo que este valor se estableció como el máximo y se tomó como una “Excelente Actividad”, para este estudio.

De tal forma que:



Microorganismos que presentaron una buena actividad lipolítica (Diámetro de degradación ≥ 5 mm): BA-18, BD-1, BL-1, BL-4, BL-6, BL-9, CV-11, DU-11, DU-12, DX-9, DX-12

Fuentes de ácidos grasos bajo los cuales se presentó mejor actividad lipolítica: Tween 40, Tween 60, Tween 80.

Tablas 7. Microorganismos que obtuvieron mayor actividad lipolítica a los 15 días de incubación, tomando en cuenta únicamente valores de diámetro de degradación igual o mayores a 5 mm (en rojo).

	mm de degradación		
	Tween 40	Tween 60	Tween 80
BA-18	6	5	12
BD-1	5	9	5
BL-1	7	5	6
BL-4	2	3	5
BL-6	3	3	5
BL-9	8	9	7
CV-11	14	8	14
DU-11	5	4	3
DU-12	5	4	8
DX-9	3	2	5
DX-12	3	1	5

6.2. Experimento 2: Curvas de tolerancia

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a NaCl (tabla 8) y a SM (tabla 9). Se puede observar la cantidad de crecimiento de cada aislado bajo diferentes concentraciones de ambas sales a los 21 días de incubación a 30°C

Tabla 8. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl

Aislado	0	1%	2%	3%	3.5%	4%	5%
BA-1	++++	+++	++	-	-	-	-
BA-3	++++	++	+	-	-	-	-
BA-9	++++	++	+	-	-	-	-
BA-13	++++	+++	++	-	-	-	-
BA-15	++++	+++	++	-	-	-	-
BA-18	++++	+++	++	+	+	+	-
BD-1	++++	++	+	-	-	-	-
BD-3	++++	+++	++	+	-	-	-
BL-1	++++	+++	++	++	++	+	-
BL-3	++++	+++	++	+	+	+	-
BL-4	++++	++	+	-	-	-	-
BL-6	++++	++	+	-	-	-	-
BL-8	++++	+++	++	+	+	-	-
BL-9	++++	+++	++	+	+	+	-
BL-10	+++	++	+	-	-	-	-
BL-12	++++	+++	++	+	-	-	-
CV-4	++++	+++	++	+	+	-	-
CV-5	++++	++	+	+	-	-	-
CV-7	++++	++	+	+	-	-	-
CV-11	++++	+++	++	++	+	+	-
CV-13	++++	++	+	+	-	-	-
CV-20	++++	++	+	-	-	-	-
DU-2	++++	++	++	+	+	-	-
DU-4	++++	+++	++	+	+	-	-
DU-6	++++	++	+	-	-	-	-
DU-10	++++	+++	++	+	-	-	-
DU-11	++++	+++	++	+	+	+	-
DU-12	++++	+++	+	-	-	-	-
DX-9	++++	+++	++	+	-	-	-
DX-12	++++	+++	++	+	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

Tabla 9. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de SM

Aislado	0	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%
BA-1	++++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
BA-3	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BA-9	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BA-13	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-
BA-15	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-
BA-18	++++	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-
BD-1	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	-	-
BD-3	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	-	-
BL-1	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
BL-3	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BL-4	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-
BL-6	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-
BL-8	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	-	-
BL-9	++++	++++	+++	++	++	+	+	+	-	-
BL-10	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
BL-12	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
CV-4	++++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
CV-5	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
CV-7	++++	++++	++	++	+	-	-	-	-	-
CV-11	++++	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
CV-13	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
CV-20	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
DU-2	++++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
DU-4	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
DU-6	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
DU-10	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
DU-11	++++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
DU-12	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
DX-9	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-
DX-12	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

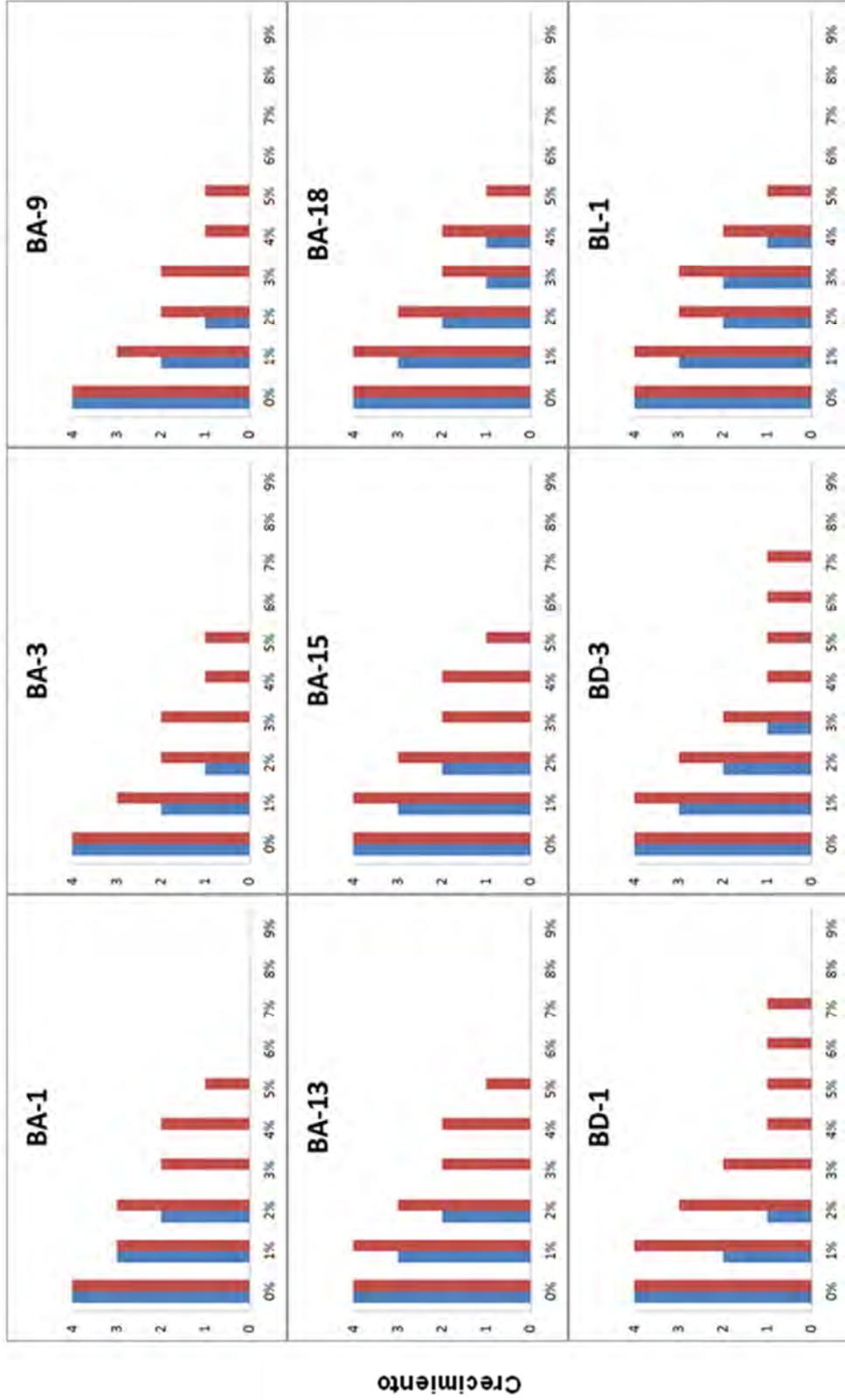
+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

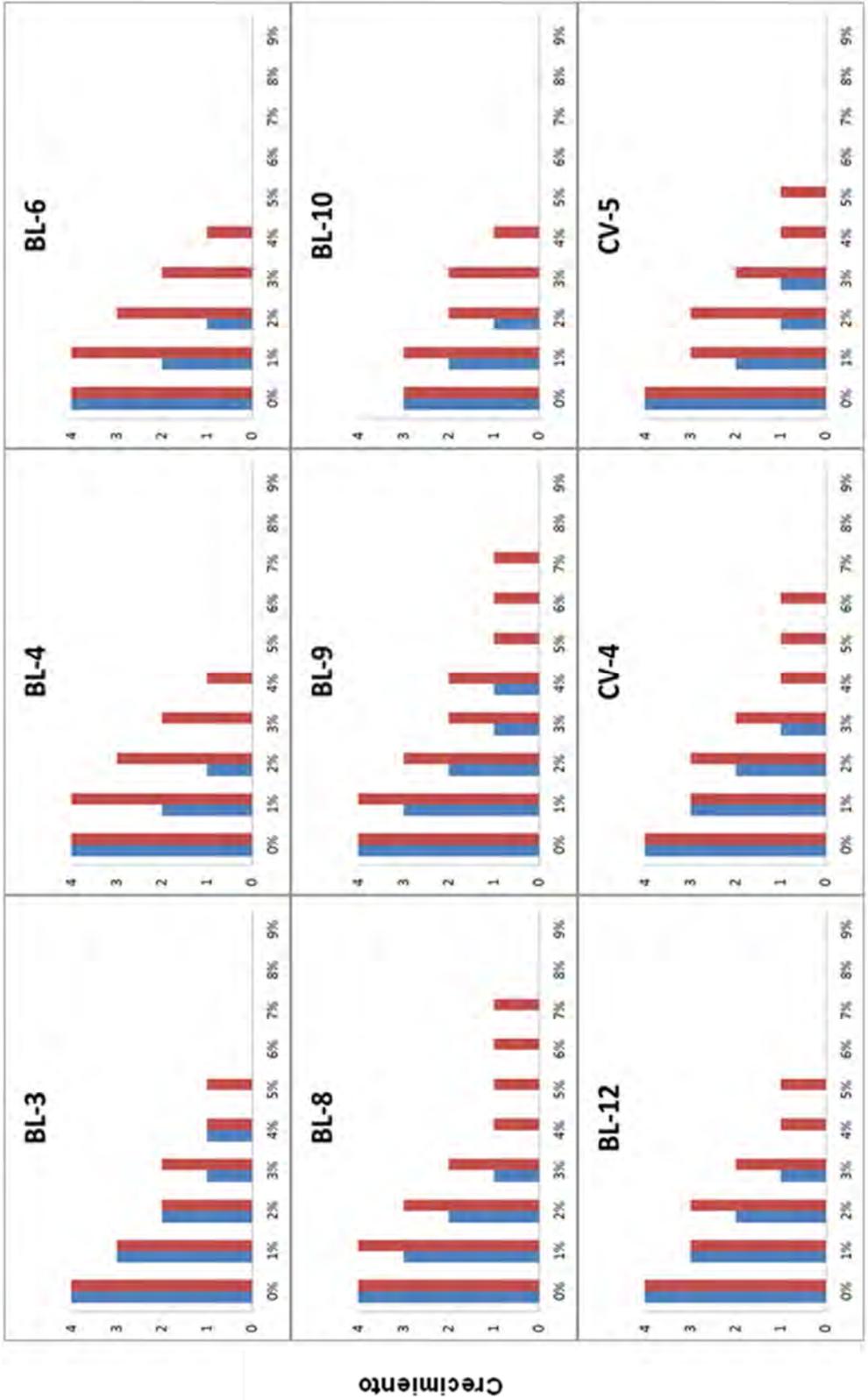
+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

En las siguientes gráficas (5, 6, 7 y 8) se condensan los resultados anteriores, colocándose de forma contigua para facilitar la visualización de las diferencias en el crecimiento de los aislados bajo ambas condiciones de estrés (NaCl y SM).



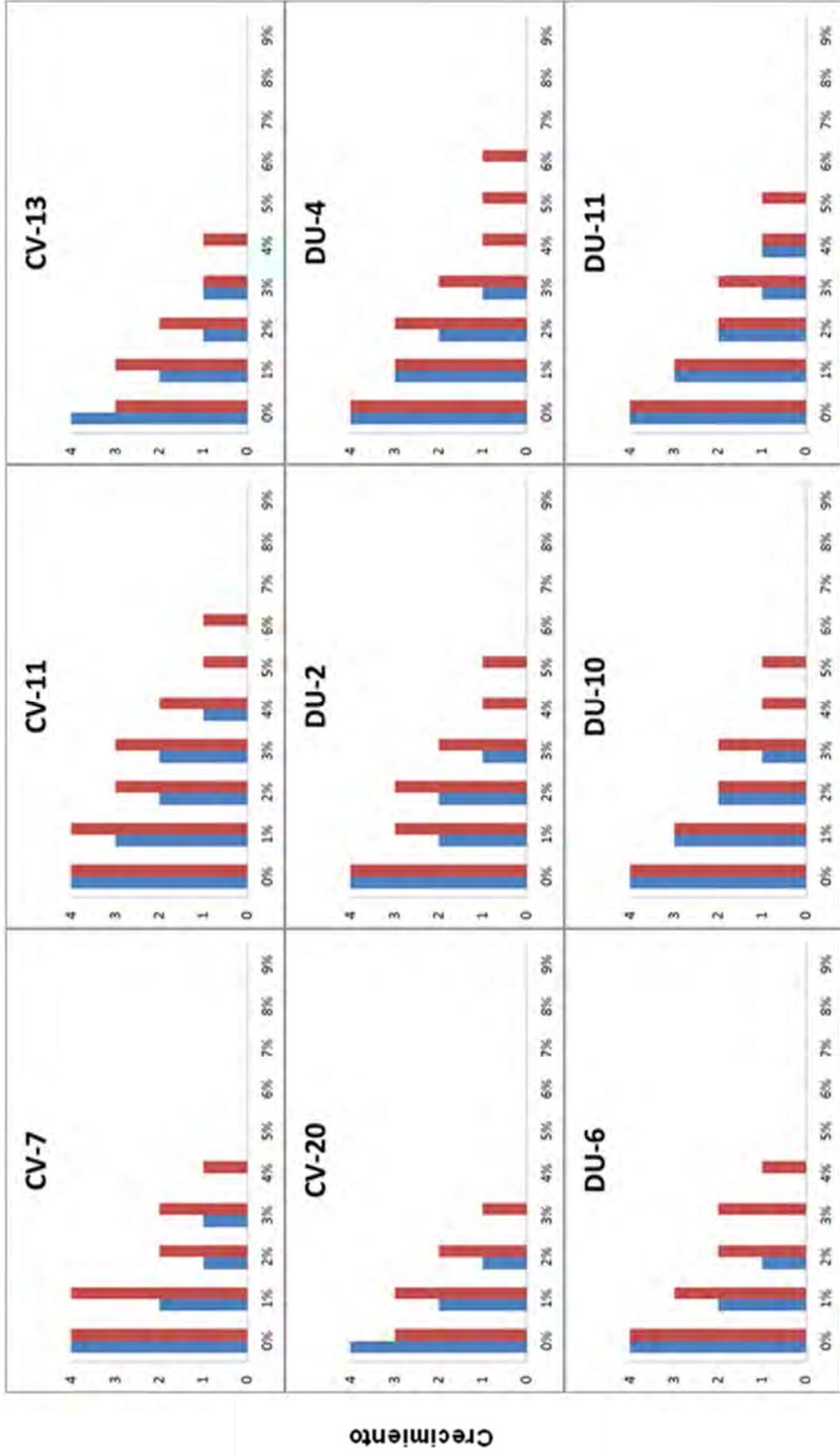
Gráficos 5. Crecimiento de los aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl y SM en medio GYM incubados a 30°C por 21 días



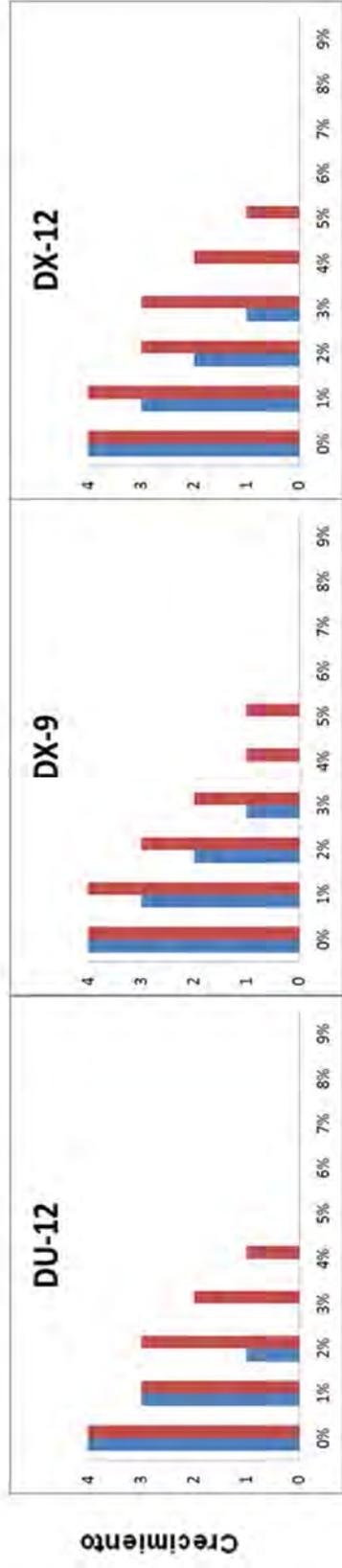
Concentración de sales

■ NaCl ■ SM

Gráficos 6. Crecimiento de los aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl y SM en medio GYM incubados a 30°C por 21 días.



Gráficos 7. Crecimiento de los aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl y SM en medio GYM incubados a 30°C por 21 días.



Concentración de sales



Gráficos 8. Crecimiento de los aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl y SM en medio GYM incubados a 30°C por 21 días.

6.2.1. Selección de concentraciones de NaCl y SM

En la tabla 10 se condensan los resultados de las curvas de tolerancia, presentando las concentraciones más elevadas en las que se obtuvo crecimiento con cada una de las sales en estudio, así como los aislados que crecieron en estas condiciones a los 21 días de incubación a 30°C.

Tabla 10. Resultados curvas de tolerancia.

	Concentración	Aislados
NaCl	4%	BA-18, BL-1, BL-3, BL-9, CV-11, DU-11
SM	7%	BD-3, BL-8, BL-9

6.3. Experimento 3: Efecto de la concentración de NaCl y SM en la actividad lipolítica

Con los resultados arrojado de los experimentos 1 y 2 se decidió continuar ahora combinando estos dos factores (ácidos grasos-concentración de sales) con el propósito de observar si la actividad lipolítica se inhibía por la adición de estas concentraciones o al contrario se veía estimulada.

6.3.1. Experimento A

Para el primer experimento de esta tercera fase se decidió utilizar medio de cultivo GYM suplementando con una concentración al 5% de ambas sales, por resultar ser el valor de concentración máxima promedio en la cual se obtuvo crecimiento. Por otro lado, se adiciono Tween 40 debido a que fue uno de los ácidos grasos en donde se observó mejor actividad lipolítica.

Tabla 11. Aislados que presentaron crecimiento y evaluación de actividad lipolítica a los 21 días de incubación a 30°C.

Cepa	NaCl		Sal marina	
	Crecimiento	Actividad lipolítica	Crecimiento	Actividad lipolítica
BA-1	-	NO	-	NO
BA-3	-	NO	-	NO
BA-9	-	NO	-	NO
BA-13	-	NO	+	NO
BA-15	-	NO	-	NO
BA-18	-	NO	+	NO
BD-1	-	NO	+	NO
BD-3	-	NO	-	NO
BL-1	-	NO	+	NO
BL-3	-	NO	+	NO
BL-4	-	NO	+	NO
BL-6	-	NO	-	NO
BL-8	-	NO	+	NO
BL-9	-	NO	+	NO
BL-10	-	NO	+	NO
BL-12	-	NO	+	NO
CV-4	-	NO	+	NO
CV-5	-	NO	-	NO
CV-7	-	NO	-	NO
CV-11	-	NO	-	NO
CV-13	-	NO	-	NO
CV-20	-	NO	-	NO
DU-2	-	NO	+	NO
DU-4	-	NO	+	NO
DU-6	-	NO	-	NO
DU-10	-	NO	+	NO
DU-11	-	NO	+	NO
DU-12	-	NO	-	NO
DX-9	-	NO	+	NO
DX-12	-	NO	+	NO

+: Crecimiento pobre
 -: Sin crecimiento

Los resultados arrojados en el experimento “A” nos indicaron una deficiencia en el crecimiento de los microorganismos y nula presencia de actividad lipolítica por lo que se decidió hacer una modificación en los factores abióticos analizados.

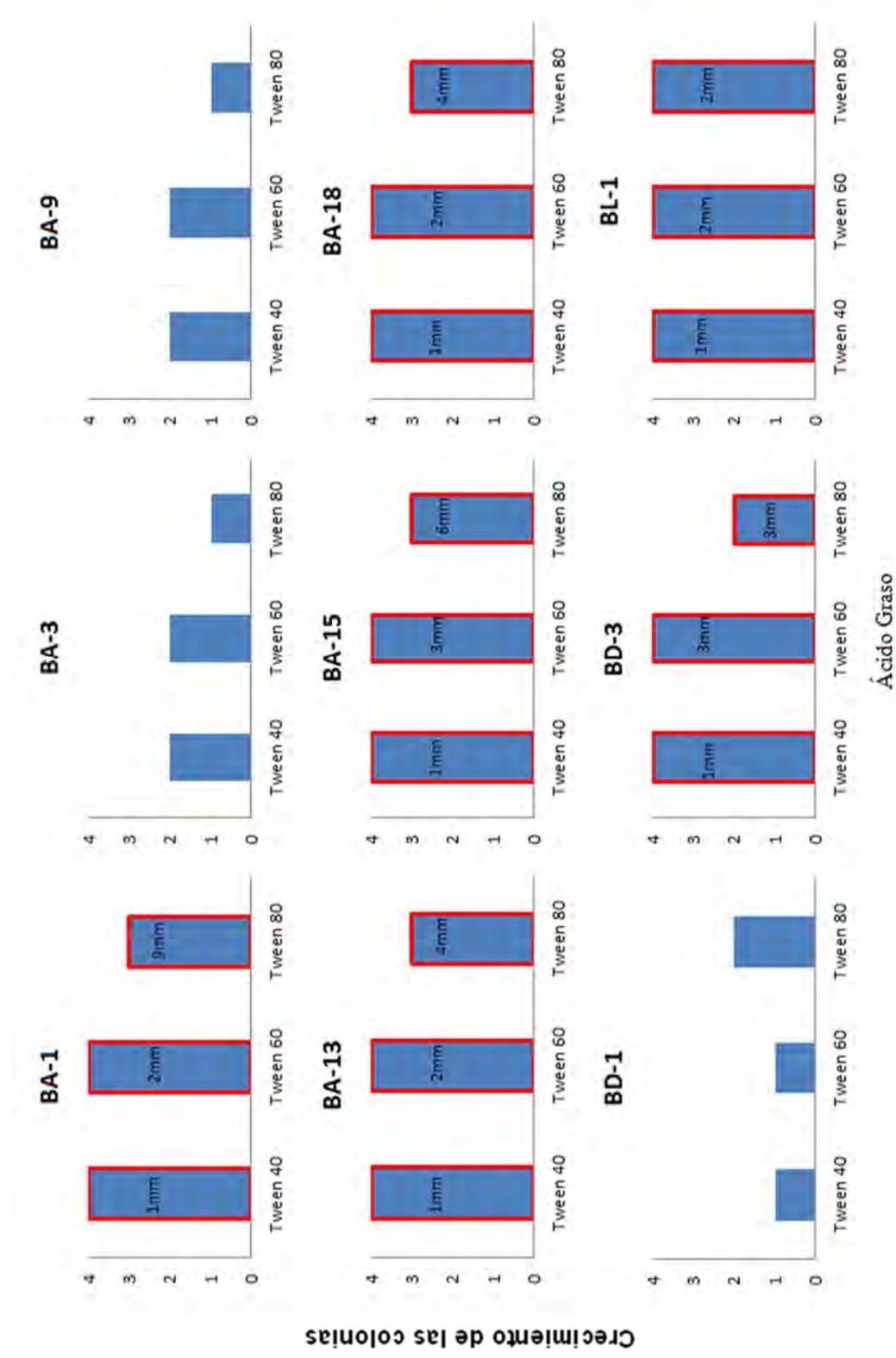
6.3.2. Experimento B

Utilizando GYM como medio de cultivo se realizaron 3 lotes a los que se le adicionó los ácidos grasos en los que se observó un mejor desempeño de actividad lipolítica (Tween 40, Tween 60, Tween 80). Se decidió trabajar únicamente con SM ya que los aislados presentaron una mayor tolerancia a esta sal, utilizando exclusivamente una concentración al 3.5%. Los resultados del crecimiento se observan en la tabla 12. Posteriormente se muestran graficados los datos para facilitar su análisis (graficas 9, 10, 11 y 12).

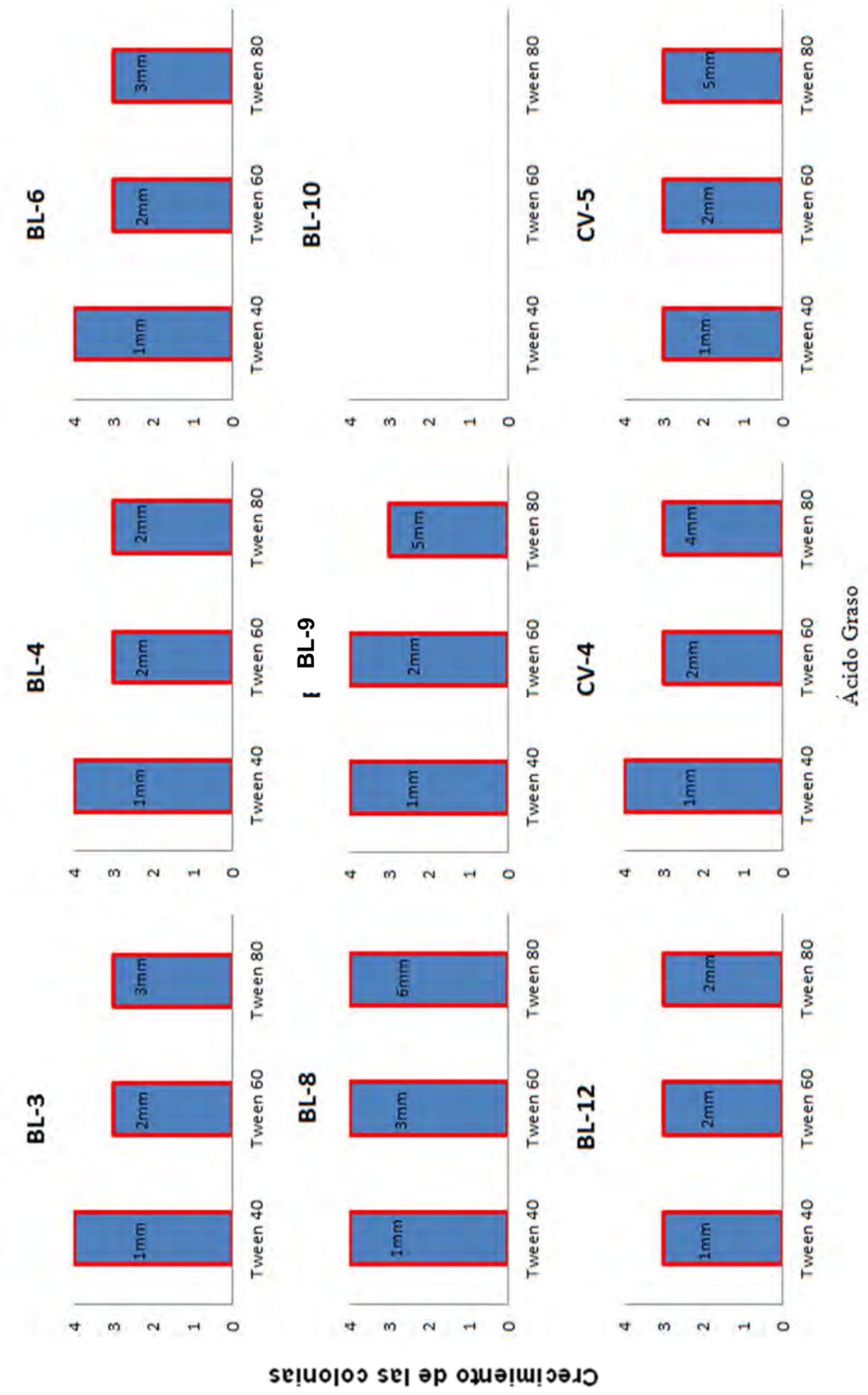
Tabla 12. Crecimiento de los aislados a 21 días de incubación 30°C

Aislado	Tween 40	Tween 60	Tween 80
BA-1	++++	++++	+++
BA-3	++	++	+
BA-9	++	++	+
BA-13	++++	++++	+++
BA-15	++++	++++	+++
BA-18	++++	++++	+++
BD-1	+	+	++
BD-3	++++	++++	++
BL-1	++++	++++	++++
BL-3	++++	+++	+++
BL-4	++++	+++	+++
BL-6	++++	+++	+++
BL-8	++++	++++	++++
BL-9	++++	++++	+++
BL-10	-	-	-
BL-12	+++	+++	+++
CV-4	++++	+++	+++
CV-5	+++	+++	+++
CV-7	++	++	+++
CV-11	++++	++++	+++
CV-13	++	++	++
CV-20	+	+	+
DU-2	++	++	++
DU-4	+++	+++	+++
DU-6	-	-	-
DU-10	++++	++++	+++
DU-11	++++	++++	+++
DU-12	++++	++++	+++
DX-9	++++	++++	+++
DX-12	++++	+++	+++

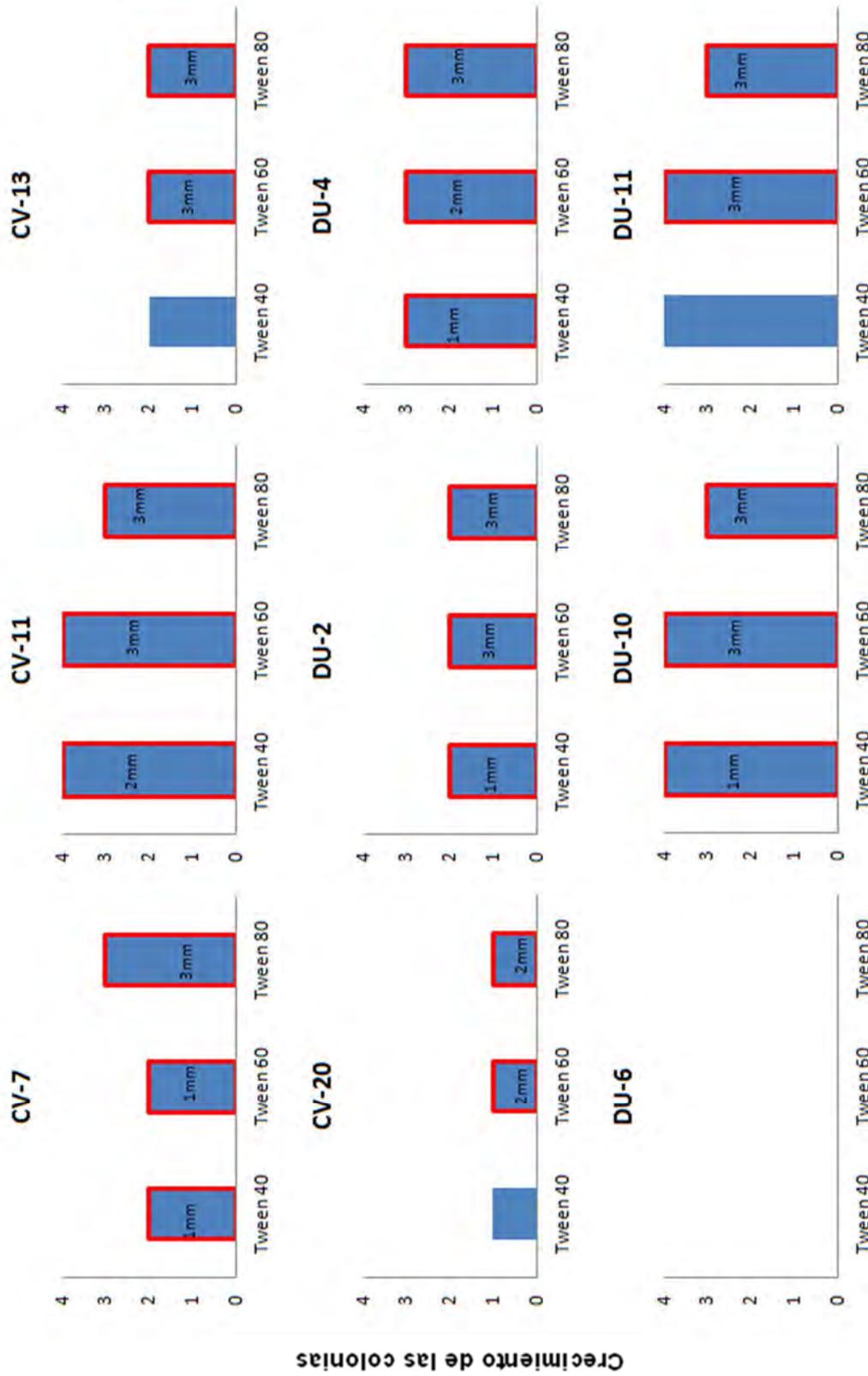
++++: Excelente crecimiento
 +++: Buen crecimiento
 ++: Crecimiento regular
 +: Crecimiento pobre
 -: Sin crecimiento



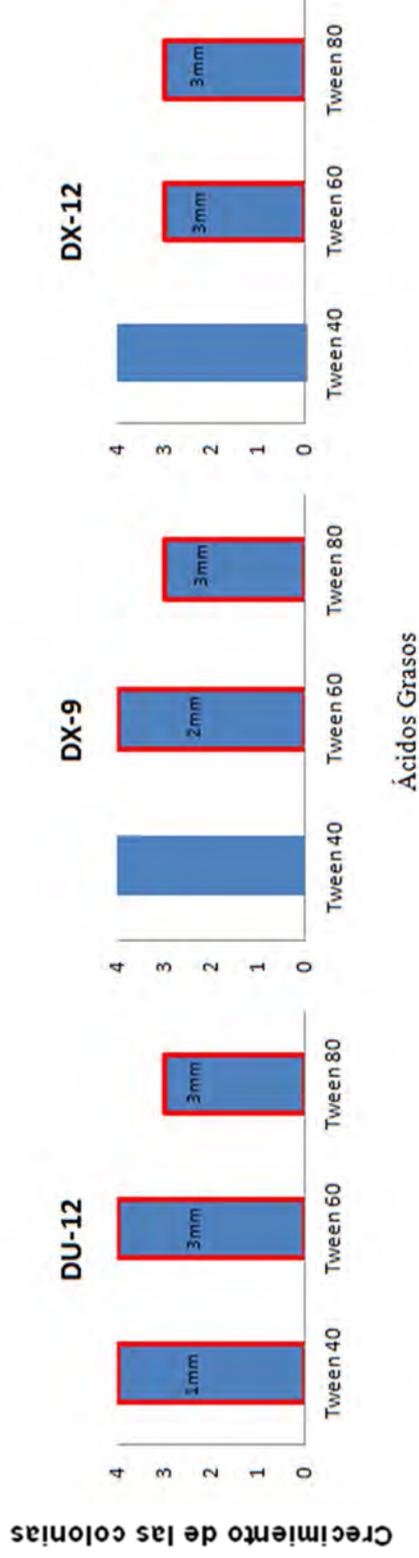
Gráficos 9. Crecimiento y presencia de actividad lipolítica de aislados. Medio GYM al 3.5% de SM, adicionado con ácidos grasos (T40, T60, T80), 21 días de incubación a 30°C. Los aislados productores de halo blanco se indican con línea roja. El diámetro de degradación de los diferentes ácidos grasos se encuentra señalado dentro de las barras.



Gráficos 10. Crecimiento y presencia de actividad lipolítica de aislados. Medio GYM al 3.5% de SM, adicionado con ácidos grasos (T40, T60, T80), 21 días de incubación a 30°C. Los aislados productores de halo blanco se indican con línea roja. El diámetro de degradación de los diferentes ácidos grasos se encuentra señalado dentro de las barras.



Gráficos 11. Crecimiento y presencia de actividad lipolítica de aislados. Medio GYM al 3.5% de SM, adicionado con ácidos grasos (T40, T60, T80), 21 días de incubación a 30°C. Los aislados productores de halo blanco se indican con línea roja. El diámetro de degradación de los diferentes ácidos grasos se encuentra señalado dentro de las barras.



Gráficos 12. Crecimiento y presencia de actividad lipolítica de aislados. Medio GYM al 3.5% de SM, adicionado con ácidos grasos (T40, T60, T80), 21 días de incubación a 30°C. Los aislados productores de halo blanco se indican con línea roja. El diámetro de degradación de los diferentes ácidos grasos se encuentra señalado dentro de las barras.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Evaluación de la actividad lipolítica

En la primera parte de este proyecto se evaluó exclusivamente la presencia de actividad lipolítica en 30 aislados marinos del género *Micromonospora*. En la mayoría de los medios de cultivo adicionados con los diferentes ácidos grasos se observó actividad lipolítica, al observar un diámetro de degradación (halos blancos u opacos) alrededor de las colonias o por debajo de éstas de acuerdo a lo reportado por Giudice *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. Este 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).

La actividad lipolítica evaluada en los medios con Tween 40, 60 y 80, se determinó como positiva para la mayoría de los aislados, sin embargo, hubo algunas que presentaron diámetros de degradación mayores durante el tiempo de estudio (15 días). A continuación se desglosan los resultados obtenidos.

En T40 se percibieron resultados notorios en los aislados BA-18, BD-1, BL-1, BL-9, CV-11, DU-11 y DU-12; todas estas cepas obtuvieron un diámetro en el halo de degradación iguales o mayores a 5 mm a los 15 días de incubación, lo que demuestra su alta actividad con este ácido graso. En este Tween, el único microorganismo que presentó actividad lipolítica desde los primeros 5 días de incubación, fue el aislado CV-11, el cual además presentó la mayor actividad entre todas las cepas al finalizar los 15 días de evaluación dando como resultado un diámetro de degradación de 14 mm.

Para el T60, durante los primeros 5 días de incubación, los aislados no presentaban un crecimiento considerable al ser comparadas con las cepas

inoculadas en T40 y T80, además no se observó evidencia de actividad lipolítica durante este tiempo. No obstante, al realizar la evaluación a los 10 días se percibió, no sólo un crecimiento óptimo de las colonias, sino también la presencia de halos de degradación en muchas de ellas. A los 15 días, se detectó actividad lipolítica en 21 de los 30 aislados. De los cuales los más representativos fueron BA-18, BD-1, BL-1, BL-9 y CV-11 ya que presentaron una mayor respuesta con valores del diámetro de degradación iguales o mayores a 5 mm.

Finalmente, con el ácido graso T80 se produjeron datos relevantes debido a que fue el sustrato con el que se presentó actividad lipolítica en 4 de los 30 aislados desde los primeros 5 días de incubación, alcanzando resultados favorables a 10 y 15 días. Con este ácido graso se registró un mayor porcentaje de aislados (33%) con alta actividad lipolítica al finalizar los 15 días de evaluación. Las cepas representativas fueron BA-18, BD-1, BL-1, BL-4, BL-6, BL-9, CV-11, DU-12, DX-9 y DX-12.

No todos los aislados produjeron este halo de degradación, por ejemplo, ninguna de las cepas sembradas en el MB con T20 presentó indicio de actividad lipolítica durante el tiempo de evaluación del proyecto. Es importante mencionar que en muchos de los casos en este grupo de cepas el crecimiento se mostró muy lento e inclusive nulo. Uno de los factores que posiblemente influenció en este resultado fue que los aislados se inocularon en Medio Basal, cuya composición nutricional es muy pobre, por lo que el Tween actuaría como una fuente de nutrientes al ser degradada por las enzimas lipolíticas secretadas por los microorganismos, pero esto no ocurrió. El T20 es un ácido graso de cadena corta y al no ser degradado se abre la posibilidad de que los aislados en estudio sinteticen “lipasas” las cuales tienen preferencia por sustratos como triacilgliceroles grandes (Fojan *et al.*, 2000), lo que explicaría los resultados obtenidos.

Los aislados inoculados en T85 mostraron crecimiento óptimo a los 15 días de incubación, al ser un ácido graso de cadena larga se esperaba que los aislados

presentaran actividad lipolítica (siguiendo la tendencia marcada en las anteriores determinaciones), sin embargo los resultados para esta actividad no fueron los esperados, con excepción de CV-11, ninguno de los microorganismos en estudio presentó actividad lipolítica en este Tween. Estos resultados son relativamente contradictorios a la tendencia observada en las anteriores determinaciones. No obstante podría verse justificada por las siguientes razones: 1) Existió algún tipo de inhibición de la enzima por iones metálicos, surfactantes aniónicos e inclusive por los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis previa de las mismas lipasas (Weete, 2002). 2) Otro posible factor es que la cantidad de sustrato adicionada no haya sido la suficiente, a este respecto, se ha reportado que las lipasas necesitan una concentración mínima de sustrato antes de presentar una gran actividad (Bornscheuer, 2002). 3) Por último, se observó que el tiempo en el que se obtuvo actividad lipolítica fue dependiente de cada ácido graso, por lo que se recomendaría incrementar el tiempo de incubación para determinar la posible actividad lipolítica de los aislados en estudio con Tween 85.

Dentro de la investigación, se puede constatar que hubo aislados que presentaron buena actividad lipolítica en los MB adicionados con Tween 40, 60 y 80, las cuales fueron; BA-18, BD-1, BL-1, BL-9 y CV-11. El aislado CV-11 destacó pues fue el que obtuvo los mejores resultados de actividad lipolítica e inclusive fue el único aislado en el que se observó esta actividad en el T85 a los 15 días de incubación.

Los resultados obtenidos en este primer experimento indicaron que los 30 microorganismos en estudio presentan capacidad de generar actividad lipolítica, siendo éste el objetivo principal de la primera fase, pero hasta éste punto no era posible afirmar si las enzimas producidas por los microorganismos son lipasas o esterases debido a que los sustratos bajo los que se presentó mejor actividad (T40, T60, T80) no son específicos para estas enzimas; es decir, T40 y T60 son ácidos grasos de cadena hidrocarbonada corta los cuales son preferidas por las esterases, por otro lado las lipasas prefieren ácidos grasos de cadena larga como es el caso del T8 (Fojan *et al.*, 2000).

7.2. Evaluación del crecimiento de los aislados sometidos a estrés salino

Con el objetivo de evaluar la capacidad de crecimiento de los aislados bajo condiciones de estrés, se realizó una modificación en los factores abióticos del medio de cultivo GYM, para lo cual se prepararon dos curvas de tolerancia a NaCl y SM.

La evaluación del crecimiento se efectuó comparando la cantidad de biomasa presente en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl y SM, usando como estándar el medio GYM al 0%, ya que durante este estudio se observó que sin la adición de sales en el medio se presentó un mejor crecimiento de los aislados, de esta forma la cantidad de biomasa obtenida en este lote se tomó como máximo para cada aislado. Calificándose de la siguiente forma; Excelente crecimiento (++++), Buen crecimiento (+++), Crecimiento regular (++) , crecimiento pobre (+) y sin crecimiento (-).

En la tabla 8 se muestran los resultados de crecimiento obtenidos para cada aislado con respecto al aumento de la concentración de NaCl. Se observó que a medida que aumenta la concentración de NaCl, disminuye la cantidad de biomasa de los aislados. En esta curva se valoraron las concentraciones al 0,1, 2, 3, 3.5, 4 y 5% de NaCl. Todos los aislados presentaron crecimiento bajo las concentraciones al 0, 1 y 2%, por otro lado, sólo algunos microorganismos crecieron al 3, 3.5 y 4% de concentración y ninguno de los aislados mostró crecimiento al 5%, lo que nos hace suponer que por encima de ésta concentración no habrá evidencia de desarrollo en los aislados. Es importante recalcar que uno de los puntos intermedios evaluados fue 3.5% de concentración, debido a que es la concentración salina promedio del mar, y sabiendo que las cepas fueron aislados de sedimentos marinos se esperaba que el crecimiento fuese óptimo, sin embargo, los resultados indicaron que únicamente 10 de los 30 aislados presentaron crecimiento bajo esta concentración y fue muy pobre.

Con los resultados de la tabla 8 se puede inferir que los aislados se clasifican como halotolerantes los cuales pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (DasSarma & Arora 2001). Recordemos que los aislados fueron inoculados en un medio nutritivo (GYM), un factor que dista mucho de las condiciones marinas de las que fueron aisladas, por lo que se este incremento en los nutrientes estimuló un mejor crecimiento de los aislado sobre todo en un ambiente con poco estrés (baja concentración de NaCl).

Los resultados para la curva de tolerancia a SM se muestran en la tabla 9 después de 21 días de incubación. Podemos observar que el crecimiento de los microorganismos es inversamente proporcional al incremento de la concentración de SM en el medio.

Se percibió que los aislados tuvieron una mayor tolerancia a la SM; ya que todos los microorganismos crecieron bajo las concentraciones al 0, 1, 2 y 3%, siendo 0 y 1% en donde se registró una mayor cantidad de biomasa a los 21 días de incubación. Por otro lado, con 4% de SM se observó que la mayoría de los aislados presentaron crecimiento. La cantidad de biomasa observada fue disminuyendo paulatinamente en las concentraciones al 5, 6 y 7% de SM, en esta última, sólo se evidenció crecimiento en las cepas BD-1, BD-3, BL-8 y BL-9. Debido la tolerancia observada se evaluaron las concentraciones 8% y 9% de SM obteniendo resultados negativos en ambos casos para todos los aislados.

En los gráficos 5, 6, 7 y 8 se compararon ambas curvas de tolerancia, se evidenció que las cepas presentaron una clara y mayor tolerancia a la SM a diferencia de NaCl, así mismo se observó que la adición de sales al medio afecta el crecimiento de los microorganismos.

Estudios anteriores (Dimroth 1987; Nakamura *et al.*, 1992; Kogure 1998; Häse *et al.*, 2001) indican que el requisito de sodio para el crecimiento está implicado como una característica primaria de los microorganismos marinos, no

obstante los resultados obtenidos en la tabla 8 mostraron una disminución del crecimiento de los microorganismos al exponerlos a NaCl, por lo tanto no significa que para el crecimiento de los aislados sea necesario que el medio de cultivo se deba suplementar con algún tipo de sal. Por otro lado, podemos apreciar que todos los aislados presentaron un mejor crecimiento en los medios de cultivo sin adición de sal (0%), lo cual resulta extraño y contradictorio al argumento de la estricta necesidad de sodio para el crecimiento, sin embargo estudios previos han precisado que los medios de cultivo comunes de laboratorio no están totalmente libres de contener sodio ya que las preparaciones comerciales contienen cantidades suficientes de agregado o contaminantes de iones Na^+ para apoyar el crecimiento apreciable de algunas bacterias marinas. En un estudio anterior realizado por Reichelt y Baumann (1974) se demostró que 1% de extracto de levadura y 1% de peptona contienen alrededor de 7,5 y 7,2 mM de Na^+ , respectivamente. MacLeod y colaboradores (1963) encontraron que 2% de agar contenía 9.2 mM del ion sodio. Lo anterior nos indica que el medio de cultivo GYM no forzosamente está exento de contener trazas de sodio. Por otro lado, el rango de salinidad óptimo de crecimiento de las bacterias también se relaciona directamente con la concentración de nutrientes presentes en el medio (Cánovas *et al.*, 1996), por lo que no necesariamente los aislados presentarían un crecimiento óptimo al ser sometido a la misma concentración SM, sí se inoculan en un medio cuya composición nutrimental es mayor y dista mucho de la encontrada en los sedimentos marinos.

Ahora bien, regresando a la comparación entre ambas sales (NaCl y SM) se evidenció un mejor desempeño en los aislados sembrados en medio GYM adicionado con SM. Además de sodio las bacterias marinas tienen requisitos de otros iones, tales como el potasio, el magnesio y calcio para el crecimiento (MacLeod 1965, 1968, 1971; Unemoto *et al.*, 1973; Nakamura *et al.*, 1992). Estos iones (K^+ , Mg^+ y Ca^+) han demostrado que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular y apoyan el crecimiento de las bacterias marinas (Johnson & Harvey 1938; MacLeod & Matula 1961, 1962; MacLeod 1965;

Unemoto *et al.*, 1973). Sabiendo que estos iones son parte de los componentes de la SM, no es de extrañar que los aislados sometidos a esta sal hayan presentado un mejor desempeño al crecer y mostraron una mayor tolerancia que al ser sometidos a NaCl el cual evidentemente tiene una deficiencia de estos iones.

7.3. Efecto de la concentración de sales sobre la actividad lipolítica

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores permitieron obtener los parámetros a combinar en este tercer experimento; con el objetivo de evaluar si existe inhibición o estimulación de la actividad lipolítica a ciertas concentraciones de sales.

Del “experimento 1” se seleccionaron aquellos ácidos grasos bajo los cuales se presentó mejor actividad lipolítica (T40, T60 y T80), así como la concentración promedio más elevada en las que se reportó crecimiento para ambas sales en el “experimento 2”. De este modo se decidió hacer la primera evaluación utilizando medio GYM como base, al que se le adicionó T40. Se realizaron dos lotes para cada una de las sales a evaluar (NaCl y SM) agregando una concentración del 5%.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos, donde se observó un crecimiento nulo de los aislados sembrados en medio GYM adicionado con T40 y 5% de NaCl. Si bien en la curva de tolerancia (tabla 8) no se presentó crecimiento bajo esta concentración de NaCl, se evaluó sí la adición del ácido graso incrementaba en el crecimiento de los aislados al verse obligados a producir enzimas lipolíticas. Por otro lado, el desarrollo de los aislados en medio GYM adicionado con T40 y 5% de SM, el crecimiento fue positivo para 17 de los 30 microorganismos, pero este crecimiento fue muy pobre y en ninguno de estos aislados se observó evidencia de actividad lipolítica. De acuerdo a lo anterior, resulta evidente que a pesar de estar en un medio enriquecido (GYM), la adición del ácido graso afectó el desarrollo de los microorganismos, los cuales además se encontraban en un ambiente estresante debido a la adición de sales.

Dado los resultados anteriores, se decidió hacer una modificación en los factores abióticos; utilizando únicamente SM y una concentración del 3.5% por ser el valor promedio de SM a la que se encontraban los aislados. Por otro lado, como sustratos se utilizaron los tres ácidos grasos en donde se reportó mejor actividad lipolítica en el “experimento 1”; Tween 40, 60 y 80.

Los resultados se muestran en la tabla 12. El crecimiento de las cepas se determinó haciendo comparaciones entre aislados, utilizando como referencia cepas inoculadas en medio GYM sin adición de sales ni ácidos grasos, dado que bajo estas condiciones el crecimiento de los 30 aislados fue mayor en el “experimento 2”. Al evaluar el crecimiento de los aislados inoculados en T40, T60 y T80 se observaron diferencias evidentes dependiendo del ácido graso adicionado, es decir; el mejor crecimiento se reportó en el medio adicionado con T40 obteniendo valores de crecimiento excelentes (++++) en la mayoría de los casos, así mismo para T60 se percibió un aumento en la cantidad de biomasa en la mayoría de los aislados siendo ligeramente inferior en algunos casos y se reportaron valores de crecimiento entre excelentes (++++) y buenos (+++). Por último el medio adicionado con T80 fue el que mostro los aislados con menor crecimiento con valores de crecimiento buenos (+++) en gran parte de los casos. Si cotejamos estos datos con los obtenidos en la curva de tolerancia (Tabla 9) en donde los valores de crecimiento para SM al 3.5% estuvieron entre un rango de crecimiento regular (++) y un crecimiento pobre (+). De este modo, se mostró que los aislados tuvieron un mejor desarrollo al ser sometidos a un menor estrés en especial en presencia de nutrientes.

Si bien en la curva de tolerancia de SM (tabla 9) no se evaluó el crecimiento al 3.5% de concentración, es posible interpolar los resultados obtenidos ya que éstos muestran una tendencia directamente proporcional.

Por otro lado, está claro que la mayoría de los aislados incrementaron su crecimiento con la adición de ácidos grasos; sin embargo, hubo microorganismos

que se vieron afectados por estas condiciones como fue el caso de los aislados BL-10 y DU-6 cuyo crecimiento se reportó como nulo con estos requerimientos.

Al evaluar la actividad lipolítica se observó una tendencia inversamente proporcional con respecto al crecimiento observado, así que los aislados que tenían como sustrato T80 fueron aquellos que presentaron valores mayores a 5 mm en el diámetro del precipitado en casi todos los aislados en comparación con aquellos expuestos al T60, cuyos valores fueron relativamente menores, salvo algunas excepciones (BD-1, BL-9 y CV-11) por último los aislados en presencia de T40 obtuvieron valores muy bajos de precipitado y en algunos casos no se reportó evidencia de éste.

Los resultados obtenidos para la actividad lipolítica nos muestran que las enzimas secretadas por la mayoría de los aislados tienen una preferencia por ácidos grasos de cadena larga (Tween 80), el cual al ser un monoéster de un ácido graso (ácido oleico), es un buen sustrato según lo reportado por Gomori (1949) y Verne (1952), lo que nos lleva a pensar que probablemente las enzimas presentes en estos aislados son lipasas.

Los microorganismos que mostraron mejor rendimiento para la actividad lipolítica en T80 fueron: BA-1, BA-15, BL-9 y CV-5. Al examinar los resultados en estas condiciones y de acuerdo a lo observado en el experimento 1 con MB se observaron notorias diferencias entre los aislados que presentaron mejor actividad en ambos ensayos (tabla 13). Es decir, el aislado CV-11 presentó excelente actividad en el experimento 1 y no figuró dentro de los mejores microorganismos en el experimento 3. Así mismo, observamos que el aislado BA-1 obtuvo una mayor actividad al estar en condiciones de estrés (experimento 3). Finalmente, podemos reportar que las cepas BA-15 y BL-9 presentaron buena actividad lipolítica en ambas evaluaciones, además el aislado BL-9 tuvo uno de los rangos de tolerancia más amplios al crecer con el 7% de SM.

Tabla 13. Comparación de resultados de actividad lipolítica

	Diametro de degradación (mm)	
	Experimento 1	Experimento 3
BA-1	2	9
BA-15	5	6
BA-18	12	4
BD-1	5	–
BL-1	6	2
BL-4	5	2
BL-6	5	3
BL-9	7	5
CV-5	3	5
CV-11	14	3
DU-12	9	3
DX-9	5	3
DX-12	5	3

Experimento 1.- MB adicionado con Tween 80, 14 días de incubación 30°C.

Experimento 3.- GYM adicionado Tween 80, 3.5% SM, 21 días de incubación 30°C.

Si recordamos los resultados del experimento 1, con los tres ácidos grasos que se evaluaron, se reportó un buen desempeño de actividad lipolítica, no obstante recordemos que en este estudio se utilizó medio basal (MB) que se caracteriza por su baja cantidad de nutrientes, por lo que probablemente este déficit nutritivo en el medio obligó a los microorganismos a degradar los ácidos grasos presentes y por ello la actividad fue positiva en T40, T60, T80.

La concentración de sal reportada en otros estudios sugiere que sin la adición de sal se debería presentar una mayor actividad lipolítica (Keneally *et al.*, 1988). Sin embargo, Giudice y colaboradores (2006) reportaron que los microorganismos con mayor actividad lipolítica presentaban mayor degradación con agua marina. Estos resultados, aparentemente contradictorios, coinciden con lo reportado en este estudio ya que hubo aislados que presentaron una mayor actividad lipolítica con la adición de sal y otros que tienen un mayor desempeño sin ella.

8. CONCLUSIONES

Después de haber realizado este proyecto donde se evaluó la actividad lipolítica de actinobacterias del género *Micromonospora* bajo diferentes ácidos grasos y estrés salino, se puede concluir lo siguiente:

- Las cepas en estudio mostraron actividad lipolítica con los ácidos grasos Tween 40, Tween 60 y Tween 80, durante los primeros 15 días de incubación a 30°C.
- Las concentraciones de NaCl y SM afectan el crecimiento de los aislados, sin embargo, éstos tienen una mayor tolerancia (mejor crecimiento) a la SM debido a la mezcla de iones presentes en ella.
- Existe una mayor degradación de T80 por lo que se podría sugerir que las enzimas secretadas por los aislados son lipasas, no obstante, éste es sólo un estudio preliminar, por lo que se requiere hacer experimentos adicionales como el aislamiento y la purificación de la enzima para su posterior caracterización.
- Se observó que los aislados presentan un mejor desempeño al ser sometidos a una situación de estrés como fue la adición de sales al medio de cultivo.

- De los 30 microorganismos, el aislado BL-9 presentó los mejores resultados en producción de actividad lipolítica y crecimiento bajo estrés, por lo que sería ideal su estudio a profundidad debido a que podría presentar características importantes para ser utilizada a nivel industrial.
- Se evidenció que la concentración de sales a la cual se genera mayor actividad lipolítica es dependiente de cada microorganismo, ya que algunos aislados presentaron un mejor desempeño en la degradación sin la adición de sales y en contra parte hubo otros que tuvieron mejor desempeño con la adición de éstas.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar la evaluación del efecto de las concentraciones sobre la actividad lipolítica, a 31 días de incubación, debido al aumento de la actividad observada con respecto al tiempo y verificar si esta actividad se ve modificada para cada aislado.
- Dado que éste fue un estudio preliminar, se recomendaría utilizar únicamente los aislados que presentaron mayor actividad lipolítica y realizar un segundo estudio, para evaluar cuantitativamente esta actividad y el efecto ante diferentes factores abióticos
- Realizar un árbol filogenético secuenciando los genes 16S y gyrB con las especies del género *Micromonospora* y los aislados que presentaron mejor actividad lipolítica en el estudio, para establecer exactamente la relación que existe entre las especies y los aislados así como para determinar sus distancias evolutivas.
- Realizar el aislamiento y la purificación de las enzimas utilizando aquellos microorganismos que presentaron una mayor degradación de ácidos grasos, identificando y caracterizando la enzima para corroborar si son lipasas o esterasas, de tal modo que pudieran ser candidatas a posibles usos industriales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Atlas RM. (1988). Microbiology: fundamentals and applications. Macmillan Publishing Co, New York, NY, 1-87
- Baltz, R. H. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe* 2: 125–131
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath. P. H. A., Stanley. J. T. (1994). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Zippincott Williams & Wilkings, USA.
- Bournscheur U.T. (2002). Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinon in Biotechnology* 13: 543 – 547
- Bournscheur, U.T., Kazlauska R. J. (2006). *Hydrolases inorganic synthesis: Regio- and Stereoselective B iotransformations*. 2° ed. Wiley – VCH V erlang GmbH & Co. KGaA. Weinheim. 61–74
- Bruni, V., Maugeri, T., Alonso, V., (1982). Lipolytic Activity of Marine Bacteria. Influence of NaCl and MgCl₂. *Marine Biology* 67: 113-119
- 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
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonkja, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J. (1996). Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bateriol*; 178: 7221-7226.
- Chen, J.C., Tsai, S.W. (2000). Enantioselective synthesis of (S)-bupofen ester produg in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on A currel M P 1000. *Biotechnology Progress*. 16: 986-992

- 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
- Cross, T. (1981). Aquatic actinomycetes—a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. 50: 397–423
- Das, R., Dufu, K., Romney, B., Feldt, M., Elenko, M., Reed, R. (2006). Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly. Genes Dev. 20: 1100–1109
- DasSarma, S. & P. Arora. (2001). Halophiles. Enciclopedia of Life Sciences. 2001 Nature Publishing Group/www.els.net: 1-9.
- Derewenda, U., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P., Joerger, R., Haas, M.J., Derewenda, Z.S. (1994). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. Journal of Lipid Research. 35: 514-534
- Dimroth, P. (1987). Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. Microbiol Rev. 51:320–340
- Embley, T. M., Hirt, R. P., Williams, D. M. (1994). Biodiversity at the molecular level: the domains, kingdoms and phyla of life. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 345:21–33
- Euzéby, J. P. (2012). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. [Last full update 31 March 2012]. <http://www.bacterio.cict.fr>
- 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

- Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N., Oki, T. (2002). Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J Antibiot (Tokyo)* 55:128–133
- Garcia-Urdiales, E., Rebolledo, F., Gotor, V., (2000). Enzymatic one-pot resolution of two nucleophile: alcohol and amine. *Tetrahedron-Asymmetry*. 11: 7
- Giudice, .L., Michaud, L., Pascale, D., De Domenico, M., Prico, 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
- Goodfellow, M., Kumar, Y., Maldonado, L.A. 2009. The genus *Gordonia*. *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag. Vol.5
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P. R. (2007). Phylogenetic diversity of gram-Positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Enviromental Microbiology*. 73: 3272-3282
- Gonzalez-Navarro, H., Ba, M. C., Abad, C. (2001). The closed/open model for lipase activation. Dressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. *Biochemistry* 40:3174-3183
- González, J. C., Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista latinoamericana de microbiología*. Vol 44. No.3-4: 137-156
- Grogan, G. (2008). Biotransformations. The royal Society of Chemistry. Annual Report on the Progress of CHEMISTRY. Section B. 104: 2011-233
- Hasan, F., Shah, A. A., Hammed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251

- Häse CC, Fedorova ND, Galperin MY, Dibrov PA. (2001). Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:353–370.
- Hirsch, A., Valdés, M. (2009). *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 536-542
- Hoskisson, P. A. (2002). *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837) growth, differentiation and antibiotic production. Tesis doctoral, Universidad Liverpool John Moores. Liverpool, Reino Unido.
- Hou, C. T. (1993). Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexyl butyrate. *J. Ind. Microbiol.* 11: 73-81
- Huang, H., Lv, J., Hu, Y., Fang, Z., Zhang, K. Bao, S. (2008). *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 17–20
- Igarashi, Y., Takagi, K., Kan, Y., Fujii, K., Harada, K. I., Furumai, T. & Oki, T. (2000). Arisostatins A and B, new members of tetrocardin class of antibiotics from *Micromonospora* sp. TP-A0316. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* 53: 233–240
- Illanes, A. (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Application*. Springer Verlag New York Inc. New York. pp 1- 39, 155 -169
- Ismet, A., Vikinesawary, S., Paramaswari, S., Wong, W.H., Ward, A., Seki, T., Fiedler, H. P., Goodfellow, M. (2004). Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 523-528
- Itoh, J., Watabe, H. O., Ishii, S., Gomi, S., Nagasawa, M., Yamamoto, H., Shomura, T., Sezaki, M. & Kondo, S. (1988). Sibanomicin, a new

pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp. J Antibiot (Tokyo) 41: 1281–1284

- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 13: 390-397
- Jendrossek, D., Tomasi, G., Kroppenstedt, R. M. (1997). Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? FEMS Microbiol. Lett. 150:179 –188
- Johnson, F. H., Harvey, E. N., (1938). Bacterial luminescence, respiration and viability in relation to osmotic pressure and specific salts of sea water. J Cell Comp Physiol. 11:213–232.
- 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
- Kawamoto, I. (1979). Antibiotics produced by the genus *Micromonospora*, p. 2-16. In The actinomycetologist, no. 35
- Kawamoto, I. (1984). Genus *Micromonospora*, p 2442–2450. In Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Kawamoto, I. (1989). Genus *Micromonospora*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4, pp. 2442–2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins

- Kazlauskas, R. (1994). Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects predicting and engineering catalytic properties. *Trends of Biotechnology*. 12: 464-472
- Keneally, P. M., Leuschner, R. G., Arendt, E. K. (1988). Evaluation of lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 839-846
- Kinoshita, K., Takenaka, S., Suzuki, H., Morohoshi, T. & Hayashi, M. (1992). Mycinamicins, new macrolide antibiotics. XII. Isolation and structures of novel fermentation products from *Micromonospora griseorubida* (FERM BP-705). *J Antibiot (Tokyo)* 45:1-9
- 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
- Koch, C., Kroppenstedt, R. M. Stackebrandt, E. (1996). Intrageneric relationships of the actinomycete genus *Micromonospora*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 383–387
- Koeller, K. M., Wong, C. H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232-240
- Kogure, K. (1998). Bioenergetics of marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 9: 278–282
- Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 173–199
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, Ch & Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Syst. And Appl. Microbiol*, 28: 328-329

- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 245-251
- 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
- Loughilin, W., (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*. 74: 49-62
- MacLeod, R. A., (1965). The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriology Reviews* 29: 9-23
- MacLeod, R. A., (1968). On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. In: Droop MR, Ferguson Wood EJ (eds) *Advances in microbiology of the sea*, vol 1. Academic Press, London, pp 95–126
- MacLeod, R. A., (1971) Salinity: bacteria, fungi, and blue-green algae. In: Kinne O (ed) *Marine ecology*, vol 1. Environmental factors, Part 2. Wiley Interscience, London, pp 689–703
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. (2009). *Brock. Biology of Microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings. Twelfth Edition, pp.1-1061
- 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*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1759–1766
- 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

- Maldonado, L. A., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Bull A, T., Goodfellow, M. (2008). Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94 (2): 289-298
- Maldonado, L. A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., Quintana, E., (2009). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95: 111-120
- Mincer, T.J., PR Jensen, Kauffman, C.A., Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5005-5011
- Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J., Pfaller, M., Tenover, R. (2003) *Manual of clinical microbiology*. ASM PRESS pp. 358
- Nakamura T, Kawasaki S, Unemoto T. (1992). Roles of K⁺ and Na⁺ in pH homeostasis and growth of marine J Gen Microbiol. 138(6):1271-6
- Olszewski, 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: 1441-1450
- Oskrov, J. (1923). Investigation in to the Morphology of the Ray fungi. Levin and Munksgaard. Copenhagen, Denmark
- 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
- Peña-Montes, C. (2009). Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en

Aspergillus nidulans. Tesis, Doctorado en Ciencias. Facultad de química. UNAM

- Pisano, M. A., Sommer, M. J., Brancaccio, L. (1989). Isolation of bioactive *actinomycetes* from marine sediments using rifampicin. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 609-6012
- Polaina, J., MaxCabe, A. P. (2007). *Industrial Enzymes: structure, function and applications*. Springer. Netherlands. pp. 263-315
- Pouilloux, Y., Abro, S., Vanhove, C., Barrault. (1999). Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins: Preparation of monoglycerides. *Journal of Molecular Catalysis*. 149:243-254
- Reetz, M.T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6:145-150
- Reichelt, J. L., Baumann, P. (1974). Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch. Mikrobiol*. 94:283--330
- Schrag J.D., Cygler M. (1997). Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods in Enzymology*. 284: 85-107
- Segura, M. (2011). Comparación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de actinomicetos terrestres y marinos. Tesis, Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Sharman, 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
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Intl. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 313-340

- 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* 2: 15-22
- Sijtsma, L., Swaaf, M. E. (2003). Production of polyunsaturade fatty acids by heterotrophic marine microorganisms en *Abstracts of Marine Biotechnology: Basics and Applications*. *Biomolecular Engineering* 20: 37-87
- Smith L. C., Faustinella F., Chan L. (1992). Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Current Opinion in Structural Biology*. 2: 490-496
- Soddell, J., Stainsby, F. M., Eales, K. L., Serviour, R .J. Goodfellow, M. (2006). *Gordonia defluvii* sp. Nov., an actinoycete isolatd 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 Natural Academy of Sciences* 103:12115-12120
- Solares, M. (2010). Evaluación de factores abióticos en la actividad lipolitica de aislados marinos del golfo de México. Tesis, Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM
- Stach, E. M., Bull, A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:3–9
- 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.
- Suarez, J., Hardisson, C. (1985). Morphological Characteristics of Colony Development in *Micromonospora chalcea*. *J Bacteriol*, 162: 1342-1244

- Thawai, C., Tanasupawat, S., Kudo, T. (2008). *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1516–1521
- Unemoto, T., Tsuruoka, T., Hayashi, M. (1973). Role of Na⁺ and K⁺ in preventing of a slightly halophilic *Vibrio alginolyticus*. *Can J Microbiol* .19: 563–571.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S., van Sinderen, D. (2007). Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 351–372
- Vergara, M. P. (2010). Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis, Maestría en Ciencias. Posgrado Ciencias Químicas. UNAM
- Verne, J. S., Hebert, O. De Charpal. (1952). Etude cytochimique de l'apparition de l'activity des esterases au cours du development chez le rat blanc. *C. R. Soc. Biol.* 146: 176-179
- Volcan, R., Vieira, R., Peixoto, B., da Silva, C., Campbell, S., Martins, O., Ceva, O. A., Gumaraes D. M. (2008). Immobilization of a recombinant thermostable esterase (2001) from a *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. *Biochemical Engineering Journal*. 39: 531-537
- Wagman, G. H., Marquez, J. A., Watkins, P. D., Gentile, F., Murawski, A., Patel, M. & Weinstein, M. J. (1976). A new actinomycin complex produced by a *Micromonospora* species: fermentation, isolation, and characterization. *Antimicrob Agents Chemother* 9: 465–469
- Waksman, A. S., Henrici, T. A. (1943). The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *Journal of bacteriology*. 46(4): 337-341

- Wang, C., Xu, X.-X., Qu, Z., Wang, H.-L., Lin, H.-P., Xie, Q.-Y., Ruan, J.-S. & Hong, K. (2011). *Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 320–324
- Weete, J. D. (2002). Microbial lipase en: Food lipids (Akoh, & Min, D.B.) Marcel Dekker, N.Y. pp. 814-829
- Wiseman, A. (1985). Manual de biotecnología de las enzimas. Acribia. España.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- Wohl, D. L., McArthur, J. V. (2001). Aquatic actinomycete-fungal interactions and their effects on organic matter decomposition: a microcosm study. *Microb. Ecol.* 42:446 –457
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 18:257-266
- Zhi, X.-Y., Li, W.-J., and 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." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:589-608
- Zurita, A. A. (2012). Evaluación de agar arroz como herramienta para la caracterización de bacterias de origen acuático. Tesis, Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM

11. APÉNDICE

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

Peptona Bacteriológica	1%
CaCl ₂	0.01%
Agar Bacteriológico	1.2%
pH	7.4

Medio GYM (Shirling & Gottlieb, 1966)

Glucosa	0.4%
Extracto de levadura	0.4%
Extracto de Malta	1%
CaCO ₃	0.2%
Agar Bacteriológico	1.2%
pH	6.8 - 7.2 (ajustar pH sólo con KOH)

Estandares de Mcfarland

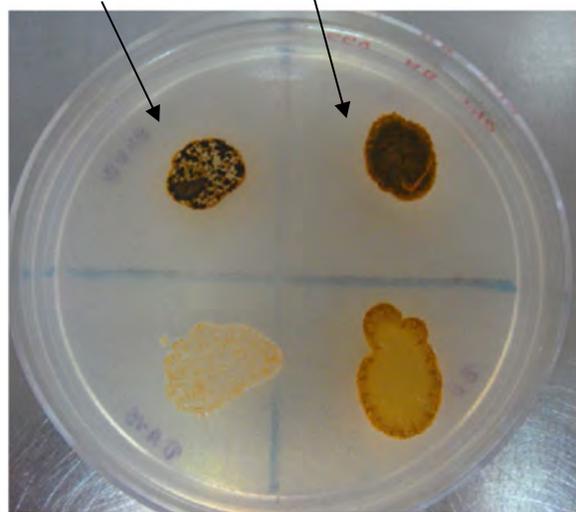
1. Se prepara una solución de BaCl_2 (SIGMA) al 1% y otra de H_2SO_4 puro (BAKER) al 1%
2. Estas 2 soluciones se ponen en las cantidades establecidas de acuerdo a la tabla 13 y se mezclan perfectamente en tubos de ensaye de rosca.
3. La densidad de cada tubo corresponde a la densidad de las suspensiones microbianas, indicadas en la siguiente tabla.

Tabla 14. Relacion entre los estandares de McFarland y las suspension bacteriana
(Murray *et al.*, 2003)

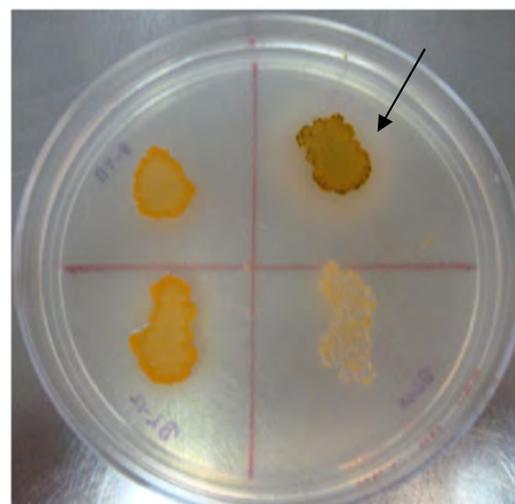
Estandar	Volumen BaCl_2 1% (ml)	Volumen H_2SO_4 1% (ml)	Suspension Bacteriana Correspondiente (10^8 UFC/ml)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

Representación visual de la degradación de ácidos grasos (Experimento 1).

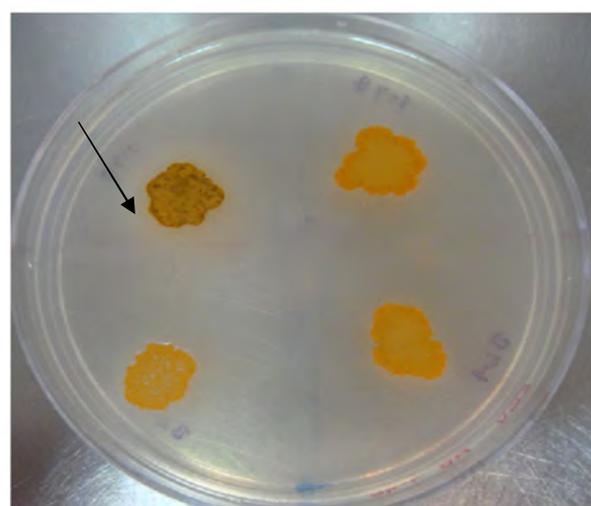
En las siguientes imágenes se muestra la actividad lipolítica de 16 aislados y se señalan con una flecha la presencia del precipitado.



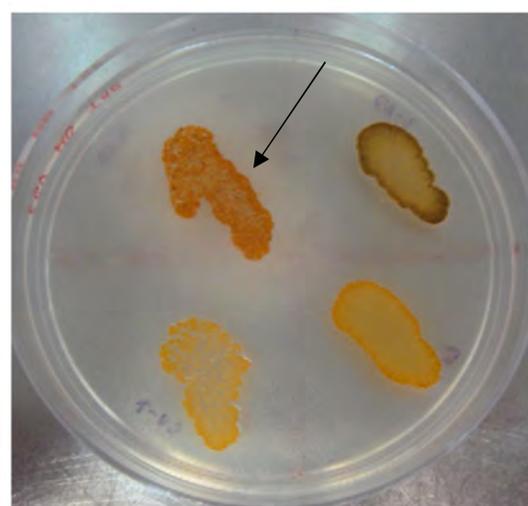
Cepas; BA-18, BD-1, BA-15 y BD-3



Cepas; BL-8, BL-9, BL-15 y BL-12

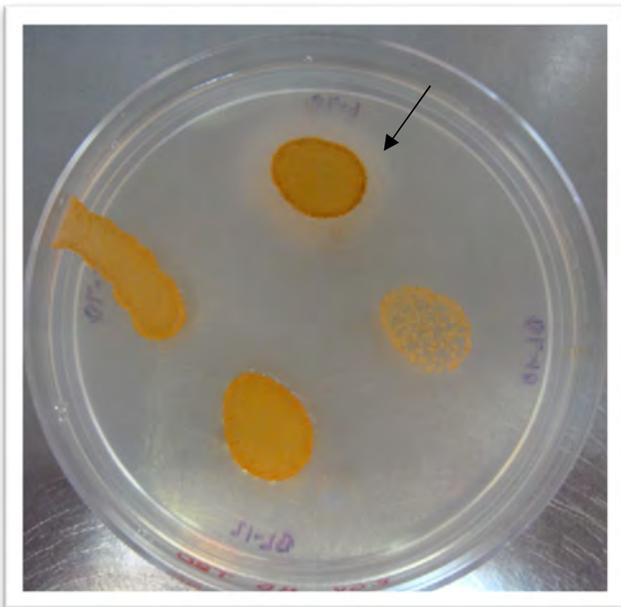


Cepas; BL-1, BL-3, BL-6 y BL-4

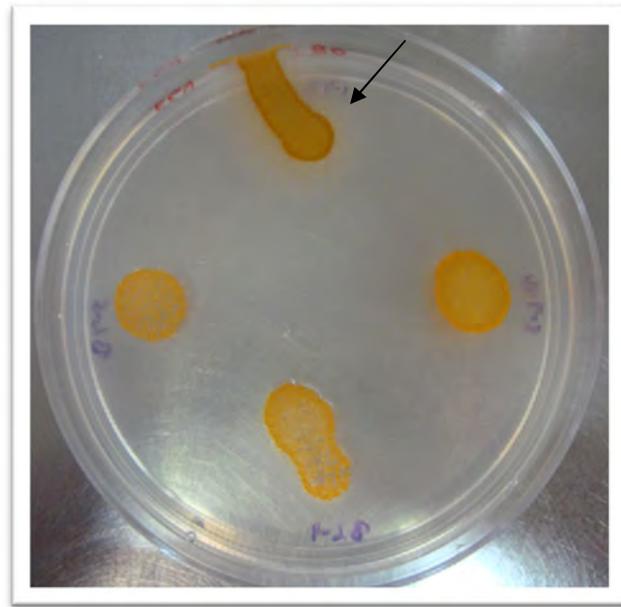


Cepas; CV-11, CV-4, CV-5 y CV-

Figura 6. Actividad lipolítica de los aislados más representativos, donde se observa el halo de degradación obtenido en MB Tween 40 a los 10 días de incubación a 30 °C.



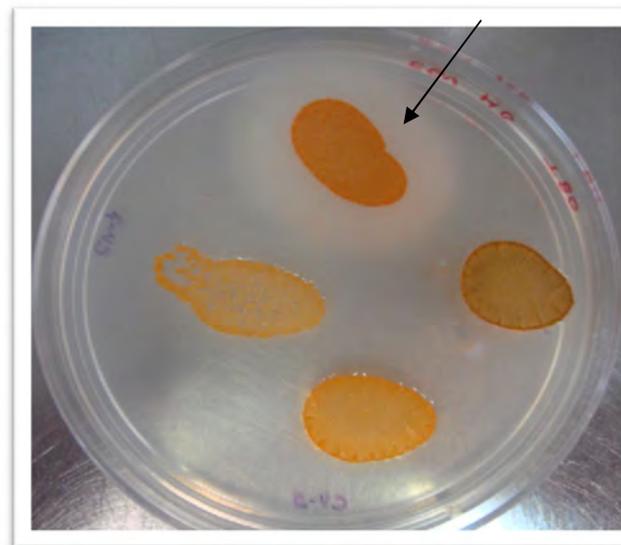
Cepas; BL-8, BL-9, BL10 y BL-12



Cepas; BL-1, BL-3, BL-4 y BL-6



Cepas; BA-3, BA-15, BD-1 y BD-3



Cepas; CV-4, CV-5, CV-7 y CV-11

Figura 7. Actividad lipolítica de los aislados más representativos, donde se observa el halo de degradación obtenido en MB Tween 80 a los 15 días de incubación a 30 °C.

Figura 8. Representación visual del crecimiento y actividad lipolítica (flecha) en presencia de diferentes ácidos grasos. En las siguientes imágenes se muestra el crecimiento y la actividad lipolítica de algunos de los aislados en estudio.

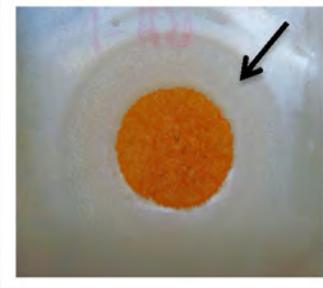
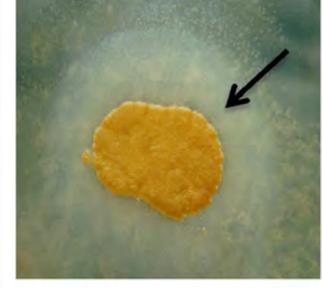
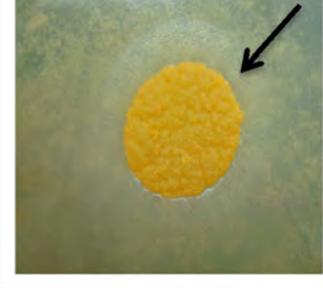
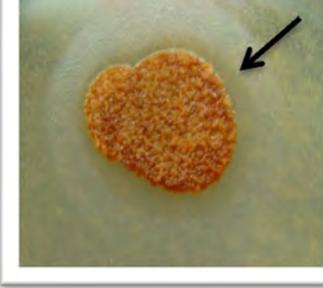
Aislado	Tween 40	Tween 60	Tween 80
BA-1			
BA-13			
BA-15			
BA-18			

Figura 9. Representación visual del crecimiento y actividad lipolítica (flecha) en presencia de diferentes ácidos grasos. En las siguientes imágenes se muestra el crecimiento y la actividad lipolítica de algunos de los aislados en estudio.

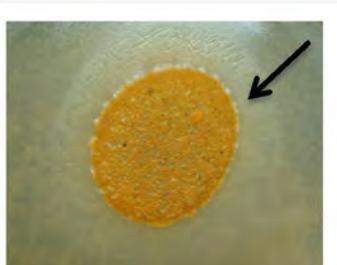
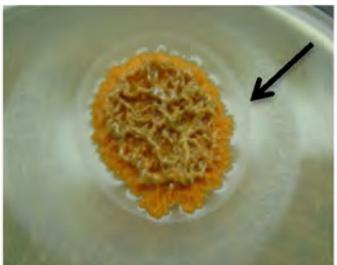
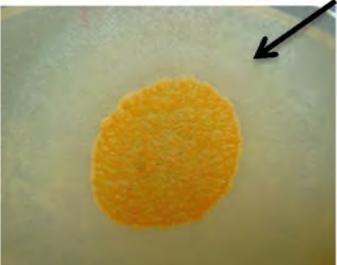
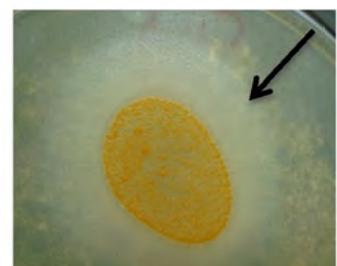
Aislado	Tween 40	Tween 60	Tween 80
BL-8			
BL-9			
CV-4			
CV-5			

Tabla 15. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl, 7 días de incubación 30°C

Aislado	0%	1%	2%	3%	3.5%	4%	5%
BA-1	++++	++	+	-	-	-	-
BA-3	++++	+	-	-	-	-	-
BA-9	++++	+	-	-	-	-	-
BA-13	++++	++	+	-	-	-	-
BA-15	++++	++	+	-	-	-	-
BA-18	++++	+++	++	+	-	-	-
BD-1	++++	++	+	-	-	-	-
BD-3	++++	++	+	-	-	-	-
BL-1	++++	+++	++	+	-	-	-
BL-3	++++	+++	++	+	-	-	-
BL-4	++++	+	-	-	-	-	-
BL-6	++++	++	+	-	-	-	-
BL-8	++++	+++	++	-	-	-	-
BL-9	++++	+++	++	+++	-	-	-
BL-10	+++	+	-	-	-	-	-
BL-12	++++	++	+	-	-	-	-
CV-4	++++	+++	++	+	-	-	-
CV-5	++++	++	+	-	-	-	-
CV-7	++++	++	-	-	-	-	-
CV-11	++++	+++	++	+	-	-	-
CV-13	++++	++	+	-	-	-	-
CV-20	++++	++	+	-	-	-	-
DU-2	++++	+++	++	++	+	-	-
DU-4	++++	++	+	-	-	-	-
DU-6	++++	++	-	-	-	-	-
DU-10	++++	++	+	-	-	-	-
DU-11	++++	++	+	+	-	-	-
DU-12	++++	++	-	-	-	-	-
DX-9	++++	++	+	-	-	-	-
DX-12	++++	++	+	-	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

Tabla 16. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de NaCl, 14 días de incubación 30°C

Aislado	0%	1%	2%	3%	3.5%	4%	5%
BA-1	++++	++	+	-	-	-	-
BA-3	++++	+	-	-	-	-	-
BA-9	++++	+	-	-	-	-	-
BA-13	++++	++	+	-	-	-	-
BA-15	++++	++	+	-	-	-	-
BA-18	++++	+++	++	+	+	-	-
BD-1	++++	++	+	-	-	-	-
BD-3	++++	++	+	+	-	-	-
BL-1	++++	+++	++	++	+	+	-
BL-3	++++	+++	++	+	-	-	-
BL-4	++++	+	-	-	-	-	-
BL-6	++++	++	+	-	-	-	-
BL-8	++++	+++	++	+	+	-	-
BL-9	++++	+++	++	++	+	-	-
BL-10	+++	+	+	-	-	-	-
BL-12	++++	++	+	-	-	-	-
CV-4	++++	+++	++	+	+	-	-
CV-5	++++	++	+	-	-	-	-
CV-7	++++	++	+	-	-	-	-
CV-11	++++	+++	++	++	+	+	-
CV-13	++++	++	+	-	-	-	-
CV-20	++++	++	+	-	-	-	-
DU-2	++++	++	+	+	+	-	-
DU-4	++++	+++	++	+	-	-	-
DU-6	++++	++	+	-	-	-	-
DU-10	++++	+++	++	+	-	-	-
DU-11	++++	+++	++	+	+	+	-
DU-12	++++	++	+	-	-	-	-
DX-9	++++	++	+	-	-	-	-
DX-12	++++	+++	++	+	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

Tabla 17. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de sal marina 7 días de incubación 30°C

Aislado	0%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%
BA-1	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
BA-3	++++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
BA-9	++++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
BA-13	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
BA-15	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
BA-18	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
BD-1	++++	++	++	+	+	+	+	+	+	-
BD-3	++++	+++	++	+	+	+	+	+	-	-
BL-1	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BL-3	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BL-4	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
BL-6	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
BL-8	++++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-
BL-9	++++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
BL-10	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BL-12	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
CV-4	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
CV-5	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
CV-7	++++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
CV-11	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
CV-13	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
CV-20	++++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
DU-2	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
DU-4	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
DU-6	++++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
DU-10	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
DU-11	++++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-
DU-12	++++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
DX-9	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
DX-12	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

Tabla 18. Crecimiento de aislados sometidos a diferentes concentraciones de sal marina 14 días de incubación 30°C

Aislado	0%	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%
BA-1	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-
BA-3	++++	++++	+++	++	-	-	-	-	-	-
BA-9	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
BA-13	++++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-
BA-15	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
BA-18	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
BD-1	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	+	-
BD-3	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	-	-
BL-1	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-
BL-3	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
BL-4	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
BL-6	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
BL-8	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	-	-
BL-9	++++	++++	+++	++	++	+	+	+	-	-
BL-10	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
BL-12	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
CV-4	++++	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-
CV-5	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
CV-7	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
CV-11	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
CV-13	++++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
CV-20	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
DU-2	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
DU-4	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
DU-6	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-
DU-10	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
DU-11	++++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
DU-12	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
DX-9	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
DX-12	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

Tabla 19. Crecimiento y Actividad lipolítica de aislados utilizando distintas fuentes de sustrato en medio GYM con 3.5% SM 7 días de incubación 30°C

Aislado	Tween 40	D.D. (mm)	Tween 60	D.D. (mm)	Tween 80	D.D. (mm)
BA-1	+++	-	+++	-	+++	-
BA-3	-	-	-	-	-	-
BA-9	-	-	-	-	-	-
BA-13	+++	-	+++	-	+++	-
BA-15	++	-	++	-	+	-
BA-18	+++	-	+++	-	+++	-
BD-1	-	-	-	-	+	-
BD-3	+++	-	+++	-	++	-
BL-1	+++	-	+++	-	+++	-
BL-3	+++	-	+++	-	+++	-
BL-4	++	-	++	-	+	-
BL-6	-	-	-	-	-	-
BL-8	++	-	++	-	++	-
BL-9	+++	-	+++	-	+++	-
BL-10	-	-	-	-	-	-
BL-12	+	-	+	-	+	-
CV-4	+++	-	+++	-	+++	-
CV-5	++	-	++	-	++	-
CV-7	+	-	+	-	+	-
CV-11	-	-	-	-	-	-
CV-13	+	-	+	-	+	-
CV-20	-	-	+	-	+	-
DU-2	++	-	+++	-	+++	-
DU-4	+	-	++	-	++	-
DU-6	-	-	-	-	-	-
DU-10	+++	-	+++	-	+++	-
DU-11	+++	-	+++	-	+++	-
DU-12	+++	-	+++	-	+++	-
DX-9	++	-	++	-	++	-
DX-12	+++	-	+++	-	+++	-

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

D.D.= Diámetro de degradación

Tabla 20. Crecimiento y Actividad lipolítica de aislados utilizando distintas fuentes de sustrato en medio GYM con 3.5% SM 14 días de incubación 30°C

Aislado	Tween 40	D.D. (mm)	Tween 60	D.D. (mm)	Tween 80	D.D. (mm)
BA-1	++++	-	++++	1	+++	3
BA-3	++	-	++	-	+	-
BA-9	++	-	++	-	+	-
BA-13	++++	-	++++	-	+++	2
BA-15	++++	-	++++	1	+++	1
BA-18	++++	-	++++	1	+++	-
BD-1	+	-	+	-	++	-
BD-3	++++	-	++++	1	+++	-
BL-1	++++	-	++++	2	+++	2
BL-3	++++	-	+++	2	+++	2
BL-4	+++	-	++	1	++	1
BL-6	++	-	++	-	+++	-
BL-8	+++	-	+++	2	+++	2
BL-9	++++	-	++++	3	+++	2
BL-10	-	-	-	-	-	-
BL-12	+++	-	+++	2	+++	1
CV-4	++++	-	++++	2	++++	2
CV-5	+++	-	+++	2	+++	3
CV-7	++	-	+++	-	+++	1
CV-11	+++	-	+++	2	++	-
CV-13	++	-	+++	2	++	2
CV-20	+	-	+	-	+	-
DU-2	+++	-	+++	1	+++	2
DU-4	+++	-	+++	2	+++	2
DU-6	-	-	-	-	-	-
DU-10	++++	-	++++	2	++++	2
DU-11	++++	-	++++	2	++++	2
DU-12	++++	-	++++	2	++++	2
DX-9	++++	-	++++	2	+++	1
DX-12	++++	-	++++	2	++++	2

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

D.D.= Diámetro de degradación