



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

**AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
PRODUCTORES DE LIPASA DE SUELO DE LA ZONA DE MINDO -
NAMBILLO Y PUERTO QUITO**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor guía

M.Sc. Ing. Fernando Xavier Rivas Romero

Autor

Francisco Paúl Sotaminga Ripalda

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

.....
Fernando Xavier Rivas Romero
Ingeniero en Biotecnología M.Sc.
C.I. 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

.....
Francisco Paúl Sotaminga Ripalda
C.I. 1720590395

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores en especial a Rommel Granja, Fernando Rivas y Emilia Vásquez por su apoyo y confianza para culminar la presente tesis.

A los laboratorios de docencia de la Universidad de las Américas que siempre me dieron su apoyo y colaboración desinteresada.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos

RESUMEN

Las lipasas son enzimas que hidrolizan a los triglicéridos hasta ácidos grasos y glicerol. Su uso en el Ecuador es limitado debido a los altos costos, por lo cual se ha buscado aislar un microorganismo productor de esta enzima que pueda sustituir a lipasas comerciales. A partir de muestras de suelo obtenidas en la zona de Mindo – Nambillo y Puerto Quito se aislaron microorganismos en medio mineral y aceite vegetal estéril como única fuente de carbono y se seleccionaron los aislados que producen un halo fluorescente en luz ultravioleta, el cual evidencia una reacción del indicador rodamina β y la actividad lipolítica del microorganismo. Para seleccionar los aislados que posean mayor actividad se consideraron el tamaño del halo fluorescente que produce el sobrenadante de cada uno en medios de cultivo con rodamina β . Posteriormente se identificaron algunos aislados mediante pruebas bioquímicas y se creó un banco de microorganismos productores de lipasa. El presente trabajo busca sentar una base para el desarrollo de producción de esta enzima en el país a partir de microorganismos productores autóctonos como fuente de una enzima con alta actividad lipolítica que sirva para reemplazar a lipasas comerciales a nivel de laboratorio e industria para disminuir el costo en el uso de las enzimas en el proceso en el que intervengan. Se aislaron 17 microorganismos con el ensayo de rodamina β , el 43% aislados de la muestra del suelo del bosque de Mindo-Nambillo y el 57% restante de las muestras de suelo de la plantación de palma africana en Puerto Quito. Los aislados fueron seleccionados y clasificados por el diámetro del halo que produce su actividad enzimática lipolítica. Los aislados fueron conservados en crioviales a -80°C .

ABSTRACT

Lipases are enzymes that hydrolyze triglycerides to fatty acids and glycerol. In Ecuador their use is limited due to the high costs. This research aimed to isolate a microorganism producing this enzyme that can replace commercial lipases. From soil samples obtained in Mindo - Nambillo and Puerto Quito microorganisms in mineral medium and sterile vegetable oil as carbon source were isolated, they are selected that produce a fluorescent halo in ultraviolet light, which evidences a reaction of rhodamine β dye and lipolytic activity of the microorganism. To select isolates having higher activity size fluorescent halo supernatant produced in each culture media with rhodamine β . Subsequently each isolate was identified biochemical tests. This paper seeks to provide a basis for the development of production of this enzyme in the country from native lipase producing microorganisms as a source of enzyme high lipolytic activity that serves to replace commercial lipases in the laboratory and industry to reduce the cost in the process involved. Additionally, it is contemplated to prepare a collection of lipase producing microorganisms identified and characterized for use and future studies in the laboratory. It was isolated 17 organisms to test rhodamine β , 43% of isolates from sample of Mindo – Nambillo forest and 57% from soil of African palm plantation on Puerto Quito. They were selected by the diameter of the halo that produces its lipolytic enzyme activity. Isolates were store in cryovials at -80°C .

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3 Justificación.....	2
1.4 Objetivo General	4
1.5 Objetivos específicos.....	4
2. Capítulo II. Marco Teórico.....	5
2.1 Lípidos.....	5
2.2 Lipasas: generalidades.....	5
2.3 Importancia y uso de las lipasas.....	6
2.4 Microorganismos productores de lipasa	8
2.5 Lipasas bacterianas.....	8
2.6 Medios y condiciones de cultivo	10
2.7 Actividad lipolítica y rodamina β	10
2.8 Rodamina β	10
2.8.1 Ensayo en placa de rodamina β	11
2.9 Identificación bacteriana.....	11
3. Capítulo III. METODOLOGÍA	12
3.1 Toma de muestra	12
3.2 Estandarización de protocolo para medio mineral y rodamina β	13
3.3 Tratamiento de las muestras de suelo.....	13
3.4 Aislamiento de microorganismos productores de lipasa.....	14

3.5 Selección de microorganismos con mayor producción de lipasa.....	15
3.6 Identificación de microorganismos productores de lipasa.....	15
3.7 Conservación de microorganismos.....	15
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1 Aislamiento de microorganismos productores de lipasas.....	16
4.2 Selección de microorganismos con mejor producción de lipasa.....	18
4.3 Identificación de microorganismos productores de lipasa.....	23
4.4 Conservación de microorganismos productores de lipasa.....	25
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29
ANEXOS.....	36

Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

La Biotecnología ha experimentado grandes avances que se han visto reflejados en muchas de sus aplicaciones industriales tales como es la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos (Rivera y García, 2007).

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol. Bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa y poseen propiedades catalíticas que han convertido a estas enzimas en productos de suma importancia para la industria (Hernández et al., 2001; Coca, Dustet y Martínez, 2007).

El creciente interés por las lipasas reside principalmente en las aplicaciones industriales de este tipo de enzima, incluyendo la formulación de detergentes, su empleo en degradación de grasas, para la síntesis de productos farmacéuticos y cosméticos (Rohit et al., 2001). Las lipasas se pueden adquirir de muchas fuentes naturales, como plantas, microorganismos y animales. Sin embargo, las lipasas de mayor interés son las que se extraen a partir de los microorganismos, ya que las lipasas microbianas son productos extracelulares y poseen la capacidad de catalizar una amplia variedad de reacciones en fase acuosa y no acuosa (Saxena et al., 2003).

Existen problemas asociados con el uso sistemático y de control en el uso de las enzimas. La composición de la enzima y las condiciones que se emplean para el proceso enzimático, son definitivos para obtener buenos resultados de conversión y obtención de un producto final (Dinorín, 2009).

El aislamiento de nuevos microorganismos productores de enzimas lipasas y el establecimiento de las condiciones de producción de las mismas, a partir de

fuentes naturales autóctonas constituye un aporte biotecnológico significativo y propone una alternativa a la adquisición de enzimas comerciales.

1.2 Planteamiento del problema.

Entre las aplicaciones de mayor utilidad en la Biotecnología se puede considerar a la producción y uso de las enzimas. Las enzimas son compuestos de naturaleza proteica, llamados biocatalizadores presentando ventajas al uso de los catalizadores químicos en los procesos por tener una alta especificidad y selectividad, otra de las ventajas es la temperatura baja en consideración de las reacciones con catalizadores químicos para la ejecución del proceso evitando así la elaboración de productos secundarios obteniendo rendimientos de producción más altos.

La Biotecnología Industrial ha avanzado a grandes pasos no solo a nivel mundial sino también en el país. En la actualidad es imperioso el empleo de enzimas para desarrollar procesos que impliquen la obtención de fuentes de energía renovable, la síntesis de reactivos y productos industriales, farmacéuticos, cosméticos y de uso cotidiano.

Actualmente el problema a nivel nacional es el alto costo comercial que tienen las enzimas de uso industrial como las lipasas y el grado de dificultad y tiempo de adquisición de estas enzimas para su uso en los laboratorios e industrias del país, provocando que se encarezca el producto final e inclusive no se llegue a una producción nacional.

1.3 Justificación

Las enzimas y su uso se han conocido desde hace varios años. Existe un campo de aplicación variado de las enzimas en varias industrias, tales como alimentos, productos lácteos, detergentes, textiles, papel, cuero, cosméticos, entre otros (Rohit et al., 2001).

Las aplicaciones de las enzimas han aumentado considerablemente. En el año 2013 en el mercado se invirtió cerca de \$ 4800 millones proyectando una inversión de aproximadamente \$ 7100 millones para el año 2018 (BCC

Research, 2014). El interés en las lipasas ha crecido gradualmente, debido a que las reacciones en las que intervienen obtienen un alto grado de especificidad, disminución de reacciones secundarias en los procesos, enantioselectividad, regioselectividad y facilidad en la recuperación, procesos en la industria alimentaria en su mayoría, fabricación de detergentes, tratamiento de aguas de desecho, eliminación de lípidos y aceites de la industria (Padilha et al., 2012).

Por su capacidad de catalizar reacciones de transesterificación las lipasas han adquirido importancia en la producción de biocombustibles por tratarse de una fuente de energía amigable con el ambiente (Diez E., Sandoval M., 2012).

Los costos elevados y los tiempos prolongados en la importación de esta clase de materiales han sido el mayor obstáculo en el uso de las lipasas en la industria ecuatoriana, laboratorios educativos y de investigación y desarrollo.

La naturaleza ofrece una amplia fuente de microorganismos productores de lipasa los cuales se pueden aislar de agua, suelo contaminado con aceite, desechos o residuos de aceite, una de las ventajas de estos microorganismos es que la producción de la lipasa es extracelular facilitando su proceso de purificación. (Diez, A. et al. 2012).

Es por tal motivo que el presente trabajo se enfoca en la búsqueda de diferentes microorganismos de lipasa autóctonos como fuente alternativa, que faciliten la reducción de costos para el reemplazo de uso de lipasas comerciales que han limitado realizar investigaciones más profundas respecto a lipasas y sus procesos.

1.4 Objetivo General

Caracterizar microorganismos productores de lipasa autóctonos aislados de muestras de suelo de la zona de Mindo – Nambillo y Puerto Quito.

1.5 Objetivos específicos

Obtener microorganismos productores de lipasa de la muestra de suelo empleando medio mineral y aceite vegetal como fuente de carbono.

Seleccionar los microorganismos con producción de lipasa de mayor actividad, usando placas de agar con rodamina β en medio mineral y aceite vegetal.

Identificar los microorganismos productores de lipasa mediante pruebas bioquímicas.

Conservar a largo plazo los microorganismos productores de lipasa aislados e identificados en medios con glicerol.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1 Lípidos

Los lípidos son moléculas heterogéneas, que se diluyen en solventes apolares. En su mayoría son insolubles en agua dependiendo de su número de carbonos. Es por esto que se las han clasificado en función de su solubilidad en lípidos apolares y polares (Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. 2010).

Los lípidos más pequeños son los triacilgliceroles o triglicéridos, éstos están compuestos de tres ácidos grasos que se unen por un enlace éster con un glicerol (Nelson D, Cox M., 2009). Los extremos polares del glicerol y del carboxilo hacen que la molécula de lípidos sean apolares e insolubles en agua (Kresge, et al. 2010).

Las células de depósito de lípidos en los vertebrados son los adipocitos, donde se almacenan triglicéridos. En las plantas los triglicéridos se almacenan en las semillas, en estas dos células existen lipasas que hidrolizan estos lípidos para liberar ácidos grasos que son consumidos por el organismo como combustible (Nelson D. et al, 2009).

Entre las funciones biológicas de las lipasas está la catálisis de hidrólisis de ésteres, enlaces que se encuentran en los triglicéridos con cadena larga de carbono para obtener monocilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol (García, M. 2005).

2.2 Lipasas: generalidades

Las enzimas son catalizadores de las reacciones que ocurren en los organismos biológicos. Poseen una alta especificidad y una alta velocidad de reacción, es por este motivo que se usan de forma muy extensa en la industria (Rivera-Pérez, C., García-Carreño, F. 2007).

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas hidrolíticas que tienen como función principal catalizar la hidrólisis de los triglicéridos obteniéndose como productos glicerol y ácidos grasos libres y en un

proceso intermedio mono y diglicéridos con el mismo sustrato (Aravindan, R. 2007). Las lipasas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza encontrándolas en animales, plantas y microorganismos. El interés en las lipasas ha crecido en la industria por la selectividad, estabilidad en solventes orgánicos y la ventaja de síntesis en reacciones con baja actividad de agua (González-Bacerio, J., Hernández, J. R., & Martínez, M. 2010)

Las lipasas tienen un mecanismo de acción llamado activación interfacial. Al encontrarse en un medio polar la estructura denominada "lid" está cerrada protegiendo a la enzima y dejándola actuar en la interfase agua – aceite que se produce en la emulsión (Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. 2004)

Los sustratos de las lipasas son ésteres insolubles actuando en la fase orgánico – acuosa. A esta actividad se la determina lipolítica. La cinética enzimática no se describe como un modelo de Michaelis – Menten, si no que en este tipo de actividad el fenómeno de adsorción inicial y formación del complejo enzima – sustrato ocurre en la fase orgánica, posterior a esto. Los productos son localizados en la fase acuosa. La actividad esterásica de las lipasas ocurre de diferente forma ya que las estererasas catalizan hidrólisis de esteres solubles no siendo indispensable la interfase y modelando una cinética de Michaelis – Menten. Se puede señalar que las lipasas tienen también función esterasa, no así las estererasas, ya que estas no catalizan reacciones con sustratos insolubles por la no existencia de la interfase para su función (Sánchez p. 3-7, 1998).

2.3 Importancia y uso de las lipasas

Se ha documentado el uso de las lipasas desde los años 1900 (Houde, A., Kademi, A., y Leblanc D., 2004). Las enzimas que hidrolizan los triglicéridos se ha estudiado por un periodo mayor a trescientos años, pero no son más de setenta años que se ha empezado a observar y estudiar la reacción de síntesis de ésteres (Houde et al., 2004) Claude Bernard en el año 1856 pudo descubrir el efecto de una lipasa en jugo pancreático cuando ésta hidrolizó gotas de aceite convirtiéndolo en productos solubles en el medio. Las lipasas varían según su origen, pudiendo ser este fúngico, bacteriano, de mamíferos y de plantas;

hidrolizando triglicéridos para obtener ácidos grasos y glicerol o sintetizando ésteres carboxílicos, demostrando una alta selectividad en su sustrato (Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D., 2004).

Las enzimas lipolíticas tienen un potencial de aplicación en la Biotecnología que se han podido evidenciar en la industria aceitera, agroquímicos y de compuestos aromáticos. Entre estos productos se puede citar la producción de jabón y ácidos poliinsaturados a partir de aceites y grasas (Kresge et al., 2010).

En la industria se aprovecha la esterificación de triglicéridos en aceites animales o vegetales y así obtener biodiesel (Sirisha, E., Rajasekar, N., & Narasu, M. L., 2010). Las lipasas en la industria alimentaria se han usado para mejorar procesos tradicionales en alimentos preparados, tales como el queso y el vino (Soria, V., 2003).

Algunas grasas que no tienen mucho valor nutritivo ni comercial, se pueden convertir a grasas mejor aprovechables mediante procesos de catálisis dirigida o específica como se puede observar en la producción de mantequilla de cocoa, así también en la industria y manufactura de margarinas y mantequillas (Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, a, Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibañez, E., & Izquierdo-Reyes, F., 2009). La interesterificación e hidrogenación son las técnicas más usadas para aprovechar la selectividad de las lipasas (Ramos-Izquierdo et al, 2009).

Así como la catalisis es una de las funciones principales de la lipasa en condiciones extraordinarias se puede esterificar ácidos grasos libres en ausencia de solventes orgánicos por ejemplo transesterificar metil ester en hexano con isopropildieno glicerol (Aravindan, R. 2007).

En la actualidad, las lipasas se proyectan a aplicaciones biotecnológicas de interés farmacéutico y en la obtención de compuestos quirales, ayudando a la resolución de mezclas racémicas (Sánchez, 1998).

2.4 Microorganismos productores de lipasa

Una de las primeras fuentes de lipasa fue el páncreas de mamíferos y las semillas de ciertas plantas crucíferas. Actualmente todas se obtienen por fermentación de microorganismos en biorreactores: hongos, bacterias y levaduras (Arrib, M. C., Priolo, N. S., 1990).

Los microorganismos poseen potencial para producir lipasas. Estos generalmente son encontrados en diferentes hábitats, como son desechos, residuos de aceites vegetales, industrias lácteas, aguas y suelos contaminados, alimentos en descomposición (Abrunhosa, L., Oliveira, F., Dantas, D., Gonçalves, C., & Belo, I. 2013).

La naturaleza es una amplia fuente para aislar nuevos productores de lipasas. Mediante mecanismo de bioprospección se han aislado bacterias, hongos, levaduras, destacándose los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Aspergillus* y *Geotrichum* sp por su capacidad para producir lipasas extracelulares, (Ertu, S., & Takac, S. 2007).

Las lipasas son la clase de enzimas de mayor uso en procesos biotecnológicos, procesos químicos (Zouaoui, B., & Bouziane, A. 2011).

Es por esto que los investigadores se han enfocado en buscar nuevos microorganismos que produzcan lipasas como un desafío para la industria biotecnológica (Joseph, B., Ramteke, P. W., Thomas, G., & Shrivastava, N. 2007).

La producción de lipasas a partir de microorganismos depende de claros factores como la temperatura, pH, composición del medio de cultivo y sus fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno (Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. 2004).

2.5 Lipasas bacterianas

Las lipasas son producidas por algunos microorganismos, las lipasas aisladas de bacterias se han estudiado en particular de *Pseudomonas* y *Bacillus* sp. *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona fluorescens* (Houde, A. et al. 2004).

Estos microorganismos se encuentran en diversos hábitats como desechos industriales, aceite vegetal procesado, suelo contaminado de aceite, plantaciones de plantas aceiteras, entre otras.

Las lipasas que son producidas por organismos son extensas en sus usos, hay lipasas extracelulares, intracelulares, inmovilizadas y lipasas de regiones específicas. Las lipasas extracelulares son las que se aprovechan para la producción de enzimas comerciales y para este proceso de extracción y purificación de lipasa se han desarrollado muchas técnicas (Andualema, B., & Gessesse, A. 2012).

Las lipasas bacterianas en su mayoría son extracelulares, su producción es rápida, eficiente y de costo económico bajo, pero el proceso de purificación conlleva técnicas muy costosas (Selvakumar, R. S. and G., & G. 2008) como un método alternativo de las lipasas extracelulares se está usando células completas y aprovechando las lipasas intracelulares de forma inmovilizadas para disminuir costos de purificación (Andualema B, et al. 2012).

Las lipasas de origen bacteriano son las más usadas en el mercado debido a que tienen una mejor actividad comparada con las lipasas obtenidas en levaduras. Su actividad tiene un rango de pH que va desde el neutro al alcalino además presentan un alto grado de termoestabilidad (Rivera-Pérez et al, 2007).

Las lipasas de origen bacteriano por su estabilidad y producción a nivel comercial, se han establecido como alternativa en diferentes industrias como en la ambiental, farmacéutica, alimenticia y en la producción de productos cosméticos y de uso diario como detergentes (Nwuche, C. O., & Ogbonna, J. C. 2011).

Las lipasas de origen bacteriano tienen interés por su potencial en las aplicaciones biotecnológicas, motivo por el cual se han desarrollado estudios de la clonación y caracterización de muchas enzimas bacterianas, mecanismos de expresión, plegamiento y secreción, con el fin de optimizar su producción y

purificación (Rosenau y Jaeger, 2004; Milena, A. P., Salud, C. De, Valle, E., 2013).

2.6 Medios y condiciones de cultivo

Las condiciones que se utilizan para fermentaciones en este tipo de microorganismos rodean temperaturas de 30 °C, un pH próximo a 7 y que existan condiciones aeróbicas. Se recomienda el uso como fuente de carbono mixta entre un glúcido y un lípido siendo un inductor para la producción de la lipasa. Como fuente de nitrógeno generalmente se deberá usar sales de amonio o urea (Alarcón Vivero, M. R. 2008). La producción de las lipasas es inducida por adición de aceites o grasas en el medio de cultivo. Tanto el glicerol como la glucosa que es fuente de carbono produce biomasa mas no lipasa. (Coca, J. et al, 2001)

Las lipasas microbianas por lo general están unidas a la membrana de la bacteria existiendo inhibición para la producción de lipasa. En presencia de cationes de magnesio se incrementa la cantidad de enzima producida (Alarcón Vivero, et al 2008).

2.7 Actividad lipolítica y rodamina β

Varias moléculas al momento de ser iluminadas con luz ultravioleta emiten luz en el espectro visible. A este fenómeno se lo denomina luminiscencia pudiendo ser de dos tipos: fluorescencia y fosforescencia (Martí F. B., 2002). El fenómeno de fluorescencia está presente en compuestos inorgánicos y orgánicos, en estos últimos en su mayoría son derivados de benceno, naftaleno y antracenos con dos o más anillos aromáticos unidos, que contiene oxígeno o nitrógeno como por ejemplo la rodamina β (Marti FB et al, 2002).

2.8 Rodamina β

La rodamina β es un colorante que se observa en el espectro visible de la luz, emite una longitud de onda entre rojo y violeta, su peso molecular es de 479.02 g/mol y su fórmula es $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. Generalmente se usa como un trazador para observar el flujo del aire en ensayos (Al-Kadhemy, M. F., Alsharuee, I. F., & Al-Zuky, A. A. D. 2011). Las rodaminas se usan extensamente en técnicas biotecnológicas como, por ejemplo: microscopia de fluorescencia, citometría de

flujo, ELISA. La rodamina β emite fluorescencia con longitudes de onda de 350 a 650 nm (Al-Kadhemy M.F. et al 2011).

2.8.1 Ensayo en placa de rodamina β

En 1987 Kouker y Jaeger presentaron un ensayo en placas Petri con rodamina β que se uso para la detección de actividad lipolítica, usando los sobrenadantes de los cultivos de crecimiento que contenía aceite de oliva y el colorante rodamina β . En este ensayo las colonias productoras de lipasa emitían halos de luz anaranjada al observarse las placas bajo luz UV 350 nm. Esta fluorescencia era emitida por el complejo que se formaba un complejo entre la rodamina β y los ácidos grasos libres del aceite vegetal que producían las lipasas (Kouker, G., & Jaeger, K. E. 1987; Brockerhoff, H., 2012).

2.9 Identificación bacteriana

En la actualidad la identificación de bacterias se la realiza por medios convencionales como son las pruebas fenotípicas por su costo y asequibilidad en el medio (Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos S., 2010). Las pruebas fenotípicas se basan en las características que se pueden observar como su morfología, crecimiento, propiedades bioquímicas y metabólicas (Isenberg HD, 2004).

El fundamento de la identificación fenotípica es la comparación de bacterias desconocidas con patrones de cultivos patrón ya conocidas. La fiabilidad de este método depende del número de características similares que se encuentren (Fernández Olmos et al, 2010).

La falta de similitud entre las características que se puede observar en las pruebas fenotípicas y las pruebas de las cepas patrón hacen de los métodos fenotípicos sean una identificación no definitiva si no la más probable (Germán Bou, et al 2011).

Otro método de identificación más específico al tipo fenotípico es el que se ha realizado mediante métodos genotípicos que se pueden usar como procedimientos de complemento o alternativos (Clarridge III JE. 2004).

Capítulo III. METODOLOGÍA

3.1 Toma de muestra

Como documenta Lin y colaboradores (2012) los microorganismos productores de lipasa se pueden localizar en dos zonas, la primera donde se encuentran residuos de trabajo con lípidos y la segunda donde las bacterias realizan un rol específico como microbiota del suelo.

Se utilizó un muestreo aleatorio tipo “*batch*” en dos zonas diferentes; la primera en el Bosque Mindo Nambillo y la segunda en un cultivo de palma africana ubicado en la vía Calacalí – La Independencia km 135 en el cantón Puerto Quito, provincia Pichincha

Las coordenadas de los sitios de muestreo se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Sitios de muestreo

Sitio	Coordenadas
Bosque Mindo-Nambillo	-0.07378, -78.753591
Cultivo palma africana, Puerto Quito	0,116598, -79,248347

Se seleccionaron muestras de suelo de un peso final aproximado de 500 g. Las muestras se recolectaron como punto inicial en la primera coordenada y se recorrió en línea recta cada 5 metros. En cada punto se excavaron 10 cm de suelo y tomó una muestra de 50g en cada punto, hasta completar el peso final de 500 g de la muestra; después de recolectarse las muestras se colocaron en fundas plásticas estériles y se las almacenó a una temperatura aproximada de 4 °C hasta su futuro análisis en el laboratorio.

El mismo proceso se efectuó en el cultivo de palma africana, donde las muestras se tomaron a la base de cada palma.

3.2 Estandarización de protocolo para medio mineral y rodamina β

Para la elaboración de los medios minerales se usó el método descrito por Kouker (1987) modificado usando el colorante rodamina β como indicador de actividad lipolítica en presencia de luz ultravioleta.

La composición del medio mínimo se lo detalla en la (tabla 2)

Tabla 2. Composición medio mineral

COMPUESTO	CANTIDAD
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,12 g/L
KH ₂ PO ₄	0.68 g/L
NaCl	0.008 g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.002 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001 g/L
Aceite vegetal*	5% P/V
Rodamina β **	1 % P/V
Agar	15 g/L

Nota:

* Aceite vegetal y rodamina esterilizados por filtración mediante filtro 0,22 micras

** Solución de rodamina al 0,001% en etanol.

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos a 100 kPa de presión. Se enfrió el medio hasta los 55 °C para añadir el aceite vegetal y la rodamina β estériles en una cámara de flujo. Se homogenizó mediante agitación manual para evitar la producción de desfase agua-aceite el momento de dispensar en cajas Petri.

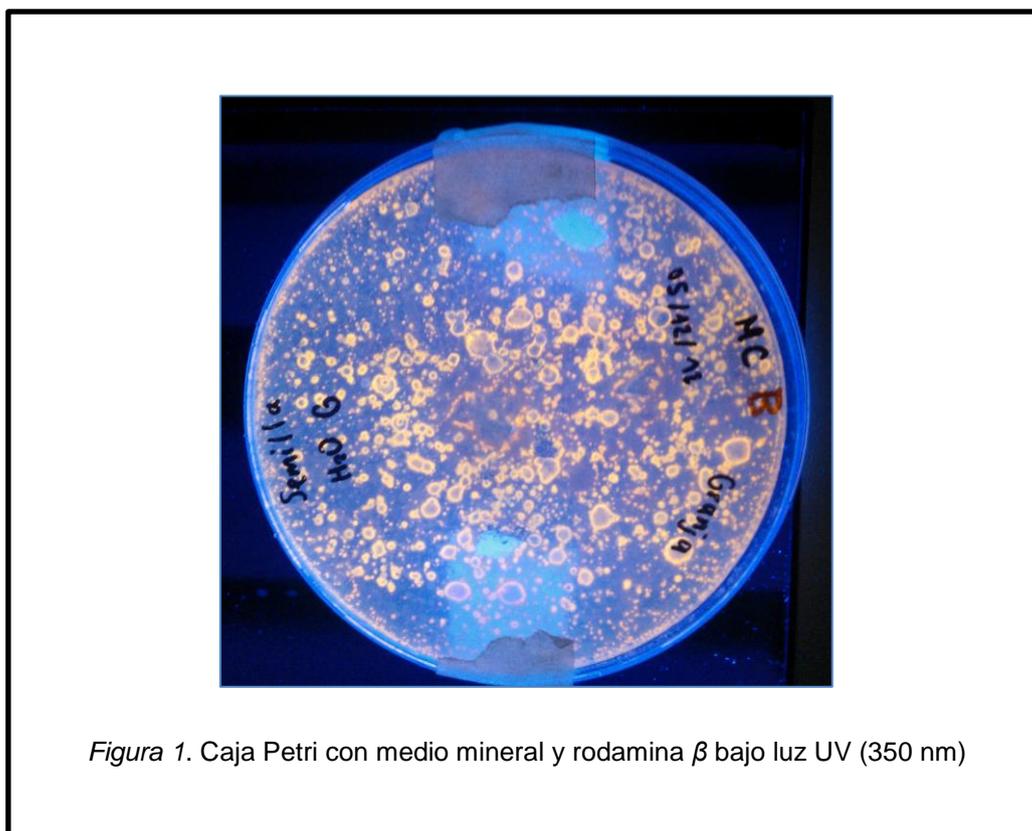
3.3 Tratamiento de las muestras de suelo.

Se homogenizaron las muestras de suelo con ayuda de un tamiz para separar partículas grandes como rocas o residuos sólidos. Se realizó una solución de 100 mL al 10% P/V de muestra de suelo en solución salina al 1% agitándola y se reposaron por 5 minutos.

Para la inoculación de los medios se realizó diluciones seriadas 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y se colocó 0,3 mL de cada muestra de suelo por extensión en el medio mineral con rodamina β . Este procedimiento se realizó por duplicado y se incubaron las cajas Petri a 30°C por 48 horas.

3.4 Aislamiento de microorganismos productores de lipasa

Se seleccionaron las colonias que producen fluorescencia anaranjada a la exposición de luz UV de las placas con medio mineral y rodamina. Estas se cultivaron en placas Petri con agar nutritivo inoculándolas por estriado y se incubaron a 30°C por 48 horas (figura 1)



Se realizó una tinción Gram para confirmar la presencia de bacterias y la obtención de colonias únicas.

3.5 Selección de microorganismos con mayor producción de lipasa.

Se preparó un medio mineral líquido con aceite vegetal, el cual se colocó en tubos cónicos estériles de 15 mL. Se inoculó cada tubo con la colonia productora de lipasa aislada de las placas Petri de agar nutritivo y se incubaron por 48 horas a 30°C. Seguidamente se centrifugaron los tubos a 4500 rpm por 25 minutos, separando el sobrenadante el cual se colocó en las cajas Petri con el medio mineral con rodamina β en agujeros de 5 mm de diámetro realizado en el agar. Se incubaron las placas por 24 horas a 30 °C y se observó bajo luz ultravioleta el halo de fluorescencia producido por el sobrenadante de cada colonia, registrando la longitud del halo que produjo la cepa. Este experimento se repitió tres veces de forma independiente.

3.6 Identificación de microorganismos productores de lipasa

Para la identificación de los microorganismos productores de lipasa se lo realizó mediante el kit de identificación bioquímico MICROGEN GN-A efectuando la prueba como se describe en el instructivo de uso del kit (anexo 1).

Se efectuó tres repeticiones por cada aislado obtenido, en iguales condiciones de trabajo.

3.7 Conservación de microorganismos.

Los microorganismos productores de lipasa fueron incubados en caldo nutritivo por 48 horas a 30°C.

Para la conservación de los microorganismos productores de lipasa aislados se seleccionó el método de congelación por su alta tasa de supervivencia y económicamente viable y como agente protector glicerol al 30% el cual evita se formen cristales de hielo, la cual puede romper las células produciendo la muerte de los microorganismos preservados. (Weng, 2005).

Se colocaron 70 μ L de caldo nutritivo incubado y 30 μ L de glicerol estéril en un criovial. Se colocaron los crioviales en el vórtex Labnet por 1 minuto después se etiquetaron y almacenaron en un congelador con temperatura controlada a -80 °C.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de microorganismos productores de lipasas

El propósito de esta tesis fue aislar microorganismos productores de lipasa de muestras de suelo de la zona, seleccionarlos e identificarlos. De los microorganismos que se aislaron de las muestras de suelo se obtuvieron 17 aislados (Tabla 6) de las cuales el 47% (ocho aislados) fueron de muestras del suelo del bosque Mindo – Nambillo y el 53% (nueve aislados) de las muestras de suelo del cultivo de palma africana, aislados que producen un halo fluorescente al ser expuestos en luz ultravioleta (Figura 2)

Tabla 6. Microorganismos aislados

Código	Procedencia
ub15	Muestras suelo plantación palma africana
ub16	
ub14	
ub13	
ub7	
ub17	
ub6	
ub10	
ub2	
ub5	
ub3	Muestras suelo Mindo Nambillo
ub8	
ub4	
ub11	
ub12	
ub1	
ub9	

Nota: ub=unknown bacteria

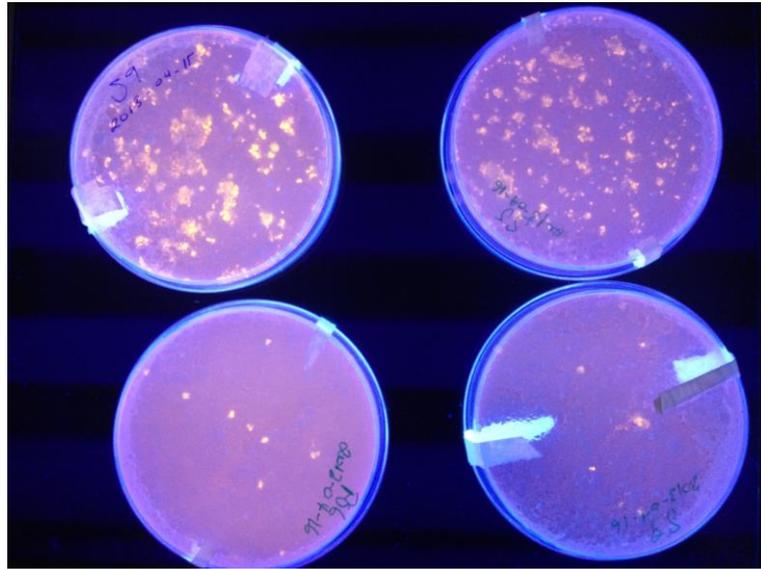


Figura 2. Halos fluorescentes en medio con rodamina β , luz UV 350 nm

Los microorganismos productores de lipasa aislados en medio mineral, fueron cultivados en agar nutriente y observados al microscopio después de una tinción Gram con el objetivo de identificar su naturaleza y morfología (Tabla 7)

Tabla 7. Resultados tinción Gram

Código	Morfología	Gram	Código	Morfología	Gram
ub1	Coco	+	ub10	Bacilo	-
ub2	Bacilo	-	ub11	Coco	+
ub3	Bacilo	+	ub12	Coco	+
ub4	Coco	-	ub13	Coco	+
ub5	Coco	+	ub14	Coco	-
ub6	Bacilo	+	ub15	Coco	+
ub7	Coco	+	ub16	Bacilo	+
ub8	Bacilo	+	ub17	Cocobacilo	-
ub9	Coco	+			

4.2 Selección de microorganismos con mejor producción de lipasa

La selección de microorganismos de mayor producción de lipasa se realizó mediante el ensayo que se describe en Kouker y Jaeger (1987). Los aislados con mayor halo de fluorescencia (figura 3) se tomaron como referencia para determinar una mejor producción de enzima lipasa.

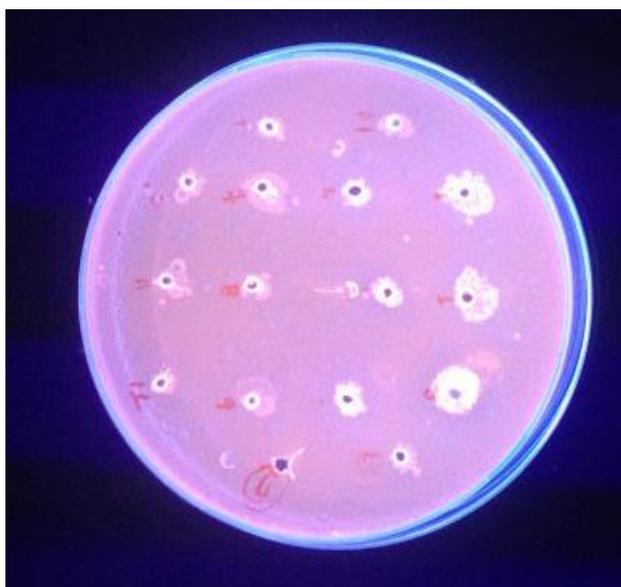


Figura 3. Halos fluorescentes producidos por actividad lipolítica en placas Petri con rodamina β

Los datos de la medición del halo de rodamina de cada uno de los aislados sugiere que los aislados producen lipasa, sin embargo, unos aislados producen mayores halos de rodamina que otros (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio y varianza de los valores de halos de rodamina β generados por los sobrenadantes de los aislados bacterianos medidos en milímetros

Aislados	Promedio (mm)	Varianza
ub1	3,67	1,44
ub2	4,22	0,70
ub3	2,22	0,59
ub4	2,56	0,15
ub5	2,78	0,04
ub6	2,33	0,11
ub7	3,22	0,26
ub8	5,00	0,33
ub9	2,33	0,11
ub10	3,33	0,00
ub11	2,56	0,04
ub12	2,11	0,26
ub13	3,00	0,11
ub14	7,44	1,15
ub15	7,78	0,93
ub16	2,33	0,00
ub17	7,56	0,70

El análisis ANOVA arrojó que existen diferencias significativas entre cada uno de los aislados con respecto a la variable “actividad lipasa” (Tabla 9).

Tabla 9 Análisis ANOVA de la actividad lipasa entre cada uno de los aislados ($\alpha = 0.05$)

F.V	S.C	g.l	C.M	F	p	F crítico
Aislados	185,92	16	11,62	28,52**	0,00	1,95
EE	13,85	34	0,41			
Total	199,77	50				

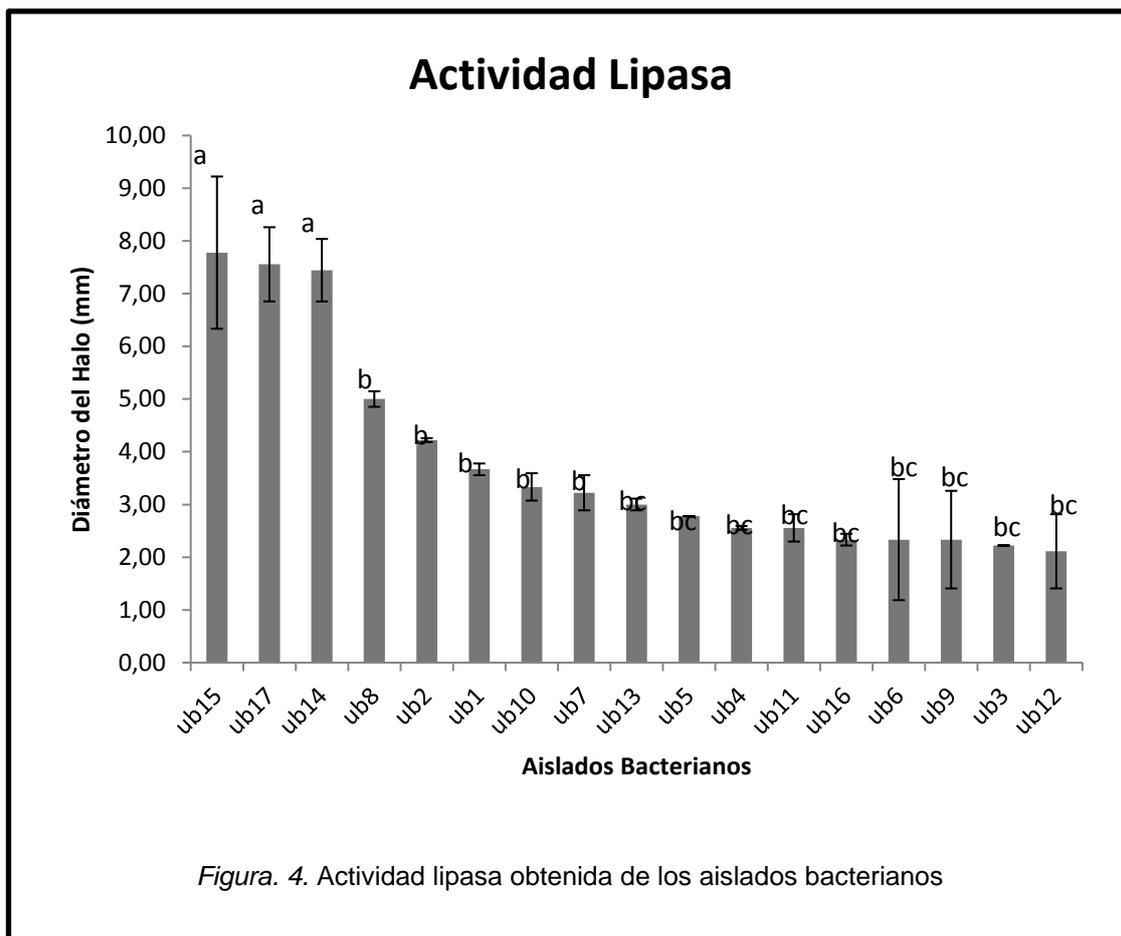
Nota: ** Altamente significativo

Estos resultados sugieren que existen aislados que producen más enzima, o la enzima que producen tiene mayor actividad. La prueba de Tukey al 95% de confianza determinó la presencia de 3 grupos de significancia en función de la variable “actividad lipasa” (Tabla 10) dentro de los cuales se agruparon los aislados con mayor y menor actividad respectivamente (Figura 4).

Tabla 10. Grupos de significancia obtenidos mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Aislados	Promedios (mm)	Grupos de significancia*
ub15	7,78	a
ub17	7,56	a
ub14	7,44	a
ub8	5,00	b
ub2	4,22	b
ub1	3,67	b
ub10	3,33	b
ub7	3,22	b
ub13	3,00	bc
ub5	2,78	bc
ub4	2,56	bc
ub11	2,56	bc
ub16	2,33	bc
ub6	2,33	bc
ub9	2,33	bc
ub3	2,22	bc
ub12	2,11	bc

Nota: *HSD = 1.92



La diferencia de la producción de lipasa es muy visible como se puede observar en la Tabla 10 donde los halos de fluorescencia producida por la rodamina β y los ácidos grasos liberados por la lipasa demuestran que son los aislados de las muestras de suelo de palma africana lo de mayor diámetro de halo, donde ha existido un mayor contacto del medio con fuentes de lípidos como son los frutos de la palma africana y factores como el proceso de cosecha ha hecho que estos microorganismos usen como fuente de carbono a los lípidos que se puede obtener en el medio, resultando e grupo a conformado por los microorganismos ub15, ub17 y ub14 los de mayor producción en las condiciones efectuadas el ensayo.

Como lo documenta Alarcón y colaboradores en 2008 un factor a considerar para la obtención de un microorganismo produzca lipasa es la composición del medio. Es por tal motivo que se observa la diferencia en la actividad lipolítica. Al

observar los datos de las cepas que tienen mayor producción de actividad enzimática resultan de las muestras de suelo de la plantación de palma africana, donde a diferencia del suelo del bosque de Mindo – Nambillo que en su mayoría no tiene un contacto con el trabajo del hombre. En la plantación se produce una contaminación con pequeñas cantidades de grasas por la cosecha permanente de esta planta que produce aceites. Esta contaminación es por el contacto más estrecho con el humano y sus obras. Así también se puede nombrar el hecho de que existan plantas o semillas de plantas que permanecen en contacto directo con el suelo ambientando a los microorganismos de esta zona, los cuales segregan más lipasa para su crecimiento (Abrunhosa, L. Et al 2011).

La diferencia de condiciones del hábitat de donde se realizó el muestreo de suelo por su ubicación, temperatura, composición del suelo, altura, cantidad de agua; considerando que el bosque de Mindo-Nambillo es una zona lluviosa, puede ser un efecto a considerar para que exista esta diferencia de producción entre los aislados de la zona de Mindo-Nambillo y la de Puerto Quito que al tratarse de un suelo más fértil por ser un cultivo comercial y existe una mayor incidencia de la mano humana en su composición pudo adaptar a estos aislados a producir más cantidad de lipasa o una enzima con mejor actividad que los aislados obtenidos del suelo del bosque de Mindo–Nambillo. Como describe en su estudio Diez y colaboradores la composición del medio puede incrementar la segregación de enzima lipasa para el desarrollo del microorganismo.

Como se puede observar en la tabla 10 podemos diferenciar tres grupos muy marcados por la cantidad de actividad que posee la lipasa que produce. Los factores que pueden influir en estos resultados son la temperatura, tiempo de incubación, composición del medio, inductor de la enzima; pues como se trata de varios microorganismos y se conoce que no todos los microorganismos comparten condiciones óptimas de crecimiento y producción se puede esperar una producción de enzima o una enzima de similares actividades (García, M. 2005)

4.3 Identificación de microorganismos productores de lipasa

Se realizó en total pruebas bioquímicas con tres repeticiones a los 17 aislados productores de lipasa, se registró el resultado de cinco bacterias que obtuvieron replicas en sus repeticiones, no así los aislados restantes que no se replicaron sus resultados.

Tabla 11. Identificación por prueba bioquímica.

Aislado	Microgen GN ID+A
Ub1	<i>Klebsiella azaenae</i>
Ub2	<i>Klebsiella azaenae</i>
Ub5	<i>Enterobacter agglomerans</i>
Ub7	<i>Enterobacter agglomerans</i>
Ub9	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>

En un análisis preliminar, se pudo determinar que todos los aislados sometidos a las pruebas de identificación corresponden a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual se documenta que este tipo de microorganismos se localizan en el suelo, agua y vegetación como también se encuentran en la flora intestinal de animales y el ser humano (García y Rodríguez, 2010).

Varios estudios demuestran que las enterobacterias son microorganismos productores de lipasa, con grandes aplicaciones dentro de la industria biotecnológica (Farrokh, P., Yakhchali, B., & Karkhane, A. A. 2014)

En cuanto a las muestras individuales, los aislados UB1 y UB2 coincidieron en su identificación tratándose muy probablemente de *Klebsiella sp.* Un estudio previo realizado por Odeyemi y colaboradores en (2013) documenta la presencia de actividad lipolítica de aislados del género *Klebsiella* en muestra de agua.

El género *Klebsiella* se puede encontrar como residente de la flora intestinal de animales y el ser humano, pero también en agua, suelo, efluentes industriales y vegetación. Por tratarse de un microorganismo saprofito se puede aprovechar sus beneficios de control, remediación y producción enzimática la cual está controlada por las condiciones de crecimiento y la composición del medio en el que se desarrolla controlando su naturaleza patógena (Yurbis, L., Inojosa, A., Malaver, N., y Naranjo L., 2009).

En las muestras UB5 y UB7 concuerdan los resultados de las pruebas bioquímicas. Estos resultados sugieren la posibilidad de que se ubiquen dentro del género *Enterobacter*. Se ha documentado en estudios previos realizados por Farrokh y colaboradores (2014) que *Enterobacter sp* es un microorganismo productor de lipasa en condiciones similares a las que se realizó en la presente tesis, por lo cual se podría afirmar la presencia de *Enterobacter* en los aislados.

El género *Enterobacter* como los demás microorganismos identificados en este trabajo es un microorganismo saprofito, que se lo encuentra en materia orgánica muerta, produciendo infecciones oportunistas; sabiendo controlar su patogenicidad se ha logrado aprovechar este género para procesos Biotecnológicos en la producción de enzimas, biodegradación de ambientes contaminados y como biocontrol (González, Bautista, Molina, Simarro, Vargas y Flores, 2013).

La muestra UB9 el resultado de la prueba bioquímica la coloca en el género *Acinetobacter sp*. El género *Acinetobacter* como lo describe Sarac, N. y Ugur, A. (2016) es un microorganismo que se lo ha logrado aislar de tratamientos para agua de desecho, produciendo una capa en la superficie que ayuda la eliminación de residuos de aceite. El género *Acinetobacter* produce lipasa en presencia de aceite vegetal en su medio de crecimiento, el cual es aprovechado en la industria al tratarse de un género que tiene una producción extracelular de la enzima. (Jaturong Pratuangdejkul, Saovanee Dharmstithi, 2000)

Además, se debe recalcar que al ser aislados obtenidos de un proceso de bioprospección y al considerar el universo microbiano, muy probablemente se traten de especies nuevas, por lo cual su identificación más precisa se la podría realizar mediante pruebas complementarias de tipo bioquímicas y de ser posible mediante pruebas moleculares como por ejemplo con la secuenciación del 16s rDNA.

Con respecto a las muestras que no se pudieron identificar, se asume que la falta de la réplica en los resultados de las pruebas bioquímicas se asume que se debe a que las colonias no se encontraron suficientemente puras el momento de realizar las pruebas o debido a que se el uso de equipos de laboratorio compartidos con docencia para la incubación para los cultivos y las pruebas de identificación provoco contaminación exógena en el momento de incubar los cultivos o al realizar las pruebas bioquímicas.

4.4 Conservación de microorganismos productores de lipasa.

Se almaceno los 17 aislados obtenidos en crioviales para su conservación a temperatura -80°C controlados en crioviales con glicerol al 30%, estudios previos sugieren esta forma de conservar la viabilidad de las bacterias durante mucho tiempo, previniendo mutaciones y manteniendo el cultivo en bueno estado. (Lapage, S.P.; Shelton, J.E.; Mitchell, T.G. and Mackenzie, A.R., 1970).

CONCLUSIONES

Se identificaron cinco microorganismos mediante pruebas bioquímicas. Todos los microorganismos parcialmente identificados se han encontrado en estudios previos y las referencias bibliográficas sugieren que dichos microorganismos son productores de lipasa, dependiendo de la composición del medio y condiciones de crecimiento.

Se obtuvieron microorganismos productores de lipasa a partir de las muestras compuestas del suelo de la zona de Mindo Nambillo (8 cepas) y del suelo de una plantación de palma africana en la zona de Puerto Quito (9 cepas), los cuales fueron aislados mediante un medio mineral selectivo con aceite vegetal como fuente de carbono.

Se seleccionaron los microorganismos productores de lipasa clasificándolos en tres grupos según la producción de enzima, clasificación que será de utilidad para poder determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de las enzimas, ya que estos son factores que influyen en la calidad y cantidad de enzima que produce un microorganismo.

Se identificaron mediante kit de pruebas bioquímicas cinco microorganismos los cuales cuatro de ellos probablemente pertenecen a la familia *Enterobacterae* y uno al género *Acinetobacter*, todos ellos con estudios previos que documentan producción de lipasas. Debido a la inconsistencia de las réplicas en los resultados de las pruebas bioquímicas en el resto de los aislados se asume que existió contaminación exógena en los cultivos o en las pruebas mismas el momento de la incubación.

Por tener dos muestras de suelo de diferente procedencia, concentración de desechos orgánicos, desechos lipídicos, temperatura, pH del suelo y temperatura se encontraron grupos de microorganismos con diferente actividad enzimática.

Se conservó la cantidad de 17 aislados productores de lipasa en el presente trabajo a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cuales se encuentran almacenados en las instalaciones de la Universidad de las Américas.

RECOMENDACIONES

Realizar una identificación mediante secuenciación del 16s rADN de los aislados que se encuentran almacenados en el laboratorio para una identificación complementaria a los datos obtenidos en la presente tesis.

Elaborar un estudio de aislamiento de microorganismos productores de lipasa, con un medio selectivo con otra composición que permita un crecimiento más variado de microorganismos productores de lipasa.

Realizar análisis de la composición de suelo del cual proviene las muestras para observar si hay factores determinantes en la producción de lipasas y demás enzimas.

Realizar estudios de composición de medios de crecimiento, para optimizar el proceso de producción de enzima lipasa variando además factores como temperatura, pH del medio e inductor de lipasas.

Efectuar estudios de bioprospección para los aislados que se pudo obtener en la presente tesis, así como también estudios de caracterización de las lipasas producidas por éstos, con el fin de realizar pruebas a nivel de laboratorio y de ser posible una producción piloto de lipasas.

Realizar ensayos para determinar si los microorganismos son productores de enzima intra o extracelular como también métodos de purificación de la enzima producida por los aislados para efectuar ensayos de caracterización de la enzima, inmovilización de la enzima y optimización de su uso.

REFERENCIAS

- Abrunhosa, L., Oliveira, F., Dantas, D., Gonçalves, C., & Belo, I (2013). *Lipase production by Aspergillus ibericus using olive mill wastewater*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(3)
- Aceves Diez, Angel Emilio; Castañeda Sandoval, Laura Margarita; (2012). *PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS MICROBIANAS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES*. *Vitae*, Sin mes,
- Alarcón Vivero, M. R (2008). *PRODUCCIÓN DE LA LIPASA LIP2 DE Candida rugosa EN EL SISTEMA Pichia pastoris: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN EN REACCIONES DE SÍNTESIS*. Ddd.Uab.Cat, 201.
- Al-Kadhemy, M. F., Alsharuee, I. F., & Al-Zuky, A. A. D (2011). *Analysis of the effect of the concentration of rhodamine B in ethanol on the fluorescence spectrum using the «Gauss Mod» function*. *Journal of Physical Science*, 22(2).
- Andualema, B., & Gessesse, A (2012). *Microbial lipases and their industrial applications: Review*. *Biotechnology*, 11(3).
- Aravindan, R (2007). *Lipase applications in food industry*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6(April).
- Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E (1999). *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. *The Biochemical journal* (Vol. 343 Pt 1).
- Arrib, M. C., Priolo, N. S., (1990) *Laboratorio*, N. O. C., Exactas, C., Plata, L., & Plata, L.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S (2011). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

- Brockerhoff, H (2012). *Lipolytic Enzymes*. Elsevier Science. Recuperado el 5 de noviembre de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=eQnhW55nS4sC>
- Chen SJ, Yuan Cheng C, Liang Chen T (1998) *Production of an alkaline lipase by Acinetobacter radioresistens*. Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 86, N° 3.
- Coca J, Dustet JC y Martínez JL (2007). *Mucor griseocyanus Lipase: Production, characterization and study of some catalytic properties of immobilised enzyme*. Food Technol Biotechnol. Vol. 46 N° 2.
- Coca J, Hernández O, Berrio R, Martínez S, Días E y Dustet JC (2001). *Producción y caracterización de las lipasas de Aspergillus niger y A. funigatus*. Biotecnología Aplicada Vol. 18 N° 4.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). *Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches*. Environmental Microbiology, 5(9), 719–729. Recuperado el 4 de julio del 2015 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x/abstract>
- Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S., & Gupta, M. N (2008). *Purification and properties of the alkaline lipase from Burkholderia cepacia A.T.C.C. 25609*. Biotechnology and applied biochemistry.
- Ertu, S., & Takac, S (2007). *Isolation of lipase producing Bacillus sp . from olive mill wastewater and improving its enzyme activity*, 149, 720-724. Recuperado el 22 de noviembre del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389407005183>
- Farrokh, P., Yakhchali, B., & Karkhane, A. A (2014). *Cloning and characterization of newly isolated lipase from Enterobacter sp. Bn12*. Brazilian Journal of Microbiology, 45(2), 677-687.

- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*.
- García, M (2005). *Hidrolisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes. Hidrolisis Enzimática de Trigliceridos en Emulsiones O/W. Aplicación a Formulaciones Detergentes*, 2-349.
- González-Bacerio, J., Hernández, J. R., & Martínez, M (2010). *Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption*. Revista Colombiana de Biotecnología, 12(1).
- González, N., Bautista, L. F., Molina, C., Simarro, R., Vargas, C., & Flores, R. (2013). *Efecto de la concentración de surfactante y de la temperatura en la biodegradación de naftaleno, antraceno y fenantreno por Enterobacter sp., Pseudomonas sp. y Stenotrophomonas sp. aislados de un consorcio degradador de HAP*. Anales de La Real Sociedad Española de Química, 109(3), 182–187. Recuperado el 25 de mayo del 2016 en http://www.rseq.org/documentos/doc_download/548-pag182-187-vol9-03.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P (2004). *Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties*. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(6).
- Helena, P. M., Ana María, G. D., Patricia, G. C., & Marcela, L. L (2009). «*PCR universal o de amplio espectro*»: *Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica*. Revista Medica de Chile.
- Holmes, D. E., Nevin, K. P., & Lovley, D. R (2004). *Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam*.

nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(5),

Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D (2004). *Lipases and their industrial applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 118(1-3).

Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2004.

Jia Fu Lin, Qiang Lin, Jing Li, Zhong An Fei, Xin Ran Li, Hui Xu, Dai Rong Qiao y Yi Cao, (2012) *Bacterial diversity of lipase-producing strains in different soils in Southwest of China and characteristics of lipase*, Microbiology and Metabolic Engineering Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu

Kouker, G., & Jaeger, K. E (1987). *Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases*. Applied and environmental microbiology.

Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L (2010). *JBC historical Perspectives: Lipid Biochemistry*. Journal of Biological Chemistry.

Lapage, S.P.; Shelton, J.E.; Mitchell, T.G. and Mackenzie, A.R. "Culture collection and the preservation of bacteria". Methods in Microbiology. Vol. 3. Academic Press. London, 135 (1970).

Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C (1993). *Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme*. European journal of biochemistry / FEBS, 216.

Martí, F. B., Conde F.L, Jimeno S. A., Méndez J.H. (2002). *Química analítica cualitativa*. Thomson.

Milena, A. P., Salud, C. De, & Valle, E (2013). *LIPASAS INDUCIDAS POR HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO*, Rev. Int. Contam. Ambiente

- Morales P. Z., Moreira, M., Amélia, E., Duarte, A., De, T. A. S., Monteiro, F. P., Souza, J. T. De (2015). *Host and tissue preferences of Enterobacter cloacae and Bacillus amyloliquefaciens for endophytic colonization*, 9(20), 1352-1356. Recuperado el 20 de enero del 2016 de <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/040E29353258>
- Markets, G., & Applications, I. (2014). *Global Markets for Enzymes in Industrial Use*. Recuperado 10 de abril 2016 de <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>
- Nwuche, C. O., & Ogbonna, J. C (2011). *Isolation of lipase producing fungi from palm oil Mill effluent (POME) dump sites at Nsukka*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- Odeyemi A T., I, A. B., & S, B. O (2013). *Lipolytic Activity of some Strains of Klebsiella, Pseudomonas and Staphylococcus Spp. from Restaurant Wastewater and Receiving Stream*. *Journal of Microbiology Research*, 3(1).
- Padilha, G. da S., Santana, J. C. C., Alegre, R. M., & Tambourgi, E. B (2012). *Extraction of lipase from Burkholderia cepacia by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(1).
- Puerta García, a., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). *Enterobacterias*. *Medicine*, 10(51).
- Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, a, Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibañez, E., & Izquierdo-Reyes, F (2009). *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical*. *Universidad y Ciencia*.
- Rivera-Pérez. C y García-Carreño. F, (2007). *Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite*. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, A.P. 128, La Paz, Baja California Sur, 23000, México: Vol.11 N° 2.

- Rohit S, Chisti Y, Banerjee UC (2001) *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnol Adv. Vol. 19.
- Rosenau, F., Tommassen, J., & Jaeger, K.-E (2004). *Lipase-Specific Foldases*. *ChemBioChem*, 5(2), 152-161. Recuperado el 10 de Julio 2015 de onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.200300761/abstract;jsessionid=66B99DEE1AF3D5113C2955E11E49D3F3.f01t03
- Sánchez Ferrer Antonio, (1998), *RECUPERACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPASAS PRODUCIDAS POR Candida rugosa. APLICACIÓN A LA RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS QUIRALES DEL REACTOR ENZIMÁTICO*, Universitat Autònoma de Barcelona, España.
- Sarac, N., y Ugur, A. (2016). *A GREEN ALTERNATIVE FOR OILY WASTEWATER TREATMENT: LIPASE FROM ACINETOBACTER HAEMOLYTICUS NS02-30. DESALINATION AND WATER TREATMENT*, Recuperado el 1 de agosto del 2016 de <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19443994.2015.1106346?scroll=top&needAccess=true>
- Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS (2003) *Purification strategies for microbial lipases*. J Microbiol Methods.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Chand, U (2001). *Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases*. Biotechnology advances
- Sirisha, E., Rajasekar, N., & Narasu, M. L (2010). *Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils*. Advance sin Biological Research, 4(5).
- Yurbis, L., Inojosa, A., Malaver, N., & Naranjo, L. (2009). *Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco Identification of potential biocatalysts for remediation process of. RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 15.

Zouaoui, B., & Bouziane, A (2011). *Isolation, Optimisation and Purification of Lipase Production by Pseudomonas Aeruginosa*. Journal of Biotechnology & Biomaterials, 01(07).

.

ANEXOS

ANEXO 1. Microgen ID+A – Instrucciones de uso

PROCEDIMIENTO – LECTURA Y ADICIÓN DE REACTIVOS

Tira GN A

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
 - a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
 - b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.
 - c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.
3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:

Rojo = Positivo

Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc:

Incoloro / amarillo = Positivo

Rojo = Negativo

4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

IDENTIFICACIÓN

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los substratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada substrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizará para determinar la identidad del organismo aislado. El Perfil numérico se introduce en el Software Microgen Identification System (MID-60), que genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

El software proporciona una identificación basada en probabilidad, en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. La definición completa de estos términos y la explicación de su utilidad e interpretación la encontrará en el manual de ayuda proporcionado con el software.

Nota: Para organismos oxidasa positivos (miscelánea de bacilos Gram. negativos):

- Considerar las reacciones débiles como negativos
- Los resultados para la oxidasa, la reducción de nitrato y la movilidad se deben incluir para dar lugar a un Perfil numérico de 9 dígitos

Ejemplo de Hoja de Resultados

MICROGEN GN-ID A+B PANEL													MICROGEN BIOPRODUCTS																	
REPORT FORM																														
Lab. No. 3341				Specimen Type: CHEESE SANDWICH																										
				Date: 28TH JANUARY 2002																										
Well Number				GN A wells												GN B wells														
Reaction				Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Result							+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	
Reaction Index				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions							6			7			6			0			0			7			6			0		
Profile No: 67600760				Final Identification: E. coli																										
WF12/01/12																														

ANEXO 2. Resultados pruebas bioquímicas

UB1

Results Entry

Test System:

Octal Code:

Press ENTER to Calculate Identification

+ LYS + XYL - CIT
 - ORN + ONP - TDA
 - H2S - IND
 + GLU + UR
 + MAN - VP

Lysine Decarboxylase

Identification Analysis

	K. ozaenae	K. pneumoniae	E. coli-inactive	H. alvei	K. oxytoca
Select ID Choice	↓	↓	↓	↓	↓
Probability	1/49	1/2.781	1/5.458	1/10.657	1/46.035
Percent Probability	96,65%	1,69%	0,86%	0,44%	0,1%
Likelihood	7,41%	0,04%	0,14%	0,02%	<0,01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	UR (10%)	VP (98%)	UR (1%)	ORN (98%)	IND (99%)
Test 2		CIT (98%)	IND (80%)	UR (4%)	VP (95%)
Test 3				VP (85%)	CIT (95%)
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Acid from Adonitol	97%	90%	3%	0,1%	99%
Malonate Utilization	3%	93%	0,1%	50%	98%
Motility (37C)	0,1%	0,1%	5%	85%	0,1%
Acetate Utilization	2%	75%	40%	15%	90%
Methyl Red	98%	10%	95%	40%	20%
Additional Comments			7		

Identification Comments
Acceptable Identification of Klebsiella ozaenae
 The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices

Additional Comments

7. Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group

UB2

Results Entry

Test System: + LYS + XYL - CIT
 - ORN + ONP - TDA
 - H2S - IND
 + GLU - UR
 + MAN - VP

Octal Code:

Press ENTER to Calculate Identification Lysine Decarboxylase

Identification Analysis

Select ID Choice	K. ozaenae	E. coli-inactive	H. alvei	S. liquefaciens	E. coli
Probability	89.8%	1/55	1/444	1/3.384	1/9.167
Percent Probability	89.8%	8.82%	1.1%	0.14%	0.05%
Likelihood	66.67%	13.64%	0.36%	0.04%	0.02%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1		IND (80%)	ORN (98%)	ORN (95%)	IND (99.9%)
Test 2			VP (85%)	VP (93%)	ORN (85%)
Test 3				CIT (90%)	
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Motility (37C)	0.1%	5%	85%	95%	95%
Gelatin Liquefaction	0.1%	0.1%	0.1%	90%	0.1%
Acid from Adonitol	97%	3%	0.1%	5%	5%
Acid from Sorbitol	65%	75%	0.1%	95%	94%
Additional Comments		7		12	

Identification Comments
Very Good Identification of Klebsiella ozaenae
 The strain is probably typical and is moderately well separated from other suggested identification choices

Additional Comments

7. Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group
 12. Previously Enterobacter liquefaciens. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225

UB5

Results Entry		- LYS	+ XYL	- CIT
Test System	Microgen GNA	- ORN	+ DNP	- TDA
Octal Code	0744	- H2S	- IND	
Press ENTER to Calculate Identification		+ GLU	- UR	
		+ MAN	+ VP	
		Lysine Decarboxylase		

Identification Analysis	<i>E. agglomerans</i>	<i>S. rubidaea</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>S. liquefaciens</i>
Select ID Choice	↓	↓	↓	↓	↓
Probability	1/7	1/46	1/2.540	1/3.607	1/4.840
Percent Probability	86,81%	12,6%	0,23%	0,16%	0,12%
Likelihood	100%	4,31%	0,1%	0,1%	0,03%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1		CIT (95%)	CIT (99%)	VP (0,1%)	LYS (95%)
Test 2			ORN (91%)		ORN (95%)
Test 3					CIT (90%)
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Gelatin Liquefaction	2%	90%	0,1%	0,1%	90%
Acid from Adonitol	7%	99%	0,1%	97%	5%
Malonate Utilization	65%	94%	18%	3%	2%
Arginine Dihydrolase	0,1%	0,1%	99%	6%	0,1%
Additional Comments		13	6		12

Identification Comments
Very Good Identification of Enterobacter agglomerans
 The strain is very typical and is moderately well separated from other suggested identification choices

Additional Comments

6. Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1980) 30 : 569-584
12. Previously Enterobacter liquefaciens. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225
13. Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225

UB7

Results Entry		- LYS	+ XYL	- CIT
Test System	Microgen GNA	- ORN	+ DNP	- TDA
Octal Code	0744	- H2S	- IND	
Press ENTER to Calculate Identification		+ GLU	- UR	
		+ MAN	+ VP	
		Lysine Decarboxylase		

Identification Analysis	E. agglomerans	S. rubidaea	E. sakazakii	K. ozaenae	S. liquefaciens
Select ID Choice	↓	↓	↓	↓	↓
Probability	1/7	1/46	1/2.540	1/3.607	1/4.840
Percent Probability	86,81%	12,6%	0,23%	0,16%	0,12%
Likelihood	100%	4,31%	0,1%	0,1%	0,03%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1		CIT (95%)	CIT (99%)	VP (0,1%)	LYS (95%)
Test 2			ORN (91%)		ORN (95%)
Test 3					CIT (90%)
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Gelatin Liquefaction	2%	90%	0,1%	0,1%	90%
Acid from Adonitol	7%	99%	0,1%	97%	5%
Malonate Utilization	65%	94%	18%	3%	2%
Arginine Dihydrolase	0,1%	0,1%	99%	6%	0,1%
Additional Comments	13	6			12

Identification Comments
Very Good Identification of Enterobacter agglomerans
 The strain is very typical and is moderately well separated from other suggested identification choices

Additional Comments

6. Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1980) 30 : 569-584
12. Previously Enterobacter liquefaciens. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225
13. Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225

UB9

Specimen Details		Date	Notes		
Lab Ref.		29/01/2016			
Name					
Specimen Type					
Source (ward/location)					

Results Entry		+ LYS	- XYL	+ CIT
Test System	Microgen GNA	+ ORN	- DNP	- TDA
Octal Code	6002	- H2S	- IND	
		- GLU	- UR	
		- MAN	- VP	
Press ENTER to Calculate Identification		Lysine Decarboxylase		

Identification Analysis	A. haemolyticus	A. baumannii	A. lwoffii	S. Choleraesuis	S. marcescens
	Select ID Choice	↓	↓	↓	↓
Probability	1/28.867	1/768.489	1/2.761.099	1/21.179.391	< 1/100,000,000
Percent Probability	95.27%	3.58%	1%	0.13%	0.02%
Likelihood	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tests against					
Test 1	ORN (0.1%)	GLU (99.9%)	ORN (0.1%)	GLU (99.9%)	GLU (99.9%)
Test 2	CIT (9%)	XYL (97%)	CIT (0.1%)	MAN (98%)	MAN (99%)
Test 3		ORN (8%)		XYL (98%)	VP (98%)
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Acid from Sorbitol	0.1%	0.1%	0.1%	90%	99%
Malonate Utilization	0.1%	98%	0.1%	0.1%	3%
Gelatin Liquefaction	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	90%
Additional Comments	3	1	2	11	

Identification Comments

Acceptable Identification of Acinetobacter haemolyticus
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.
Isolate is **GLUCOSE NEGATIVE** - it is recommended that you check that it is not **OXIDASE POSITIVE**

Additional Comments

- Glucose negative, non haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- Glucose negative, haemolytic Acinetobacter sp, perform nitrate(-) and motility(-)
- Salmonella cannot be fully identified using biochemistry alone. Perform Polyvalent 'O' and 'H' slide agglutination to confirm, and serotype Comments