



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

*CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LA ACTIVIDAD
PECTINOLÍTICA DE MIXOBACTERIAS Y
CITOFAGAS*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS.
P R E S E N T A
SANDRA LUZ CHIRINO RODRÍGUEZ.

MÉXICO, D.F 2008.





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: AGUSTIN REYO HERRERA

VOCAL: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ.

SECRETARIO: EDUARDO BONILLA ESPINOSA.

1er. SUPLENTE: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ.

2do. SUPLENTE: JORGE ARTURO ABURTO ANELL.

SITIO DONDE SE DESAROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA FACULTAD DE QUIMICA.

Asesor del tema:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz. _____

Supervisor técnico:

Dr. Fernando Montiel Aguirre. _____

Sustentante:

Sandra Luz Chirino Rodríguez. _____

DEDICATORIA

A mi mamá y a mi hermana, por estar en cada momento de mi vida, por el apoyo que he recibido, sin ustedes este trabajo no lo hubiera podido lograr tenerlas es lo más valioso en mi vida.

Agradecimientos.

*A mi **mamá** gracias por todo, por tu apoyo, paciencia, por darme todo lo necesario para llegar hasta aquí, ser tu hija es mi mayor orgullo, por estar ahí en cada uno de mis pasos y darme todo para lograr este triunfo, por apoyarme en los momentos más difíciles, por darme un hermoso hogar y una maravillosa vida a mi y a mi hermana. Por todos los sacrificios que has hecho para que llegara hasta aquí. Por darme siempre palabras de aliento y un abrazo cuando lo he necesitado. Por enseñarme a que siempre se puede lograr lo que me propongo; esto lo hicimos juntas.*

*A mi **hermana ale**, gracias por haber llegado a mi vida, por ser mi hermana y mi amiga, por estar siempre que te he necesitado, por entenderme y escucharme, tu manera de ser me ha enseñado mucho día a día, te admiro mucho; por tener esa sonrisa siempre que la he necesitado, esta tesis es la razón de aquellos momentos que no pudimos estar juntas.*

*A mi **papá** por creer en mí y apoyarme.*

A toda mi familia y en especial a las personas que considero de mi familia simplemente por el cariño y el apoyo que siempre me han demostrado.

*A **Tanya** porque más que mi mejor amiga eres mi otra hermana, por haber crecido conmigo y estar desde el comienzo de esta aventura en la carrera, siempre te voy a agradecer que has estado cuando lo he necesitado y por haber leído mi tesis.*

*A **Jimena** por ser parte también de las hermanas y a tu mamá Olivia que me enseñó a leer y a dar mis primeros pasos de mi vida académica.*

***Grupo de apoyo:** mil gracias por todo son mis hermanas.*

*A **Rodrigo** por tu amistad y confianza a lo largo de la carrera, por todas tus palabras y consejos, por haber estado en los momentos más difíciles de la carrera y de la elaboración de esta tesis.*

*A **Alejandra** porque en los años que nos conocimos el trabajo de la tesis nos unió y nos hizo amigas, porque aprendimos de las decepciones y logros que tuvimos, por alegrarte conmigo y sufrir en todo este trayecto.*

*A **Leonardo** por estar conmigo principalmente en esta recta final, por tener tu amistad, por la paciencia, por el apoyo, ayudarme en todo momento y por las cosas aprendidas juntos en esta etapa.*

*A **Olga** porque aunque tuve la fortuna de conocerte al final, gracias por brindarme tu amistad y tantos momentos afuera del laboratorio.*

*A **Norma** por haberme dado tantos consejos en los momentos que más los necesitaba.*

*A **Armando** por tu amistad y principalmente apoyo en el laboratorio.*

A todos los que forman parte del laboratorio donde lleve a cabo este proyecto especialmente a Javier y a Nare por haberme ayudado y enseñado tanto.

*A la **M. en C. Raquel Ortega** y **Dr. Fernando Montiel** por su apoyo y permitirme la oportunidad de desarrollar este proyecto.*

A la Facultad de Química, a mis maestros de la carrera y en especial a los del departamento de Alimentos. Al profesor Agustín Reyo y Lucía Cornejo por todo el apoyo y ayuda para la elaboración de la tesis.

1. Resumen.	7
1. Generalidades.	
1.3 Residuos orgánicos y su tratamiento biotecnológico.	10
1.4 Pared celular vegetal.	10
1.4.1 Polisacáridos de la pared celular.	12
1.4.2 Celulosa.	12
1.1.1 Hemicelulosa.	13
1.1.2 Pectina.	13
1.2 Biodegradación de los polisacáridos presentes en la pared celular vegetal.	15
1.2.1 Enzimas pectinolíticas.	15
1.2.2 Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas.	19
1.3 Composición y ecología microbiana del suelo.	20
1.3.1 Bacterias deslizantes: Mixobacterias y Citofagas.	23
1.3.2 <i>Myxobacterales</i> .	23
1.3.2.1 Movilidad y Swarming.	26
1.3.2.2 Comunicación celular: formación del cuerpo fructífero y mixoesporas.	26
1.3.3 <i>Cytophagales</i> .	29
1.4 Sustratos complejos.	31
1.4.1 Manzana.	31
1.4.2 Naranja.	31
2. Objetivos.	33
3. Metodología.	35
3.1 Identificación y clasificación del microorganismo.	37
3.2 Determinación de condiciones de crecimiento <i>in vitro</i> .	38
3.3 Determinación de condiciones de crecimiento utilizando pectina como fuente de carbono.	39
3.4 Comparación del crecimiento y producción de azúcares reductores, variando la composición del medio y la cantidad de inóculo inicial.	39
3.5 Cuantificación de la actividad enzimática, exopectinolítica.	40
3.6 Evaluación de la actividad enzimática, endopectinolítica.	40
3.7 Evaluación de actividad enzimática. Método en placa con colorante Rojo de Rutenio.	41
3.8 Cuantificación de proteína.	42
3.9 Acondicionamiento de los sustratos.	42
3.10 Evaluación del crecimiento en los sustratos	

complejos.	44
3.11 Cuantificación de la actividad enzimática, exopectinolítica en sustratos complejos.	44
3.12 Cuantificación de proteína en sustratos complejos.	44
3.13 Evaluación de la actividad enzimática, endopectinolítica en sustratos complejos.	44
3.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.	45
4. Resultados y Discusión.	
4.1 Identificación y clasificación del microorganismo.	47
4.2 Determinación de condiciones de crecimiento <i>in vitro</i> .	52
4.3 Determinación de condiciones de crecimiento utilizando pectina como fuente de carbono.	56
4.4 Comparación del crecimiento y producción de azúcares reductores, variando la composición del medio y la cantidad de inóculo inicial.	58
4.5 Cuantificación de la actividad enzimática exopectinolítica.	63
4.6 Evaluación de la actividad enzimática endopectinolítica.	64
4.7 Relación de la cantidad de proteína con la actividad enzimática.	65
4.8 Evaluación cualitativa de la actividad pectinolítica mediante el método en placa con colorante Rojo de Rutenio.	68
4.9 Evaluación del crecimiento en sustratos complejos.	71
4.10 Cuantificación de la actividad enzimática, exopectinolítica en sustratos complejos.	73
4.11 Relación de la cantidad de proteína con la actividad enzimática en sustratos complejos.	75
4.12 Evaluación de la actividad enzimática endopectinolítica en sustratos complejos.	79
4.13 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.	82
4.14 Discusión general.	84
5. Conclusiones.	88
6. Perspectivas.	90
7. Referencias.	93
8. Anexos.	99

RESUMEN.

1. RESUMEN.

El principal componente de la pared celular son polisacáridos y son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza. Forman el 90% de la pared celular vegetal y pueden ser divididos en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. Las pectinas son heteropolisacáridos que su componente principal es el ácido galacturónico (De Vries, 2001).

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas que hidrolizan a las sustancias pécticas. Estas enzimas tienen una gran aplicación a nivel industrial, especialmente en la industria de extracción y clarificación de jugos de fruta. Existe una gran cantidad de microorganismos que son capaces de sintetizar estas enzimas pero para fines industriales las más utilizadas son las provenientes de hongos microscópicos (Gummadi, S. N. 2001).

Sin embargo, también se ha encontrado un gran número de bacterias capaces de producir estas enzimas. Las mixobacterias y citofagas pertenecen al grupo de bacterias deslizantes y fructificantes de los suelos que generalmente se les detecta por la formación de cuerpos fructíferos sobre sustratos sólidos y se ha encontrado que son capaces de secretar enzimas y degradar macromoléculas orgánicas. (Wolfgang, D. 2000). Sin embargo, este grupo de bacterias no ha sido estudiado para dichos fines.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad pectinolítica de este grupo de bacterias, que fueron aisladas de muestras de suelos; el cultivo *in vitro* de estos microorganismos podría servir como una fuente productora de enzimas que lleven a cabo la degradación de polisacáridos, teniendo presente su actividad celulolítica y pectinolítica. El uso de los sustratos complejos permitirá observar la posible capacidad y el potencial degradativo de los polisacáridos presentes en la pared celular vegetal que posean estas bacterias.

Las mixobacterias y citofagas que fueron utilizadas en este trabajo fueron aisladas previamente en el laboratorio en base a su presunta degradación de la celulosa. Las cepas aisladas fueron clasificadas por criterios morfológicos. De las cepas seleccionadas cuatro corresponden al orden de las *Myxobacterales* y dos al orden *Cytophagales*.

Se evaluó el crecimiento variando condiciones como pH (6, 6.5, 7 y 7.5) y temperatura (22, 27 y 32°C) para poder determinar las mejores condiciones de crecimiento *in vitro*. Posteriormente, se evaluó si estas cepas eran capaces de crecer en pectina como única fuente de carbono, se evaluó el crecimiento en dos diferentes temperaturas (32 y 37°C) con el fin de obtener la temperatura donde presentarían un mayor crecimiento; también se evaluaron dos pH's, pH 5 con el fin de saber si bajo condiciones de estrés presentan actividad enzimática como lo reporta la literatura y el pH 7 ya que fue el que presentó un mejor crecimiento en las curvas de crecimiento realizadas. Se observó a pH 7 y temperatura de 37°C un mejor crecimiento. Con el fin de estandarizar las mejores condiciones donde pudieran presentar una mayor actividad enzimática se decidió modificar la composición del medio de pectina añadiendo un promotor de crecimiento (extracto de levadura), y duplicar la cantidad de inóculo inicial y se cuantificaron los azúcares reductores liberados. Al utilizar el doble de inóculo inicial existió una mayor producción de ácido galacturónico que en el medio con pectina con el promotor de crecimiento; por lo que esto se tomó en cuenta para los experimentos posteriores.

Se incubaron las cepas con las condiciones descritas y se cuantificó la actividad exopectinolítica de la enzima en las mismas condiciones; se registró un máximo de actividad a las 72 horas de incubación. La actividad endopectinolítica se midió por la disminución de la viscosidad del medio de pectina con medio mineral, observándose una disminución de más del 50% después de las 24 horas de incubación.

Se utilizaron como sustratos complejos piel de naranja y bagazo de manzana, productos de desecho de la elaboración de jugos. Se evaluó el crecimiento a las mismas condiciones evaluadas anteriormente de pH y temperatura. El crecimiento de las mixobacterias y citofagas fue mucho mayor en los sustratos complejos que en el sustrato de pectina como única fuente de carbono. De la misma manera, las actividades exo y endo pectinolíticas fueron mayores en los sustratos complejos.

GENERALIDADES.

2. GENERALIDADES.

2.1 Residuos orgánicos y su tratamiento biotecnológico.

Los desechos orgánicos principalmente se componen de los residuos del procesamiento de frutas y vegetales. Los problemas del tratamiento de desechos son altos en la lista de problemas ambientales de la sociedad (Wattnapinyo, A. 2003). La respuesta puede recaer en el uso de microorganismos efectivos para desintoxicar la tierra, descontaminar el ambiente y promover métodos altamente sustentables de tratamiento de desechos en un ciclo cerrado agrícola y orgánico (Freitag, D. 2000).

El tratamiento de los residuos por vía microbiana se basa en la biodegradación de las sustancias orgánicas presentes en aquellos y trae consigo varias ventajas como son: 1) disminución en el volumen de residuos orgánicos y 2) el riesgo biológico ambiental es controlado y puede ser compatible con otros sistemas (Freitag, D. 2000).

Se sabe que del proceso de producción de una fábrica de frutas y vegetales el mayor desecho industrial son las aguas residuales. Además de las aguas residuales, el siguiente desecho importante en el proceso son desechos sólidos que incluyen cáscaras, semillas, pulpas o residuos después de la extracción de jugos. También se generan trozos de vegetales, residuos de tratamientos de preparación, los cuales son perecederos y necesitan un tratamiento apropiado y a tiempo (Wattnapinyo, A. 2003).

La pared celular de las plantas sirve de sustrato para la actividad de enzimas de bacterias y hongos. Estas enzimas degradadoras de pared celular vegetal (pectinasas, celulasas y xilanasas) juegan un papel importante en la naturaleza manteniendo el ciclo del carbono y tienen diferentes aplicaciones a nivel industrial (Álvarez, A. 2005).

2.2 Pared celular vegetal.

La pared celular se compone de una estructura polimérica, proteínas, y sustancias aromáticas; las microfibrillas de celulosa cristalina están encajadas en una compleja, altamente hidratada y menos ordenada matriz de polisacáridos, con pequeñas cantidades de proteínas estructurales intercaladas en la matriz. Las moléculas de la pared

experimentan cambios durante la división celular, expansión y diferenciación, a su vez deben proveer de fuerza, regular la porosidad y controlar la adhesión célula-célula (Cosgrove, J. 1997; Waldron, K. 2003) (Figura 1).

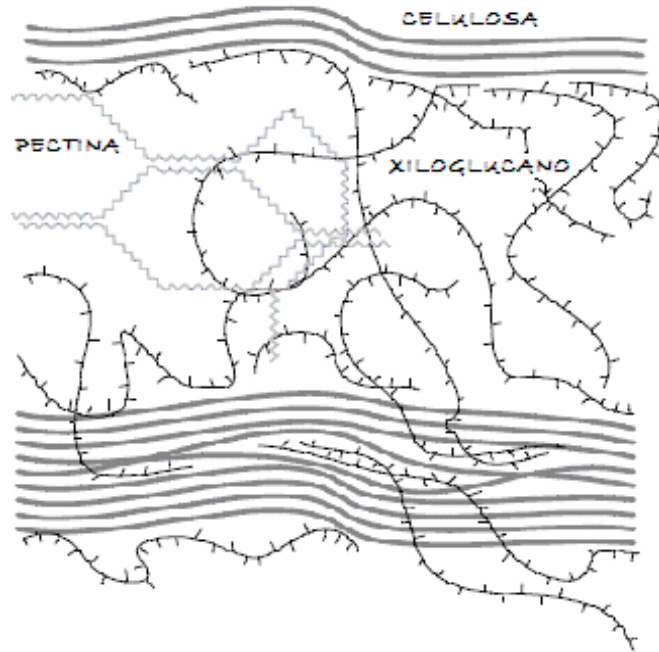


Figura 1: Modelo de la pared celular primaria, muestra los principales polímeros estructurales y su arreglo en la pared. Las pectinas forman un gel en el espacio entre las microfibrillas (Cosgrove, J. 1997).

Desde la perspectiva fisiológica la pared celular vegetal tiene las funciones de soporte y forma celular, transporte, protección contra otros organismos y cambios en el ambiente y reservas en el almacenamiento de nutrientes (Pérez, S. 2000; Waldron, K. 2003).

La clasificación de los polímeros de la pared se ha basado en la estructura química y en los métodos de extracción. Existen tres principales categorías de polisacáridos en la pared celular: pectinas, celulosa y hemicelulosa. Estos se encuentran asociados en diferentes niveles con proteínas estructurales los cuales producen una estructura inextensible y compuestos aromáticos (Waldron, K. 2003).

La hemicelulosa y la pectina, así como los polímeros aromáticos de lignina, interactúan con las fibras de celulosa, creando una estructura rígida fortaleciendo la pared celular vegetal. También forman enlaces covalentes entrecruzados, los cuales limitan el crecimiento de la célula y reducen la habilidad de biodegradación de la pared celular (De Vries, 2001).

La pectina forma un gel en el cual la red celulosa-hemicelulosa esta anclada; puede actuar como relleno hidrofílico para prevenir la agregación y el colapso de la red de celulosa y para modular la porosidad de la pared celular a macromoléculas (Cosgrove, J. 1997).

La pared celular puede ser dividida en tres láminas, la lámina media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria, la cantidad de pectina presente disminuye en este orden. En la pared celular secundaria puede estar virtualmente ausente. La pectina de la lámina media es normalmente llamada “cemento intracelular” o “pegamento celular” (Pilnik, W. et al. 1995).

El cambio en la textura es debido principalmente a cambios estructurales en la pared celular. El mayor y más común cambio en la estructura de la pared celular durante la maduración y almacenamiento está relacionado con pectinas (Pilnik, W. et al. 1995).

2.2.1 Polisacáridos de la pared celular.

Los polisacáridos constituyen del 80 al 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas, los cuales son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y por consiguiente se encuentra en diferentes tipos de desechos principalmente generados por el procesamiento de frutas y verduras (Bayer, E. et al. 2004.; Minic, Z., Jouanin, L. 2006). Se dividen principalmente en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina.

2.2.1.1 Celulosa.

La celulosa representa el mayor constituyente de la pared celular, y consiste en un polímero lineal de enlaces β -D-glucopiranososa con enlaces 1-4; que se condensan por puentes de hidrógeno en estructuras cristalinas, llamadas microfibrillas. Además de la estructura cristalina, la celulosa contiene regiones no cristalinas, amorfas, dentro de las microfibrillas (De Vries. 2001). La celulosa tiene una muy alta fuerza extensible, es insoluble en agua, químicamente estable y relativamente inmune al ataque enzimático (Cosgrove, J. 1997).

2.2.1.2 Hemicelulosa.

Son polisacáridos heterogéneos y es la segunda estructura orgánica más abundante en la pared celular vegetal. El principal polímero que constituye a la hemicelulosa es el xilano, el cual consiste en una cadena de residuos de D-xilosa unidos por enlaces β -1,4 (Waldron, K. 2003). Los xiloglucanos interactúan con las microfibrillas de celulosa para la formación de puentes de hidrógeno, los que contribuyen a la integridad estructural de la red de celulosa. La segunda estructura más común de hemicelulosa es el glucomanano, el cual consiste en una cadena de residuos de D-manosa y D-glucosa. Una porción de los residuos de xilosa pueden tener otros azúcares unidos incluyendo β -galactosa y disacáridos de fucosa y galactosa (Carpita, N. 1996).

2.2.1.3 Pectina.

Las sustancias pécticas son polisacáridos de alto peso molecular, cargadas negativamente y ácidas. La cadena principal la componen residuos de ácido α -D-galacturónico unido por enlaces (1,4) (Jayani, R. et al. 2005) (Figura 2).

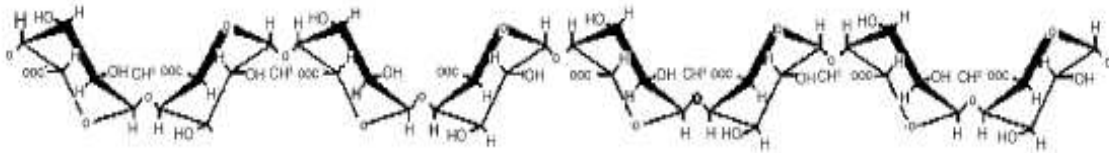


Figura 2. Estructura primaria de las sustancias pécticas (Jayani, R. et al. 2005).

Contiene dos regiones definidas. La región “lisa” u homogalacturonano que consiste en un esqueleto de residuos de ácido α -D-galacturónico unidos por enlaces (1,4), los cuales pueden estar acetilados en el O-2 o en el O-3, o metilados en el O-6. En la región “vellosa” se pueden identificar dos estructuras diferentes. El ramnogalacturonano I es un heteropolímero en el que los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces α (1,2), a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4, y un xilogalacturonano que consiste en una cadena D-xilosa sustituida con galacturonano (Pérez, S. 2000).

El ramnogalacturonano II es un polisacárido de 30 unidades que contiene un esqueleto de ácido galacturónico, sustituido por 4 cadenas laterales que contienen ramnosa, arabinosa y azúcares poco comunes como apiosa y metilfucosa (Pérez, S. 2000) (Figura 3).

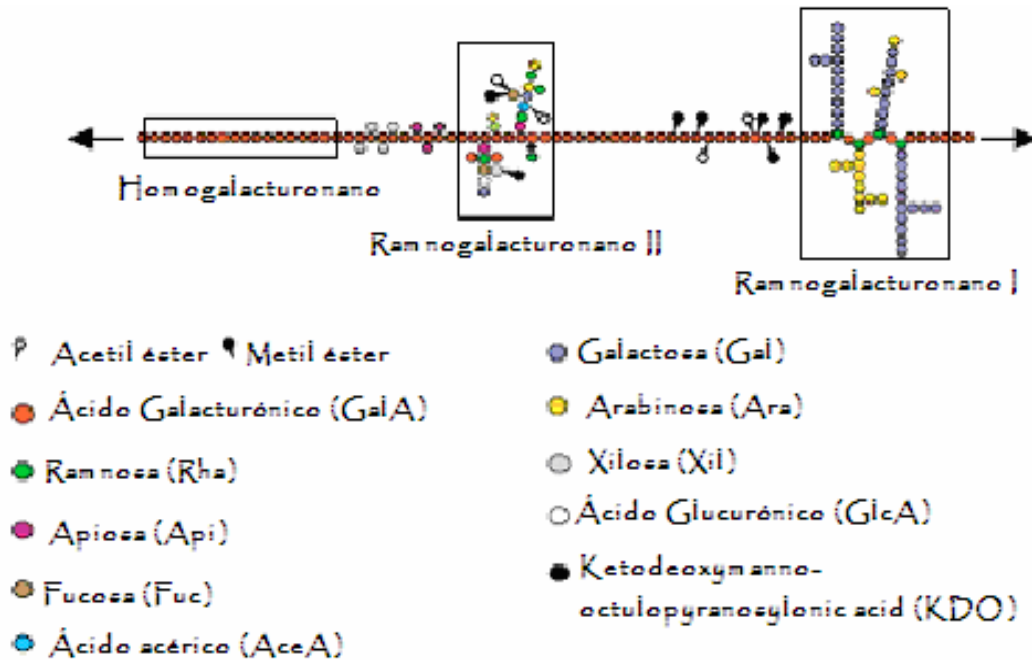


Figura 3. Estructura esquemática de la pectina (Willats, W. 2006).

La Sociedad Química Americana clasifica a las sustancias pécticas en cuatro tipos dependiendo del tipo de modificaciones en la cadena principal (Jayani, R. et.al. 2005):

- ✓ Protopectina: es la sustancia péctica insoluble en agua en el tejido intacto. La protopectina es de la que se producen las sustancias pécticas solubles.
- ✓ Ácido Pécico: es el polímero soluble de galacturonanos que contiene una mínima cantidad de grupos metoxilo.
- ✓ Ácidos Pectínicos: es la cadena de poligalacturonano que contiene >0 y <75% unidades de galacturonato metiladas.
- ✓ Pectina: es el material polimérico en el cual, al menos, 75% de los grupos carboxilo de las unidades de galacturonato están esterificados con metanol. El grado de esterificación es un factor importante en la firmeza de la fruta.

La esterificación de los residuos de ácido galacturónico con metanol y/o ácido acético es importante para las características funcionales de las sustancias pécticas. El grado de

metilación (DM) es definido como el porcentaje de los grupos carboxilo esterificados con metanol. Si más del 50% de los grupos carboxilo están metilados, las pectinas son llamadas pectinas de alto metoxilo (HM); si menos del 50% se encuentran metiladas, son llamadas pectinas de bajo metoxilo (LM). Cuando al menos el 10% de los grupos carboxilo se encuentran metilados, se habla del ácido péctico (Pilnik, W. et al. 1995).

El consumo anual de pectina en todo el mundo es estimado aproximadamente de 45 millones de kilogramos. En la industria alimentaria es conocida principalmente como agente gelificante, es ampliamente usada en la producción de mermeladas, gelatinas, jugos de frutas y rellenos de pastelería. Las propiedades gelificantes dependen de varios factores como lo son: temperatura, tipo de pectina, DE (grado de metilación), DA (grado de acetilación), pH, azúcares y otros solutos como la presencia de calcio (Willats, W. 2006).

2.3 Bio-degradación de los polisacáridos presentes en la pared celular de las plantas.

La pared celular es la principal parte de la biomasa cruda la cual es utilizada en una amplia variedad de procesos industriales. El primer paso en el procesamiento industrial de la biomasa frecuentemente incluye la degradación de la fracción polimérica. Es por esto que las enzimas capaces de degradar la pared celular vegetal pueden utilizarse en muchos procesos y proveen buenas alternativas a procesamientos químicos (De Vries, 2001; Olsson, L. et al. 2003).

En investigaciones recientes en celulasas, hemicelulasas y pectinasas se revela el potencial biotecnológico en diferentes industrias, incluyendo la industria alimentaria, textil, en la agricultura, pulpa y papel, entre otras (Bhat, M.K. 2000).

2.3.1 Enzimas pectinolíticas.

Las pectinasas son clasificadas de acuerdo a los siguientes criterios: si es preferido como sustrato la pectina, el ácido péctico o el oligo-D-galacturonato, si las pectinasas actúan por trans-eliminación o por hidrólisis, y si la ruptura es al azar (endo-, o enzimas despolimerizantes o licuefactantes) o en el extremo (exo- o enzimas sacarificantes)

(Gummadi, S. et al. 2003; Jayani, R. et al. 2005). Los tres principales tipos de pectinasas son los siguientes: (Figura 4)

- I. Protopectinasas (PPases): degradan la protopectina insoluble y elevan altamente la solubilidad de la pectina. Son clasificadas en dos tipos, con base al mecanismo de reacción, tipo A el cual reacciona en el sitio interno, y el tipo B reacciona en el sitio externo de la molécula. Las enzimas catalizan la hidrólisis del ácido poligalacturónico (Kashyap, D. et al. 2001).
- II. Esterasas (Pectinesteras, PE, pectinmetilesteras, E.C. 3.3.3.11): catalizan la de-esterificación de la pectina eliminando los grupos metoxilo formando ácido péctico (Kashyap, D. et al. 2001).
- III. Despolimerasas: catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos α -(1,4) en el ácido D-galacturónico de las sustancias pécticas, la pueden llevar a cabo de dos formas: de manera hidrolítica (hidrolasas) o por β -eliminación (liasas) (Kashyap, D. et al. 2001).

a) Hidrolasas.

Las hidrolasas incluyen a las polimetilgalacturonasas (PMG) que catalizan el rompimiento de los enlaces glucosídicos α -1,4. Pueden ser endo-PMG si rompen los enlaces al azar en la cadena de pectina; y exo-PMG si causan rupturas secuenciales del extremo no reductor de la cadena de pectina.

Otro tipo de enzimas hidrolasas son las poligalacturonasas (PG) que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico (ácido poligalacturónico). También existen dos tipos: endo-PG (E.C. 3.2.1.15) que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico; y exo-PG (E.C. 3.2.1.67) catalizan la hidrólisis en una forma secuencial de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico.

b) Liasas.

Las liasas llevan a cabo una ruptura no hidrolítica de los pectatos o pectinatos caracterizado por una fractura de trans-eliminación del polímero péctico.

Incluyen:

1. Polimetilgalacturonato liasas (PMGL): catalizan la ruptura de la pectina por trans-eliminación y son: endo-PMGL (E.C. 4.2.2.10) que catalizan al azar la ruptura de los enlaces glucosídicos α -1,4 en la pectina; y exo-PMGL que catalizan la ruptura por etapas de la pectina por trans-eliminación.
2. Poligalacturonato liasas (PGL): catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico por trans-eliminación. También existen dos tipos: endo-PGL (E.C. 4.2.2.2) que cataliza la ruptura al azar de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico; y exo-PGL (E.C. 4.2.2.9) que cataliza la ruptura secuencial de los enlaces glucosídicos α -1,4 en el ácido péctico. Este grupo de enzimas pectinolíticas son el mayor grupo encontrado en bacterias (Kashyap, D. et al. 2001; Gummadi, S. et al. 2003; Jayani, R. et al. 2005).

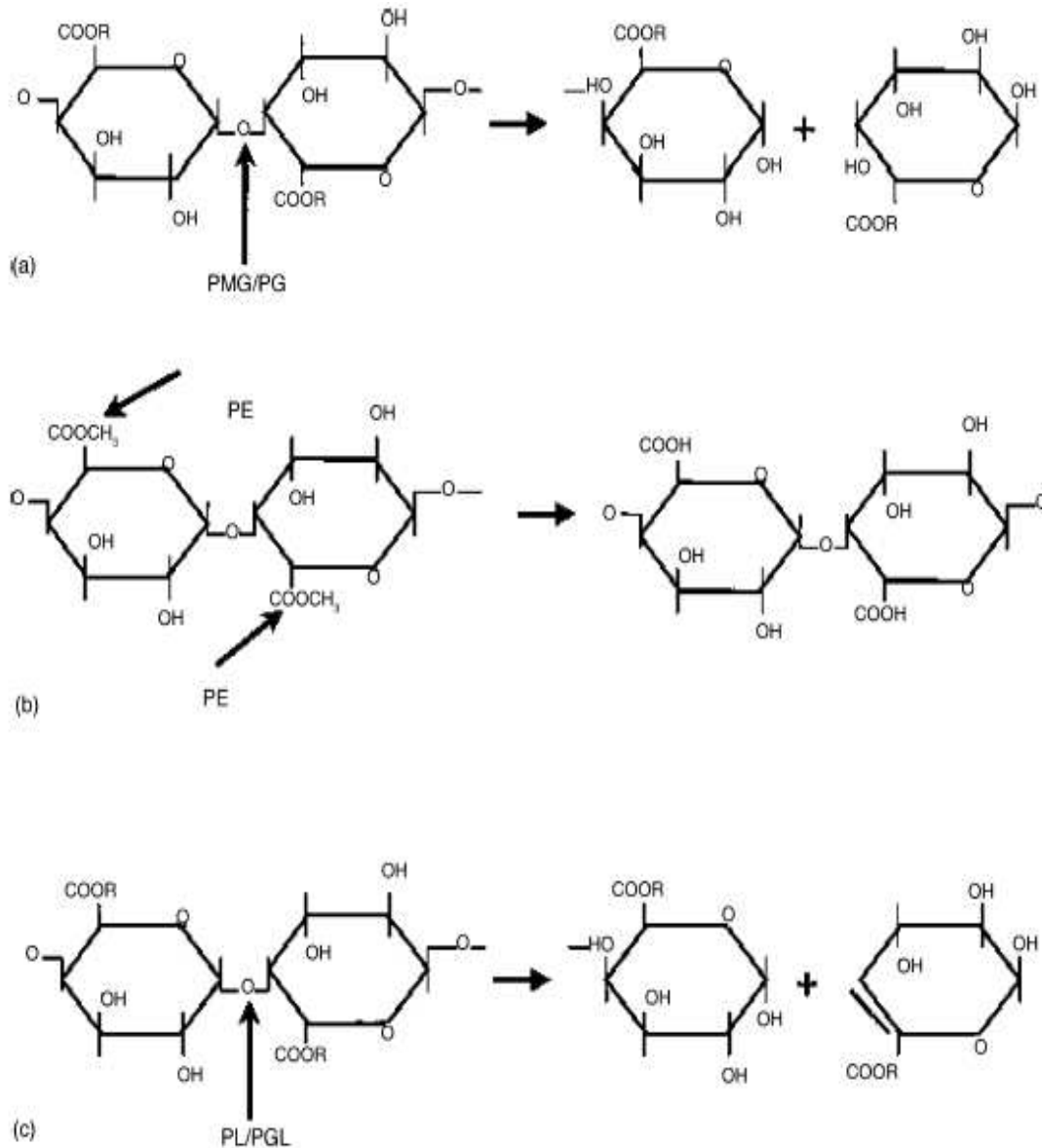


Figura 4. Los diferentes tipos de pectinasas y su forma de acción. (a) R=H para PG y CH₃ (b) PE y (c) R=H para PGL y CH₃. La flecha indica el lugar donde las pectinasas reaccionan con las sustancias pécticas. PMG polimetilgalacturonasa, PG poligalacturonasa (EC 3.2.1 15) PE: pectinesterasa (EC 3.1.1 11), PL: pectiniliasas (4.2.2 10) (Jayani, R. et al. 2005).

Entre los principales métodos para la detección de la actividad de estas enzimas se encuentran: medición de la cantidad de ácido D-galacturónico liberado, el incremento de la cantidad de grupos reductores o por la disminución en la viscosidad de la solución del sustrato; la cantidad de azúcares reductores puede ser medida por métodos colorimétricos como con el reactivo 3,5-ácido dinitrosalicílico, o con el reactivo de arsenimolibdato de cobre o actividad en agar en placa, entre otros (Feoli, M. et al. 1997).

2.3.2. Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas.

La producción de enzimas por microorganismos es preferida ya que son de rápido crecimiento, pueden ser fácilmente controlados durante el crecimiento y las enzimas producidas son fáciles de extraer. En algunos casos, los microorganismos producen enzimas extracelulares haciendo la extracción y la purificación aun más simple (Taylor, A.J. 1991).

A lo largo de los años, las pectinasas han sido utilizadas en varios procesos industriales convencionales. Entre los procesos más comunes en las que han sido utilizadas se encuentran (Alkorta, I. et al. 1998; Jayani, R. et al. 2005):

★ Extracción de jugo de frutas.

La mayor aplicación industrial de las pectinasas es en la extracción de jugo de frutas y la clarificación. Las pectinas contribuyen a la viscosidad y la turbidez en el jugo de fruta. Una mezcla de pectinasas y amilasas es utilizada para clarificar jugos de frutas (Kashyap, D. et al. 2001).

Las enzimas de maceración son generalmente utilizadas en dos pasos: 1) después del prensado, para macerar la pulpa de fruta de manera parcial o para una total licuefacción, el cual no solo incrementa el rendimiento del jugo y reduce el tiempo del proceso, sino que incrementa la extracción de componentes importantes de la fruta y 2) después de la extracción de jugo las pectinasas son utilizadas para su clarificación. Por lo tanto, disminuyen la viscosidad e incrementan la tasa de filtración y la estabilidad del producto final (Bhat, M.K, 2000).

★ Procesos textiles.

Las pectinasas han sido utilizadas en conjunto con las amilasas, lipasas, celulasas y hemicelulasas para remover agentes presentes en el algodón de una manera segura y amable con el ambiente, remplazando a la sosa cáustica utilizada para este propósito anteriormente (Jayani, R. et al. 2005; Reddy, N. 2005).

★ Tratamiento de aguas residuales.

Los desechos de agua de industrias donde se procesan vegetales contienen pectina. El pretratamiento de esta agua con enzimas pectinolíticas facilitan el retiro del material péctico (Jayani, R. et al. 2005).

Otros procesos en los cuales las enzimas pectinolíticas son altamente utilizadas para la mejora de rendimiento o la sustitución del uso de productos químicos es en la fermentación del café y té, en la industria de la pulpa y el papel, alimentos para animales, extracción de aceites, producción de vino, entre otros.

La habilidad de sintetizar pectinasas esta altamente distribuida dentro de todos los grupos microbianos. La mayoría de las preparaciones comerciales de pectinasas son obtenidas de hongos por ejemplo *Aspergillus niger*. Sin embargo se ha encontrado que existen bacterias que producen enzimas pectinolíticas; entre ellas destacan *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thelotamicron*, *Bacillus sp.* (Jayani, R. et al. 2005).

En el año 2000 la industria de las enzimas ha alcanzado un mercado de 1,600 millones de dólares. El 60% de la producción de enzimas se realiza en Europa, el 40% restante en EUA y Japón. Las celulasas, hemicelulasas y pectinasas forman el 20% del mercado mundial de enzimas (Bhat, M.K, 2000).

2.4 Composición y ecología microbiana del suelo.

El suelo representa un complejo ecosistema en el cual las relaciones y las interacciones entre los microorganismos también son complejas. La diversidad microbiana es crítica para el funcionamiento del ecosistema debido a la diversidad de procesos como la descomposición, los ciclos de nutrientes, agregaciones en el suelo y patogenicidad. Se estima que en 1g de suelo puede existir más de 10 millones de bacterias de posiblemente 4000-7000 especies diferentes (Dubey, K.S. et al. 2006).

Los principales grupos funcionales en la biota del suelo y en el proceso del ecosistema incluyen: 1) micro simbióticos, 2) degradadores, 3) transformadores de elementos, 4)

ingenieros del ecosistema del suelo, como gusanos de tierra y termitas, 5) parásitos del suelo y 6) micro reguladores (Barrios, E. 2006) (Figura 5).

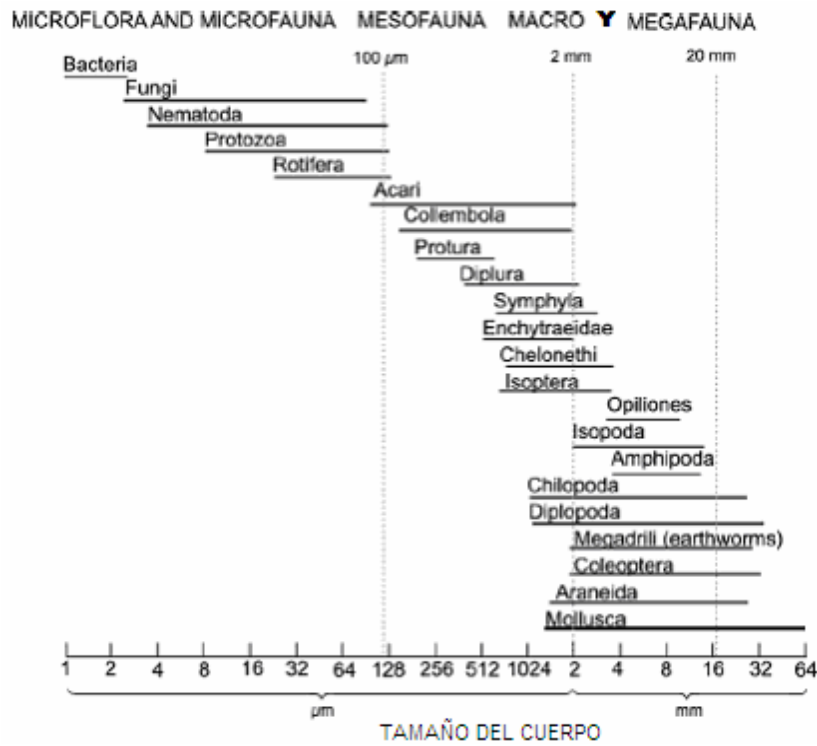


Figura 5: Clasificación de tamaño de los organismos del suelo con base al ancho del cuerpo (Barrios, E. 2006).

La materia orgánica en el suelo es reconocida como crucial para la calidad del suelo y para la regulación de muchas de sus funciones. Generalmente, existen tres clases de mecanismos que son considerados para estabilizar la materia orgánica en el suelo: 1) La degradación de macromoléculas orgánicas específicas por microorganismo y enzimas 2) Estabilización química debido a varias interacciones de moléculas orgánicas, condensación en la superficie, o absorción, conduciendo a la disminución de la disponibilidad de sustratos orgánicos y 3) protección física de sustratos orgánicos en contra del acceso de agentes degradadores, causado por la oclusión del sustrato dentro de los agregados (Ekschmitt, K. et al. 2005).

Las transformaciones de la materia orgánica del suelo, juegan un importante papel en los ecosistemas naturales y en la agricultura (Paul, E. 1984). Los cambios en la materia orgánica entrante, así como, la distribución de la basura dentro del perfil del suelo, modifica las propiedades biológicas, químicas y físicas del suelo (Poll, C. 2003).

Los hongos y las bacterias son los principales agentes en la descomposición de la basura y en la mineralización de los nutrientes orgánicos en nutrientes inorgánicos esenciales para el crecimiento de las plantas. De la misma manera estos microorganismos juegan un papel cambiante en varios ciclos bioquímicos y son responsables de completar el ciclo de compuestos orgánicos, como en los ciclos del carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y fósforo (Kirk, L.J. et al. 2004).

Los microorganismos necesitan producir exoenzimas que convierten compuestos poliméricos, como la celulosa, lignina, pectina y hemicelulosas, en pequeñas moléculas que pueden ser asimiladas. Las enzimas más relevantes en este aspecto son las que rompen las fibras de las plantas como las celulasas, hemicelulasas, pectinasas y fenol oxidasas (Romaní, A. et al. 2006).

La descomposición completa de los residuos de plantas requiere de las acciones combinadas de un amplio grupo de microorganismos. Sin embargo, se asume que las bacterias descomponen principalmente polisacáridos y compuestos poliméricos después de una previa descomposición llevada a cabo por hongos. Las bacterias y los hongos, con sus respectivas capacidades de secretar enzimas actúan juntos para llevar a cabo la descomposición y mineralización de los residuos de plantas (Romaní, A. et al. 2006).

En varios grupos de bacterias se ha observado un quórum de detección (quorum sensing QS) que es un mecanismo de comunicación célula-célula en las bacterias y se refiere a que ciertos rasgos solo son expresados cuando las bacterias se encuentran juntas. Esto les permite actuar de manera coordinada y refuerza la noción del beneficio de las bacterias de un comportamiento grupal cooperativo para sobrevivir, competir, persistir en la naturaleza o colonizar un huésped en particular (Von Bodman, S. et al. 2003).

Un grupo común de bacterias heterotróficas del suelo son las bacterias deslizantes como las mixobacterias y las citofagas; las mixobacterias, a diferencia de las citofagas, se distinguen por la formación de cuerpos fructíferos que pueden ser observados a simple vista, la formación de dichos cuerpos la llevan a cabo bajo estados de inanición para poder sobrevivir a condiciones extremas del ambiente (Reichenbach, H. 2001).

2.4.1 Bacterias deslizantes: Mixobacterias y Citofagas.

Las bacterias deslizantes, son un grupo filogenéticamente heterogéneo. La característica que las define es su movimiento deslizante. Principalmente existen dos tipos de bacterias deslizantes; el orden de los *Myxobacterales* y las *Cytophagales*; que comparten ciertas características como lo es la forma del bacilo o la composición de la pared celular; sin embargo, no todas las características de los dos grupos son específicas o discriminativas para este tipo de bacterias, aunque algunas son prerequisites para el movimiento deslizante como lo es la arquitectura de la pared celular y la composición y producción del limo (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

Algunas bacterias deslizantes se mueven lentamente, o se mueven solo durante ciertas fases de su crecimiento, así que la observación directa del deslizamiento podría no ser posible. En algunos casos, el deslizamiento puede ser algunas veces deducido por la presencia del limo dejado en el camino por las células en movimiento (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

2.4.2 *Myxobacterales*.

Las mixobacterias son bacterias deslizantes, bacilos Gram negativos, unicelulares; que se presentan en los suelos. Son caracterizadas debido a su deslizamiento sobre las superficies y por tener un complejo ciclo de desarrollo. Son capaces de deslizarse en contacto con la superficie sólida o en la interfase agua-aire, pero no cuentan con organelos locomotores detectables. Las células de las mixobacterias son bacilos que, dependiendo del suborden, miden de 0.6-0.9µm de ancho y 3-8µm de largo (Dworkin, M. 1996; Reichenbach, H. 1999).

Son quimiorganótrofos, mesófilos, aerobios estrictos, la producción de energía la llevan a cabo por respiración y no por fermentación. Típicamente producen enzimas capaces de hidrolizar macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos y varios polisacáridos incluyendo, en algunas especies, celulosa. También son capaces de lisar a otros microorganismos eucariotas y procariotas. Su multiplicación se lleva a cabo por fisión binaria transversal (Dworkin, M. 1996). El genoma de las mixobacterias es un cromosoma típico de bacterias en forma de anillo con 9450 kpb. El DNA de las

mixobacterias contiene una concentración de GC de entre 64-72% (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981; Wolfgang, D. 2000).

El rango de pH para su crecimiento es muy amplio, aproximadamente de 6.5 a 8.5, solamente las mixobacterias celulolíticas pueden crecer a un pH más bajo, de 5.0. La temperatura óptima usualmente es entre 32 y 36°C y puede existir un máximo alrededor de los 38°C. Se pueden propagar en un rango de temperatura de 9-38°C, el tiempo de su generación se encuentra entre 4 a 12 horas (Shimkets, L. 1990; Wolfgang, D. 2000).

El principal hábitat de las mixobacterias es el suelo, siendo su presencia muy común y ampliamente distribuidas (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981). Sin embargo, frecuentemente se encuentran en estiércol de herbívoros, material vegetal en descomposición y en la corteza de árboles. Aunque las mixobacterias generalmente prefieren suelos con un pH neutro también han sido reportadas en suelos ácidos (pH 3.7) y alcalinos (pH 8-9.2) (Wolfgang, D. 2000).

Las mixobacterias se distinguen de otras bacterias por su comportamiento social único, basado en un sistema de comunicación de interacciones célula-célula. Lo más notable es la formación de cuerpos fructíferos multicelulares que contienen mixoesporas. La mayoría de los estudios en la biología del comportamiento social se han limitado a una especie: *Myxococcus xanthus* (Shimkets, L. 1990).

En el comportamiento social participan miles de células y dependen de tres propiedades interrelacionadas de las células: la secreción de diferentes moléculas, el movimiento deslizante y la interacción mediante el contacto célula-célula (Shimkets, L. 1990).

Las células se encuentran envueltas en una pared celular de diferentes capas, incluyendo una capa delgada de peptidoglucano. La membrana exterior consiste en proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Las células por lo general se encuentran embebidas en un "limo" o "slime", siendo ésta una sustancia viscosa y espesa (Shimkets, L. 1990; Wolfgang, D. 2000).

Todas las mixobacterias conocidas están unidas en un único orden, *Myxobacteriales*, las cuales pueden ser divididas en dos subórdenes: *Cystobacterineae* y *Sorangineae*. Los

miembros de los subórdenes se diferencian principalmente en la forma celular, en la manera en la que las mixoesporas son formadas, en el tipo de ácidos grasos, en la naturaleza de su limo y en su habilidad para utilizar compuestos inorgánicos nitrogenados (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981; Dworkin, M. 1996; Wolfgang, D. 2000).

Grupo I degradadores de celulosa, suborden *Sorangineae*, es capaz de utilizar compuestos inorgánicos nitrogenados. Tienen requerimientos nutricionales simples, mientras que su crecimiento es a base de celulosa y glucosa, la formación de celulasas es reprimida por contenidos altos de azúcares. Son bacilos cilíndricos rígidos con bordes redondos de hasta 1µm de ancho y hasta 10µm de largo (Dworkin, M. 1996; Wolfgang, D. 2000).

Grupo II suborden *Cystobacterineae* representa la mayoría de las especies de las mixobacterias, las cuales no son capaces de hacer uso de la celulosa; su crecimiento depende de los aminoácidos presentes, sustratos como las peptonas, oligopéptidos o aminoácidos simples. Estos organismos pueden sobrevivir a base de otros microorganismos, los cuales pueden degradar por una variedad de exoenzimas hidrolíticas (proteasas, nucleasas, lipasas, enzimas que pueden llevar a cabo la lisis de la pared celular). Son bacilos pequeños, usualmente flexibles, de hasta 1µm de diámetro y hasta 20µm de largos (Dworkin, M. 1996; Wolfgang, D. 2000).

Las mixobacterias degradadoras de celulosa compiten con los hongos por el sustrato mientras que las mixobacterias proteolíticas viven en competencia con otros degradadores de materia orgánica (Zhang-Cai Y. 2003).

La mayoría de las mixobacterias desarrollan pigmentación, especialmente cuando crecen bajo la luz, ya que la síntesis de pigmentos es estimulada por la luz. Si las células durante su fase exponencial del crecimiento son expuestas a la luz, se provoca la inducción de la síntesis de carotenoides que se acelera al alcanzar la fase estacionaria (Dworkin, M. 1996).

2.4.2.1 Movilidad y Swarming.

Las mixobacterias presentan un comportamiento social que se expresa de manera colectiva para la ingesta de alimento. Este movimiento es acompañado por el plegamiento de las células y la secreción del limo. Las mixobacterias deslizantes al desplazarse dejan rastros de la mucosidad secretada detrás de ellas y otras células pueden moverse sobre dichos rastros. Esta mucosidad ha sido descrita como un complejo de proteína-polisacárido-lípido. Pueden contribuir ocasionalmente al deterioro de materiales como las fibras de celulosa. No cuentan con organelos extracelulares de movimiento como flagelos. La estructura de la capa de peptidoglucano puede servir como un instrumento para las contracciones de la célula (Dworkin, M. 1996; Wolfgang, D. 2000).

Las células deslizantes frecuentemente se mueven en grandes y organizados grupos conocidos como enjambres o "swarms"; el "swarming" es el esparcimiento multicelular que llevan a cabo las bacterias sobre una superficie; los miembros mantienen contacto continuo con las células adyacentes durante el movimiento. Debido a la proximidad de las células, las moléculas secretadas por una célula pueden beneficiar a ambas, a la productora y a las células vecinas. La movilidad de las mixobacterias es determinada por la temperatura, la concentración de nutrientes y la densidad original de las células (Shimkets, L. 1990; Wolgemuth, Ch. 2002).

2.4.2.2 Comunicación celular: formación del cuerpo fructífero y mixoesporas.

La capacidad de formar cuerpos fructíferos es la propiedad más interesante de las mixobacterias. Bajo las condiciones ambientales apropiadas, las células se agregan y forman cuerpos fructíferos que contienen limo y células y que frecuentemente son coloridos. Pueden ser blancos, cafés, amarillos brillante, naranjas, rojos o lilas, pueden ser de dimensiones macroscópicas, su tamaño varía entre 10 y 100 μ m. Las células dentro de los cuerpos fructíferos se convierten en células en estado latente llamadas mixoesporas (Dworkin, M. 1996; Wolfgang, D. 2000).

La formación del cuerpo fructífero es inducida por una deficiencia nutricional y es controlada por la concentración de nutrientes, pH, cationes y temperatura. Es una morfogénesis cooperativa por las células vegetativas del enjambre. El proceso sigue una

secuencia particular (Grillione, P. y Pangborn, J. 1975; Dworkin, M. 1996, Shimkets L. 1999; Wolfgang, D. 2000):

1. Un gran número de células del enjambre (10^5 - 10^7) pierden su individualidad física durante la morfogénesis.
2. El crecimiento vegetativo de los bacilos cesa.
3. En ciertas posiciones de la colonia las células forman agregados.
4. Las moléculas secretadas en la superficie de la célula provoca señales para que las células se mantengan unidas.
5. La consecuencia es una aglutinación no estructurada de masas celulares que se autolisan.
6. La formación de elementos estructurales especiales como los esporangios comienza.
7. La forma característica del cuerpo fructífero es definida.
8. Durante la fase de la maduración las células vegetativas son transformadas a mixoesporas por una morfogénesis celular.

El proceso completo de la formación del cuerpo fructífero dura de 12 a 14 horas bajo las condiciones óptimas.

En la Figura 6 se muestra la morfogénesis del cuerpo fructífero de *Myxococcus xanthus*, que se ha estudiado por microscopía electrónica; al principio del desarrollo se observa que las células se han acomodado en forma de espiral; continua la agregación hacia el centro; antes de terminar el agregado la esporulación comienza del interior hacia la periferia; de tal manera que a las 24 horas se puede observar el cuerpo fructífero ya formado (Schimkets, L. 1990).

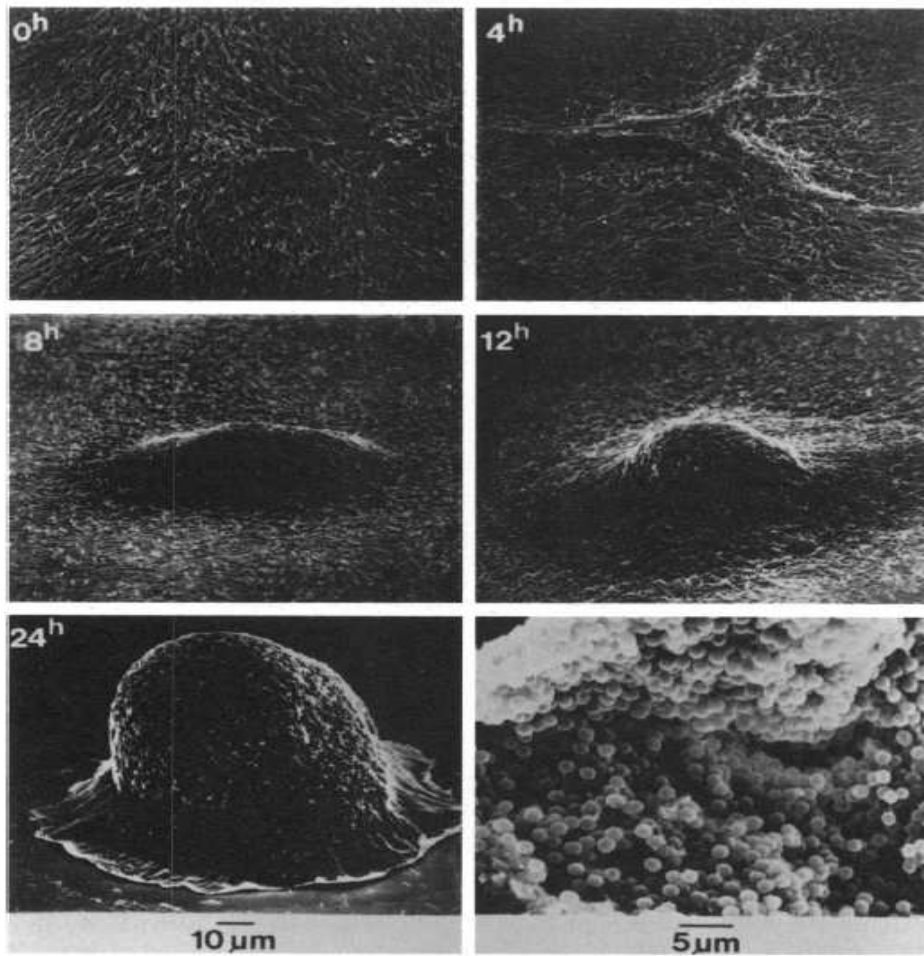


Figura 6. Microscopía electrónica de *Myxococcus xanthus* durante la formación del cuerpo fructífero (Schimkets, L. 1990).

La formación de las mixoesporas ocurre dentro de los esporangiolos que están madurando y de los cuerpos fructíferos. El propósito de la formación de las mixoesporas es la supervivencia de las mixobacterias durante condiciones de vida no favorables como periodos de frío y calor, deshidratación, pH ácido y estados de inanición; son resistentes a ondas ultrasónicas y radiaciones ultravioletas (Dworkin, M. 1996). La resistencia a la temperatura, sin embargo, solo es un poco mejor que en las células vegetativas, ya que las mixoesporas pueden sobrevivir a 58-62°C por 10-60 minutos (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

El propósito de los cuerpos fructíferos es el comienzo de un nuevo ciclo de vida con una gran población, para hidrolizar biopolímeros extracelulares utilizando exoenzimas y, así, utilizar las fuentes nutricionales con una máxima eficiencia (Dworkin, M. 1996).

2.4.3 *Cytophagales*.

Son bacterias deslizantes en forma de bacilos, unicelulares, Gram negativos, aerobios, caracterizados por una extrema flexibilidad y baja refractibilidad; a diferencia de las mixobacterias, no llevan a cabo la formación de cuerpos fructíferos (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

Son encontradas en una gran cantidad de habitats que son ricos en materia orgánica como suelos, las cortezas de árboles, material vegetal en descomposición o en estiércol de herbívoros; principalmente se encuentran en suelos con pH neutro o cercano, su temperatura de crecimiento óptima está entre los 20-30°C y el contenido de GC se encuentra entre 33-42% (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

Muchos miembros de los *Cytophagales* son degradadoras de polímeros, incluyendo agar, celulosa, pectina, quitina, queratina y proteínas. Debido a que estos microorganismos se encuentran en gran cantidad en el suelo, probablemente jueguen un importante papel en el equilibrio de la naturaleza (Reichenbach H., Dworkin, M. 1981).

Las citofagas llevan a cabo también un desplazamiento lento, existe una aparente coordinación entre las diferentes células que están en la masa celular. Si bien, no existe una conexión física evidente entre las células, la dirección y la velocidad del movimiento de algunas células en el ápice controla las actividades de una gran cantidad de células que las siguen (Figura 7).

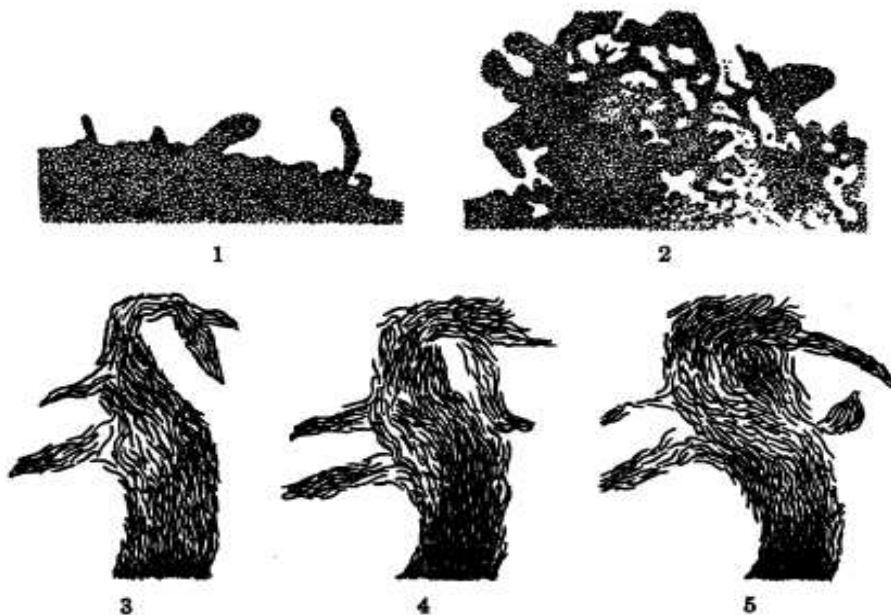


Figura 7. 7.1 *Cytophaga krzemieniewskii*. Borde de la microcolonia al comenzar el desplazamiento de las células vegetativas. 7.2 *Cytophaga krzemieniewskii*. El borde de la colonia horas después que en 7.1; la irregularidad en los campos se debe a la fusión de masas separadas. 7.3-7.5 *Cytophaga krzemieniewskii*. Etapas sucesivas en el desarrollo de las masas en movimiento, durante un periodo de 10 minutos. (Stanier, R.Y. 1940).

Para que lleven a cabo el deslizamiento es necesario que las células estén en contacto con una superficie, sólida o líquida como una película de agua, vidrio, agar, celulosa o inclusive otras células. El movimiento lineal o plegamiento de las células, se ve afectado por la concentración de oxígeno y la temperatura. En lugares muy húmedos, todo movimiento cesa después de un cierto tiempo, excepto en los bordes y junto a burbujas de aire. El movimiento de las citofagas en el suelo se puede notar de 28 a 30°C; en la medida en que la temperatura baje, se reduce el movimiento, llegando a 20°C donde el movimiento es muy poco (Stanier, R.Y. 1940).

Muchos organismos de este grupo muestran cambios en la forma celular, los cuales pueden ser en células esféricas (microcistos), o resultan en poblaciones altamente pleomórficas. Las colonias de casi todos los miembros de las *Cytophagales* son amarillas, naranjas o rojas.

La mayoría de las bacterias del orden de las *Cytophagales* pueden ser cultivadas en medios relativamente simples. El extracto de levadura estimula su crecimiento apreciablemente. El azúcar tiene dos efectos: es una fuente de carbono y de energía

conveniente y es parcialmente transformada en ácidos que retrasan el aumento del pH del medio, así como la producción de amonio a partir de los aminoácidos.

2.5. Sustratos complejos.

Los sustratos complejos que se utilizaron en este trabajo fueron residuos orgánicos obtenidos del procesamiento en la elaboración de jugos de fruta. El uso de estos sustratos permitió observar de una manera más precisa el comportamiento de las bacterias en un ambiente más parecido del cual fueron aisladas. Los sustratos complejos utilizados fueron:

2.5.1. Manzana (*Pyrus malus L.*).

Es el fruto del manzano, árbol de la familia de las Rosáceas. La facilidad de adaptación de este árbol a diferentes climas y suelos, el valor nutritivo de sus frutos y la resistencia a las más bajas temperaturas permiten cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente frío. Existen más de mil variedades de manzanas en todo el mundo. La composición química de la manzana es aproximadamente: 85% de agua, 10.5% de carbohidratos, 2.3% fibra, 0.3% proteínas, 0.4% grasa y 0.2% cenizas (Root, W. 2005).

2.5.2 Naranja.

La naranja es el fruto del naranjo dulce, árbol que pertenece al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. Existen principalmente dos especies de las naranjas comerciales: *Citrus sinensis* o la naranja dulce *Citrus aurantium*. El árbol se adapta a una gran variedad de climas (Kimball, D. 2005).

La composición por 100g de porción comestible es de 8.9g carbohidratos, 2.3g fibra, 200mg potasio, 15.2mg magnesio, 41mg calcio, 50.6mg vitamina C, 38.7µg ácido fólico, 49µg beta-caroteno (provitamina A); el tipo predominante de fibra en la naranja es la pectina, la cual conforma del 65 al 70% de la fibra total; la fibra restante está en forma de celulosa, hemicelulosa y cantidades trazas de lignina. La cantidad de fibra es apreciable y ésta se encuentra sobre todo en la parte blanca entre la pulpa y la corteza (Kimball, D. 2005).

OBJETIVOS.

3. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- ★ Evaluar la actividad pectinolítica de mixobacterias y citofagas, aisladas de muestras ambientales.

Objetivos Particulares.

- ★ Identificar a las mixobacterias por la formación de cuerpos fructíferos.
- ★ Determinar la morfología macroscópica y microscópica de mixobacterias y citofagas.
- ★ Determinar condiciones adecuadas de cultivo *in vitro* de mixobacterias y citofagas.
- ★ Determinar las condiciones apropiadas de temperatura y pH para su crecimiento *in vitro* de las cepas aisladas.
- ★ Determinar las condiciones de mejor crecimiento de las bacterias utilizando pectina como única fuente de carbono.
- ★ Evaluar la actividad enzimática (endo y exo) pectinolítica de las mixobacterias y citofagas en pectina.
- ★ Evaluar el crecimiento y la capacidad enzimática (endo y exo) en sustratos complejos.
- ★ Cuantificar la cantidad de proteína producida en el cultivo y su relación con la actividad enzimática.

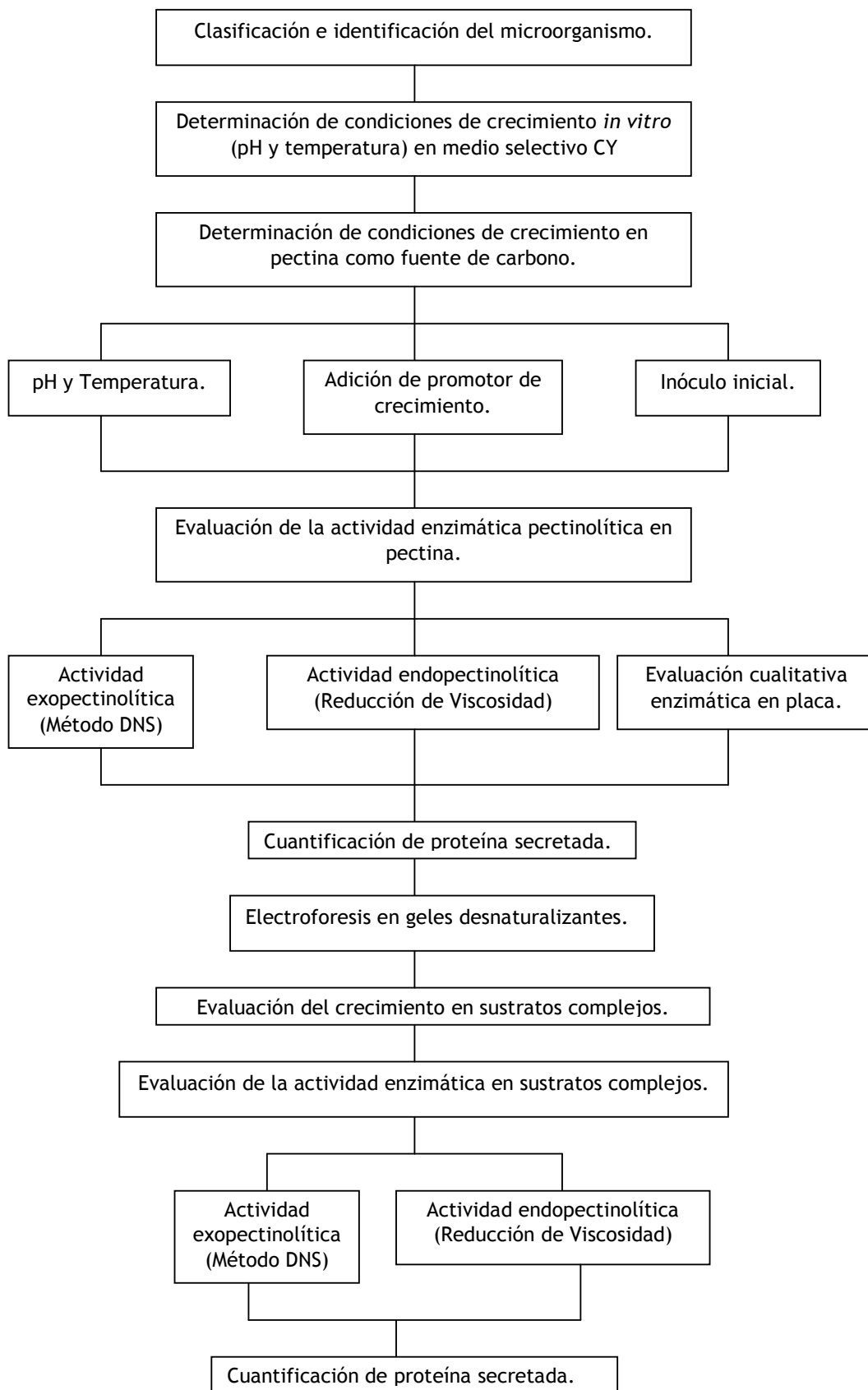
METODOLOGÍA.

4. METODOLOGÍA.

Se utilizaron cepas previamente aisladas en el laboratorio. El aislamiento se realizó de diferentes muestras de suelos urbanos y semi-urbanos de la Cd. De México; dichas muestras fueron tratadas con fungicida (Benomil) para eliminar hongos y posteriormente se dejaron secar en una estufa a 27°C durante 7 días. Una vez secas las muestras se guardaron en bolsas estériles a temperatura ambiente dentro del laboratorio hasta su uso.

Se colocaron las muestras en Cajas Petri con sílica gel como soporte y papel filtro como única fuente de carbono; se les agregó medio mineral adicionado con cicloheximida, para evitar el crecimiento de hongos. Se incubaron a temperatura ambiente en cámaras húmedas durante 3 semanas. Se observaron con un microscopio de disección con un aumento de 10x, cada 4 días para identificar la aparición de cuerpos fructíferos. El criterio de aislamiento se basó en la búsqueda de cuerpos fructíferos y de las características macroscópicas con la ayuda de la clave de identificación según Reinchenbach (Reinchenbach, H. 1990). Se tomaron muestras de los cuerpos fructíferos en el caso de las mixobacterias y de las zonas donde se presentaba la presunta degradación de la celulosa del papel filtro en el caso de las citofagas. Se sembraron hasta la obtención de colonias puras y aisladas.

Diagrama general.



4.1 Clasificación e Identificación.

La clasificación de las mixobacterias se basa principalmente en criterios morfológicos debido a que la información fisiológica está restringida a muy pocas cepas de mixobacterias. Por esta razón, para una clasificación inicial se evaluaron las características generales de los cuerpos fructíferos presentes color, tamaño y forma.

Las citofagas se identificaron según "The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology".

Una vez aisladas se evaluó su morfología macroscópica y microscópica con ayuda de los siguientes criterios:

a) Morfología colonial.

Una vez aislada la muestra se sembró en placa de Agar McConkey para estar seguros de que eran bacilos Gram negativos y se incubaron durante 24hrs a 37°C, para posteriormente determinar la morfología colonial en medio selectivo para mixobacterias y citofagas.

Para determinar la morfología colonial se sembraron en medio agar CY (ver anexos); las características generales estudiadas fueron: forma de colonia, del borde, aspecto, color y consistencia.

Se incubaron en las placas del medio CY durante 24hrs a 37°C, para su conservación se resembraron (2 veces por semana) y posteriormente se mantuvieron en refrigeración.

b) Características microscópicas.

Con la finalidad de asegurar la pureza de las colonias aisladas y comprobar sus características microscópicas como mixobacterias se realizó una tinción de Gram. Las características micromorfológicas estudiadas fueron: forma de célula vegetativa y reacción a la tinción de Gram.

c) Identificación con ayuda de pruebas bioquímicas.

Se efectuaron distintas pruebas bioquímicas para caracterizar a las cepas aisladas; las pruebas bioquímicas se enfocaron en obtener información para bacilos Gram negativos como el uso de fuentes de carbono, degradación de polisacáridos, tipo de respiración y metabolismo, además de pruebas de resistencia a antibióticos.

Las pruebas bioquímicas realizadas principalmente son las sugeridas para los bacilos Gram negativos por McCurdy (1994) y el Manual Bergey's: fuente de carbono (manitol, sacarosa, citrato, glucosa, lactosa y galactosa), catalasa, hemólisis, producción de H₂S, indol, LIA, urea, fenilalanina y reducción de nitratos y degradación de macromoléculas (agar, almidón, gelatina y quitina) (ver anexos).

La resistencia a antibióticos se realizó con ayuda de antibiogramas (BioRad) para bacilos Gram negativos. Se observaron halos de inhibición producidos tras una incubación de 24h a 37°C en agar nutritivo, el cual fue inoculado a partir de muestras procedentes del medio CY por extensión en placa; los antibióticos utilizados fueron: amikacina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, dicloxacilina, enoxacina, eritromicina, gentamicina, netilmicina, penicilina y timetoprim-sulfametoxazol.

4.2. Determinación de condiciones de crecimiento *in vitro* en medio selectivo CY.

Para determinar las condiciones en las que presentan un mejor crecimiento en el cultivo *in vitro*, se estudiaron dos variables: temperatura y pH. Las temperaturas evaluadas fueron (22, 27 y 32°C) y los siguientes pH's (6, 6.5, 7 y 7.5). Las cepas utilizadas se incubaron en matraces Erlenmeyer con 25mL de medio selectivo para mixobacterias y citofagas (CY, ver anexos); el inóculo inicial para cada uno de los matraces fue con una concentración aproximada de 1×10^5 células/mL obtenidas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, cuantificadas indirectamente por densidad óptica a $\lambda=660$ nm en espectrofotómetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III UV/visible.

Se tomaron muestras cada dos horas a partir de las 12 horas de incubación para realizar curvas de crecimiento; se midió la masa celular por densidad óptica, a una $\lambda=660$ nm, en un espectrofotómetro.

4.3. Determinación de condiciones de crecimiento utilizando a la pectina como fuente de carbono.

Se sembraron las cepas en matraces Erlenmeyer con 25mL del medio líquido con pectina (Sigma) al 1% (p/v) (ver anexos). También se estudiaron dos variables: temperatura y pH, tomando como base las condiciones determinadas anteriormente (4.2). Los pH's evaluados fueron 5 y 7, ajustando el pH del medio con buffer de acetatos pH 5 100mM y buffer de fosfatos pH 7 100mM (ver anexos), respectivamente. Las temperaturas evaluadas fueron 32 y 37°C.

Se inoculó con 1×10^5 células/mL obtenido de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, se incubaron a las diferentes temperaturas a evaluar con agitación constante de 200rpm en una incubadora con agitación orbital; se midió el incremento de la masa celular por espectrofotometría a $\lambda=660$ nm cada 24 horas.

4.4 Comparación del crecimiento y producción de azúcares reductores, variando la composición del medio y la cantidad de inóculo inicial.

Se evaluaron dos diferentes composiciones del medio y diferente concentración de inóculo inicial con el fin de observar la repercusión en el crecimiento y en la producción de azúcares reductores para, posteriormente, evaluar la actividad enzimática.

Primero se incubaron las seis cepas en el medio de pectina 1% (p/v) con un inóculo de 1×10^5 células/mL.

Posteriormente se incubaron en el medio de pectina 1% (p/v) adicionado con el promotor de crecimiento, extracto de levadura (YE) 0.01%. Se inoculó con 1×10^5 células/mL.

Por último, se incubaron en el medio líquido de pectina 1% (p/v) y se inoculó el microorganismo con el doble de inóculo inicial (2×10^5 células/mL).

En cada caso se utilizaron 25mL del medio respectivamente en matraces Erlenmeyer, se incubaron a 37°C con agitación constante 200rpm. Los inóculos iniciales se obtuvieron de un cultivo en su fase exponencial.

a) Crecimiento.

Se realizaron curvas de crecimiento midiendo la masa celular por espectrofotometría a $\lambda=660$ nm cada 24 horas para todos los casos.

b) Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

De los cultivos descritos previamente se tomaron alícuotas de 2mL, cada 24 horas, se centrifugaron a 7000rpm; del sobrenadante se tomó 0.1mL, se agregaron 0.9mL de H₂O destilada y se siguió el método DNS de cuantificación de azúcares reductores (ver anexos).

4.5 Cuantificación de la actividad enzimática exopectinolítica.

Para determinar la actividad exopectinolítica se llevó a cabo la cuantificación de azúcares reductores por el método DNS. Se incubaron las cepas en el medio pectina 1% (p/v) en matraces Erlenmeyer con 25mL del medio y con agitación constante de 200rpm y las condiciones determinadas previamente de pH, temperatura, composición del medio y cantidad de inóculo. A partir de las 24 horas de incubación se tomaron alícuotas de 2mL en tubos de ensaye estériles y se centrifugaron a 7000rpm. Del sobrenadante se tomó 0.1mL y se agregó a una mezcla que contenía 0.5mL del medio líquido de pectina (Sigma) 1% (p/v) y 0.4mL de buffer de fosfatos 100mM pH=7; la mezcla de reacción se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 hora. Al término se sigue el mismo procedimiento de cuantificación de azúcares reductores por el método DNS (ver anexos). Una unidad (U) de actividad pectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1µmol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de reacción.

4.6 Evaluación de la actividad enzimática endopectinolítica.

La actividad endopectinolítica se evaluó mediante la disminución de viscosidad del medio de pectina (Sigma) al 2.5% (p/v). Se inoculó el microorganismo (2×10^5 células/mL), se incubaron a 37°C con agitación constante a 200rpm. Se midió la reducción de la

viscosidad del medio con un viscosímetro Brookfield Engineering Laboratorios Inc. cada 24 horas durante 5 días; utilizando un vástago No. 1 a una velocidad de 6 rpm.

Cada cepa se inoculó por duplicado en frascos de plástico que contenían 500mL del medio con pectina al 2.5% y cicloheximida (200µg/mL) para evitar contaminación por hongos.

Los porcentajes de disminución de la viscosidad se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{Vb - Vm}{Vb} * 100 = \% \text{ de disminución de Viscosidad Relativa}$$

Donde Vb: es la viscosidad del blanco y Vm es la viscosidad de la muestra problema. La muestra blanco consistió en una solución de pectina al 2.5% (p/v).

4.7 Evaluación cualitativa de la actividad pectinolítica mediante el método en placa con colorante Rojo de Rutenio.

La actividad pectinolítica de cada cepa fue determinada de manera cualitativa en dos diferentes placas:

- a) Placas con pectina: se sembraron las cepas por triplicado en placas con pectina (0.5% p/v) y 1% agar; a un pH 7 y fueron incubadas a 37°C por 24 y 48 horas. Al término de las 48 horas fueron teñidas con una solución del colorante rojo de rutenio (0.05% p/v).
- b) Placas con ácido péctico: se sembraron las cepas por triplicado en placas con ácido péctico (0.5% p/v) y 1% agarosa; a un pH 7 y fueron incubadas a 37°C por 24 y 48 horas. Al término de las 48 horas fueron teñidas con una solución del colorante rojo de rutenio (0.05% p/v).

Se inocularon las cajas con una alícuota de 500µL de un cultivo en su fase exponencial.

4.8 Cuantificación de proteína.

El procedimiento de cuantificación de proteína está basado en el método diseñado por Bradford (1976), el cual es un procedimiento para determinar la concentración de proteína soluble. Implica la adición de un colorante ácido a la solución de proteína, y se mide su absorbancia a $\lambda=595\text{nm}$. Se compara con una curva estándar que proporciona la concentración relativa de proteína. El colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Ensayo de Bio-Rad, reactivo de Bradford), cambia de color en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. La absorbancia máxima para una solución ácida del azul brillante de Coomassie varía desde $\lambda=465\text{nm}$ a $\lambda=595\text{nm}$ cuando se une a la proteína.

La cantidad de proteína se determinó utilizando una curva estándar de albúmina bovina sérica con concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

Se determinó el contenido de proteína en 200 μL del sobrenadante obtenido del crecimiento en los ensayos previos (4.5), más 600 μL de Tris 1M pH 8 y 200 μL del reactivo de Bradford; se dejaron las muestras durante 15 min para que se lleve a cabo la reacción y se midió por espectrofotometría a $\lambda=595\text{nm}$.

Sustratos complejos.

El uso de estos sustratos permite observar de una manera más realista el comportamiento de las bacterias en un ambiente más parecido del cual fueron aisladas.

Los sustratos complejos, piel de naranja y el bagazo de manzana, fueron recolectados de comerciantes de jugos; se revisó que no estuvieran en estado de descomposición, sin hongos y sin gusanos.

4.9 Acondicionamiento de los sustratos complejos.

a) Medio A.

Una vez escogidas las naranjas se separó manualmente el endocarpio o bagazo y la pulpa restante del albedo. La piel de naranja fue secada en estufa a 80°C por 24 horas.

Posteriormente fue triturada hasta obtener un polvo. Se prepararon los matraces con 25mL de medio mineral con el polvo de la piel de naranja al 1%, (Medio A) se dejaron hidratar por 48 horas antes de ser inoculados con el microorganismo. La composición promedio de la piel de la naranja se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Composición promedio de la piel de naranja.

Componentes principales (%)	Materia seca	90.0
	Proteína	6.0
	Carbohidratos	62.7
	Grasas	3.4
	Fibra	13.0
	Cenizas	6.9
Minerales (%)	Calcio	2.0
	Magnesio	0.16
	Fósforo	0.10
	Potasio	0.62
	Azufre	0.06

b) Medio B.

El bagazo de manzana se secó en estufa a 50°C por 24 horas. Posteriormente se molió hasta obtener un polvo. De la misma manera que con la naranja se prepararon los matraces con 25mL de medio mineral con el polvo de la manzana al 1% y se dejaron hidratar 48 horas antes de ser inoculados con las diferentes cepas.

Debido a que no solo se utilizó la piel de la manzana sino además residuos de la pulpa la composición promedio es la siguiente:

Tabla 2. Composición promedio del bagazo de manzana.

Componentes principales (%)	Carbohidratos	10.5
	Fibra	2.3
	Proteínas	0.3
	Grasa	0.4
	Cenizas	0.2

4.10 Evaluación del crecimiento en sustratos complejos.

El crecimiento se evaluó en matraces Erlenmeyer con 25mL de los medios A o B; se inoculó el microorganismo con 2×10^5 células/mL y se incubaron a 37°C con agitación constante de 200rpm. Se midió el crecimiento por espectrofotometría a $\lambda=660\text{nm}$ para medir la masa celular a partir de las 24 horas.

4.11 Cuantificación de la actividad exopectinolítica.

Se midió la actividad enzimática de dos maneras diferentes, primeramente se creció el microorganismo en los sustratos esperando que produjera las enzimas y se cuantificó la actividad enzimática exopectinolítica realizando el procedimiento descrito anteriormente (ver método 4.5).

La segunda evaluación de la actividad partió igualmente del crecimiento de las cepas en el medio con el sustrato, se tomaron alícuotas de 2mL, en tubos de ensaye estériles y se centrifugaron a 7000rpm. Del sobrenadante se tomó 0.1mL y se agregó a una mezcla que contenía 0.5mL de una solución del sustrato correspondiente al 1% (p/v) más 0.4mL de buffer de fosfatos 100mM pH=7; la mezcla de reacción se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 hora. Al término del tiempo se sigue el mismo procedimiento de cuantificación de azúcares reductores por el método DNS (ver anexos).

4.12 Cuantificación de proteína.

Se llevó a cabo la cuantificación de la proteína de las cepas incubadas en el medio con los sustratos complejos por el método de Bradford descrito anteriormente (4.8).

4.13 Evaluación de la actividad endopectinolítica en sustratos complejos.

Empleando un viscosímetro de Brookfield Engineering Laboratorios Inc., con un vástago No. 1 a una velocidad de 12rpm, se determinó la viscosidad de una suspensión del sustrato en medio mineral, utilizándolo como blanco.

Las diferentes cepas se inocularon por duplicado en frascos de plástico que contenían 500mL de una solución del sustrato 5% y cicloheximida (200µg/mL) para evitar contaminación por hongos. Posteriormente se incubaron a 37°C con agitación constante a 200rpm. Cada 24 horas se realizó la medición de la viscosidad.

Los porcentajes de disminución de viscosidad se calcularon con la misma fórmula descrita en el ensayo 4.6.

4.14 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Las proteínas se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) según Laemmli (1970). El gel separador contenía acrilamida y bis-acrilamida (30:0.8), (composición de los geles de poliacrilamida, ver anexos). Las muestras utilizadas fueron concentradas y resuspendidas en el buffer de carga 1x sin colorante (ver anexos) y se calentaron a ebullición por 5 min. Se centrifugaron las muestras a 4°C a 10,000rpm en microcentrífuga, Centrifuge Eppendorf S415R, se tomaron 10µL del sobrenadante y se adicionaron 10µL del buffer de carga 2X con el colorante azul de bromofenol (ver anexos). Las condiciones de corrida de la electroforesis fueron a 75 voltios a través del gel concentrador y a 150 voltios una vez que las muestras pasaron al gel de separación.

Una vez realizada la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución que contiene Azul de Coomassie R-250 al 0.125% durante 1 hora y después se destiñeron con una solución de ácido acético 7% y metanol al 40% (ver anexos).

Debido a que la concentración de la proteína era muy baja y las bandas no se veían con la claridad suficiente, fue necesario teñir los geles con una solución de nitrato de plata (0.1% p/v).

Para determinar el peso molecular de las proteínas, éstas se compararon con marcadores de pesos moleculares (Sigma) de amplio rango, que abarcaba de 14kDa a 66kDa, el cual se incluyó en los geles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Identificación y clasificación del microorganismo.

La identificación de las cepas aisladas se basó en las características presentadas desde su aparición en las Cajas Petri con sílica gel, como la formación de cuerpos fructíferos o los lugares donde la celulosa había sido degradada. Se tomaron en cuenta las características macroscópicas y microscópicas y se siguieron los criterios morfológicos de Reinchbach (1990) para poder identificar el género al que pertenecían las cepas. De las seis cepas seleccionadas 2 provenían de la degradación del papel filtro sin formación de cuerpos fructíferos y 4 con cuerpo fructífero y degradación del papel.

En la Tabla 3 se presentan las características macroscópicas presentadas en las muestras de suelo para su aislamiento de las mixobacterias y citofagas, la formación de cuerpos fructíferos, color, forma y deslizamiento.

Tabla 3. Características Macroscópicas de mixobacterias y citofagas.

Cepa	Cuerpo fructífero	Color	Forma	Deslizamiento	Mixobacteria/ Citofaga
M1	Si	Café	Esférico	Sí	Mixobacteria
M2	Si	Rosa	Esférico	Sí	Mixobacteria
M3	Si	Blanco opaco	Esférico	Sí	Mixobacteria
M4	Si	Naranja	Esférico	Si	Mixobacteria
C1	No	Rosa-naranja	Prolongaciones	Sí	Citofaga
C2	No	amarillo	Prolongaciones	Sí	Citofaga

a) Morfología colonial.

La tabla 4 muestra las características de las colonias puras de mixobacterias y citofagas en el agar CY.

Tabla 4. Características coloniales de mixobacterias y citofagas.

Cepa	Forma	Tamaño	Borde	Elevación	Textura	Color
M1	Circular	2-3mm	Entero	Convexa	Butirosa	Blanquecino
M2	Circular	2-3mm	Ondulado	Convexa	Butirosa	Blanquecino
M3	Circular	2-3mm	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
M4	Circular	2-3mm	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
C1	Circular	2-3mm	Prolongaciones	Convexa	Viscosa	Amarillo
C2	Circular	2-3mm	Prolongaciones	Convexa	Viscosa	Amarillo

b) Características microscópicas.

La evaluación de las características microscópicas se realizó por medio de la tinción de Gram, las mixobacterias y citofagas se presentaron como bacilos largos Gram negativos.

c) Pruebas bioquímicas y sensibilidad a antibióticos.

La tabla 5 muestra los resultados de las seis cepas en las pruebas bioquímicas realizadas así como la sensibilidad a antibióticos.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas.

Prueba bioquímica	Cepas					
	M1	M2	M3	M4	C1	C2
Hemólisis	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-
OF	O	O	O	O	O	O
Catalasa	+	+	+	+	+	+
LIA	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Urea	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+
Fuente de Carbono						
Manitol	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas	+Gas
Degradación de:						
Gelatina	-	-	-	-	-	-
Agar	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-
Quitina	-	-	-	-	-	-
Pectina	+	+	+	+	+	+
Sensibilidad a:						
Amikacina AK	+	+	+	+	+	+
Ampicilina AM	+	-	-	+	-	+
Carbenciclina CB	+	-	-	+	+	-
Cefalotina CF	+	-	-	+	+	-
Cefotaxima CFX	+	-	-	+	+	-
Ciprofloxacina CPF	+	+	+	+	+	+
Cloranfenicol CL	+	-	-	+	+	+
Gentamicina GE	+	+	+	+	+	+
Netilmicina NET	+	+	+	+	+	+
Nitrofurantoína NF	+	-	-	+	+	-
Norfloxacina NOF	+	+	+	+	+	+
Sulfametoxazol/ Trimetroprim SXT	+	-	-	+	-	+
Ceftriaxona CRO	+	+	+	+	+	+
Pefloxacina PEF	+	+	+	+	+	+

Notas: (+) en la prueba de sensibilidad a antibióticos significa inhibición del crecimiento.

De acuerdo a los resultados anteriores se sugiere la siguiente clasificación para las seis cepas:

Las cepas M1 y M4 son bacilos cilíndricos Gram negativo de 0.8 a 1.6 µm de largo y 0.3 a 0.5µm de ancho, formaron cuerpos fructíferos de forma globular de textura cremosa de color naranja, en su interior las células se diferencian en esporas (mixosporas), esféricas inmóviles. Al tomar mixoesporas y crecerlas en un medio bajo en nutrientes formaron una biopelícula la cual se observó colocando un portaobjetos dentro del cultivo; al término de

la incubación se tiñó y se pudo apreciar con claridad dicha formación. Estas bacterias también respondieron a la iluminación sintetizando carotenoides (color naranja, café), las diferencias en el color del cuerpo fructífero se deben a la diferente exposición de la luz durante su crecimiento, estas características y los resultados de las pruebas bioquímicas sugieren que estas cepas sean ***Myxococcus xanthus***.

Las cepas M2 y M3 son bacilos cilíndricos Gram negativo de 0.8 a 1.4 μm de largo y 0.4 a 0.5 μm de ancho, formaron cuerpos fructíferos de forma globular con una constricción en la base o con un pedicelo muy corto de textura cremosa de color rosado, en su interior las células se diferencian en esporas (mixosporas), ovoides inmóviles. Al tomar mixoesporas y ponerlas a crecer en un medio bajo en nutrientes formaron una biopelícula la cual se observó colocando un portaobjetos dentro del cultivo; al término de la incubación se tiñó y se pudo apreciar con claridad dicha formación. Estas bacterias también respondieron a la iluminación sintetizando carotenoides (color rosado, blanco opaco) de la misma forma las diferencias en los colores del cuerpo fructífero se pueden deber al tiempo de la exposición a la luz; estos resultados además de las pruebas bioquímicas y la sensibilidad a antibióticos sugieren presuntivamente que estas cepas sean ***Myxococcus fulvus***.

Las colonias aisladas que no formaron cuerpo fructífero (cepas C1 y C2) pertenecen a las bacterias deslizantes, pertenecientes al orden de las *Cytophagales*, bacilos largos filamentosos Gram negativos de 2 a 3 μm de largo, presencia de pigmento amarillo (carotenoides) y prolongaciones de las colonias sobre el agar, además se observó la degradación de las fibras de celulosa del papel filtro y al observarse al microscopio estereoscópico se observó su crecimiento sobre las fibras de papel. Las colonias aisladas denominadas C1 y C2 fueron identificadas presuntivamente como: **Orden; *Cytophagales*, Familia *Cystophagaceae*, Género: *Citofaga***



Figura 8. Cuerpo fructífero sobre fibras de celulosa perteneciente a *Myxococcus xanthus*



Figura 9. Cuerpo fructífero sobre fibras de celulosa perteneciente a *Myxococcus xanthus*.



Figura 10. Cuerpo fructífero sobre fibras de celulosa perteneciente a *Myxococcus fulvus*.



Figura 11. Bacilos largos Gram negativos en cadenas característico del género *Cytophagaceae*.

5.2 Determinación de condiciones de crecimiento *in vitro*.

Para establecer las condiciones donde se obtuvieran mejores condiciones de crecimiento *in vitro*, se evaluaron diferentes temperaturas (22, 27 y 32°C) y pH's (6, 6.5, 7 y 7.5).

En la figura 12 se muestran las curvas de crecimiento de las seis cepas a temperatura de 22°C en los diferentes pH's. Se puede observar que las seis cepas crecieron mejor a un pH de 7. Las cepas no presentaron mucho crecimiento dentro de las primeras 12 horas de incubación; después de las 16 horas de incubación es cuando se observó una mayor diferencia en el crecimiento, después de las 20 horas se comenzó a observar su fase estacionaria del crecimiento. Debido a que presentaron un comportamiento muy variable esta temperatura de incubación no es adecuada para un buen crecimiento.

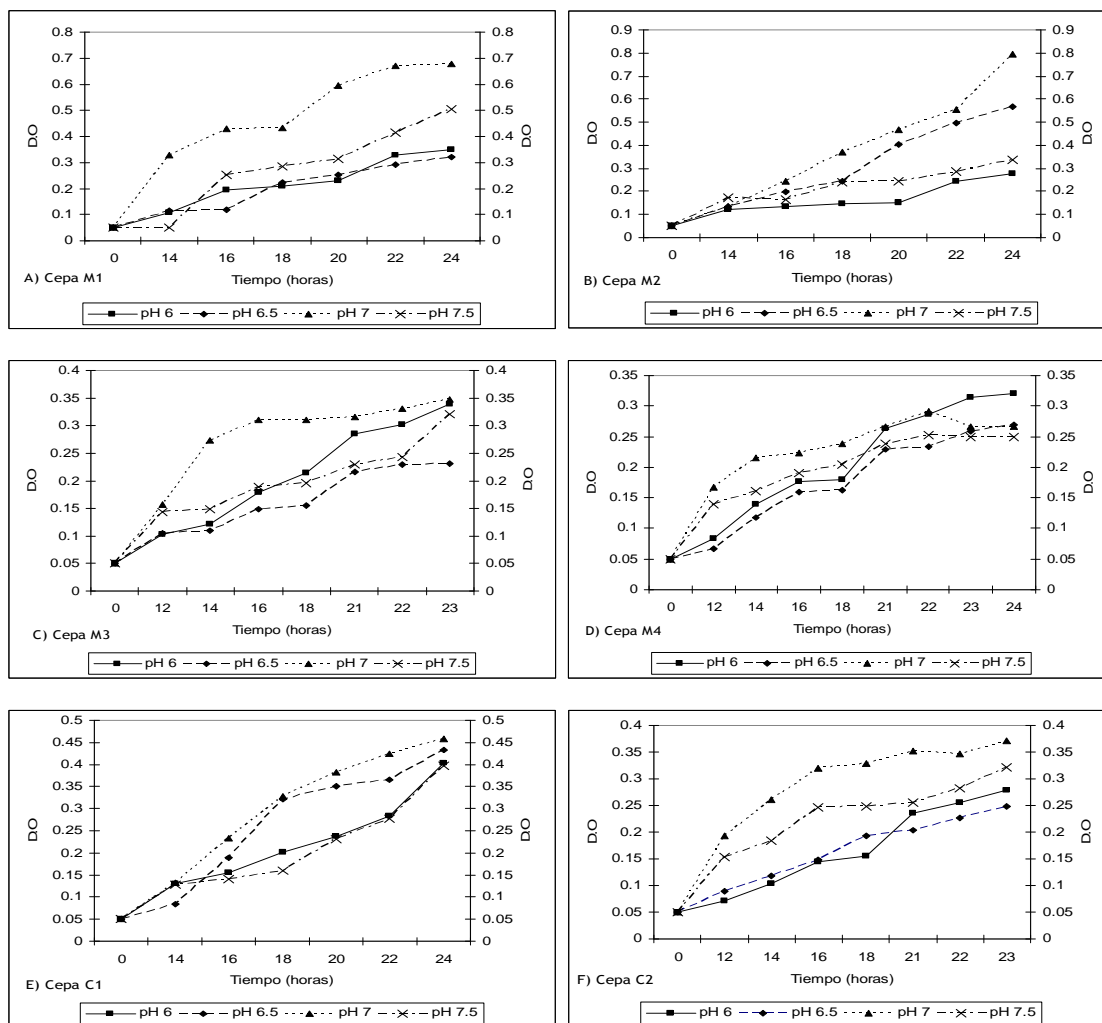


Figura 12. Curvas de crecimiento a 22°C a los diferentes pH's de las seis cepas evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 13 se muestran las curvas de crecimiento a temperatura de 27°C en los diferentes pH's. Se puede observar que a esta temperatura las seis cepas crecieron mejor en el pH de 6 y 6.5; aunque no se puede asegurar que a esta temperatura estos pH's sean los óptimos para su crecimiento. De manera general el aumento de temperatura incrementó el crecimiento de todas las cepas, ya que se observa que dentro de las primeras 12 horas de incubación se obtuvo un mejor crecimiento.

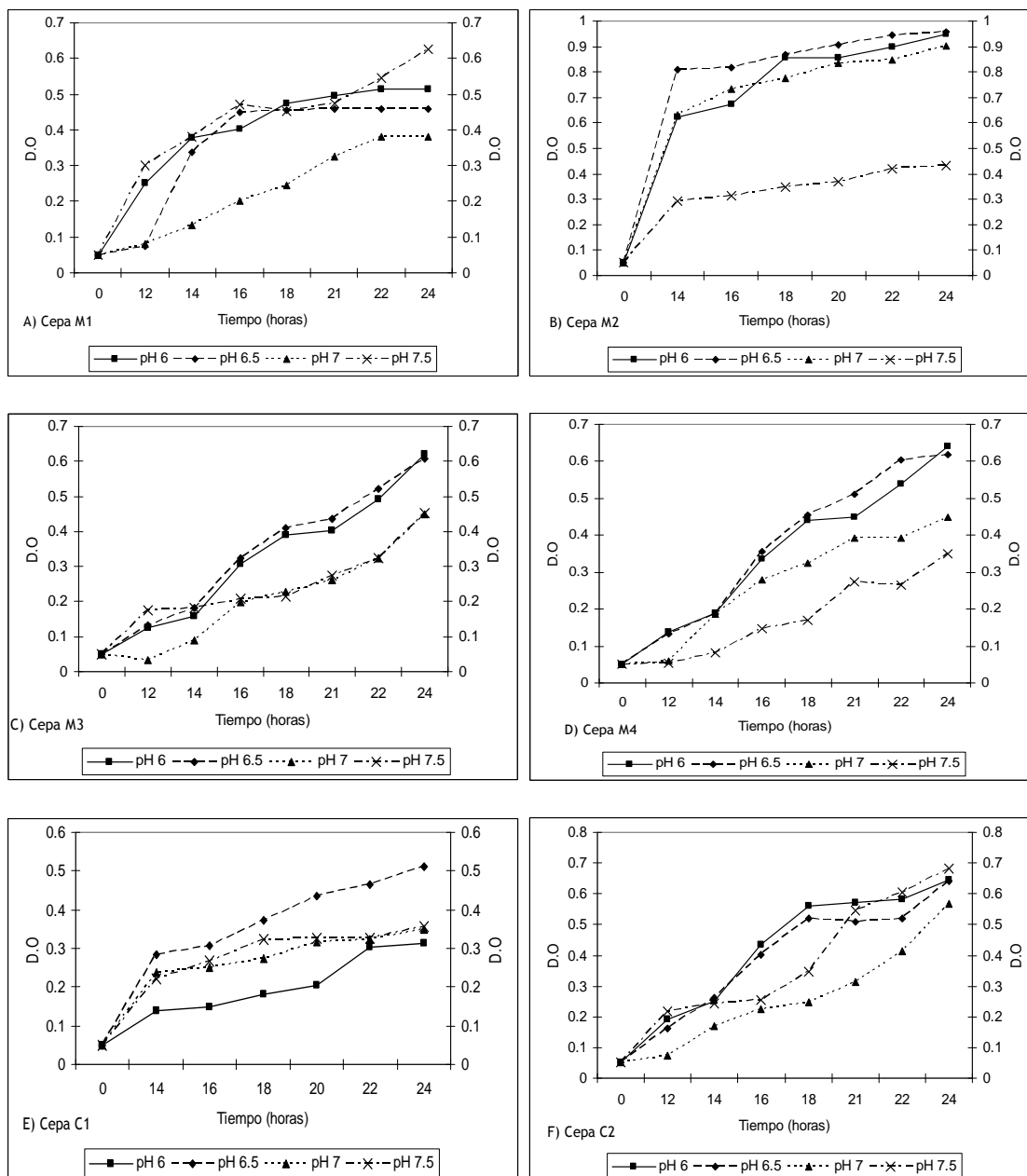


Figura 13. Curvas de crecimiento a 27°C en los diferentes pH's de las seis cepas evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A 32°C las seis cepas presentaron un mejor crecimiento con respecto a las otras dos temperaturas evaluadas, debido a que el crecimiento dentro de las primeras 14 horas fue mayor, se decidió evaluar su crecimiento dentro de las primeras 12 horas de incubación para poder observar su fase exponencial y logarítmica del crecimiento.

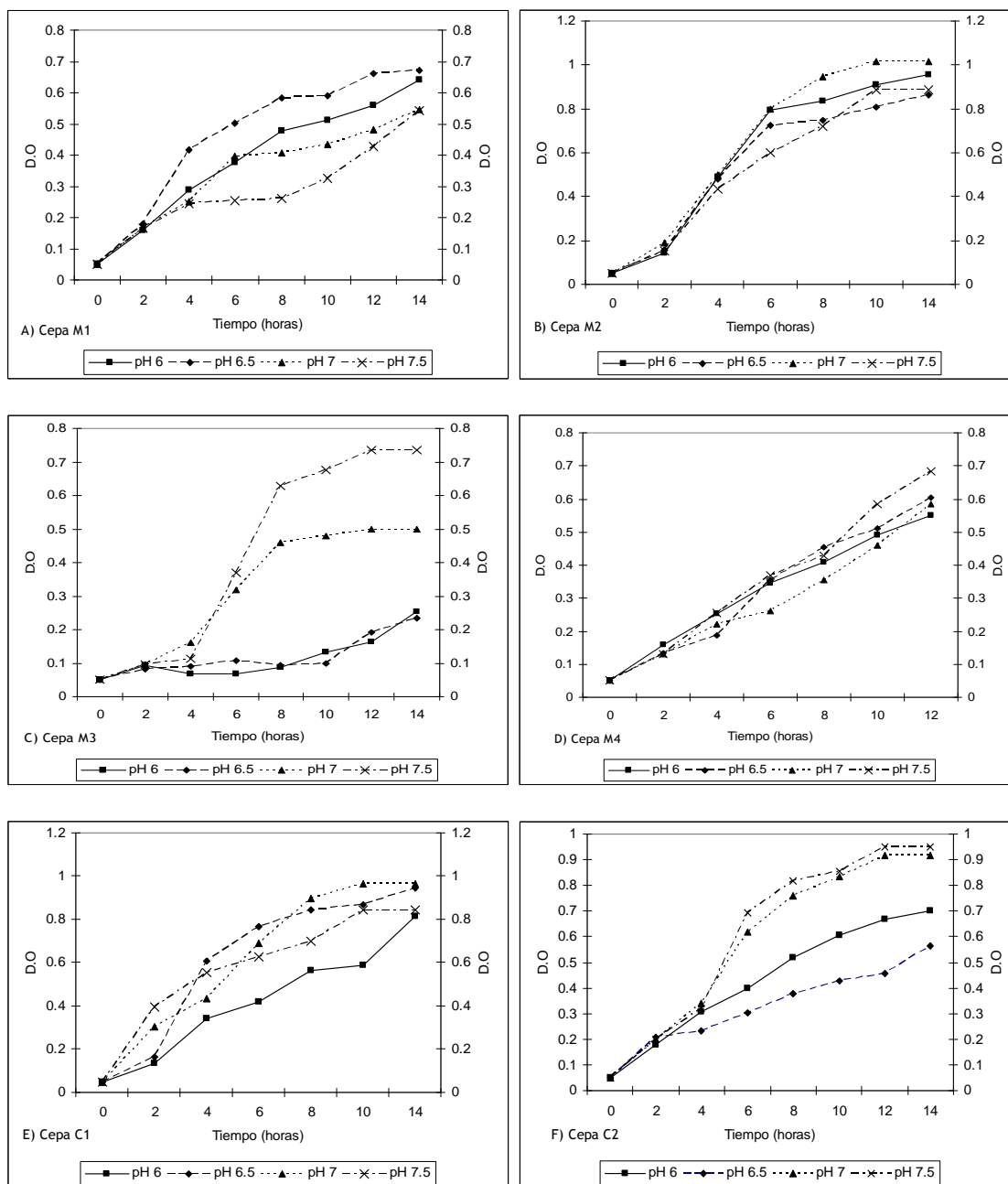


Figura 14. Curvas de crecimiento de las seis cepas a 32°C en diferentes pH's.

La figura 14a muestra la curva de crecimiento de la cepa M1 a 32°C; se observó que presentó un mayor crecimiento en pH 6.5, sin embargo, en ninguno de los cuatro pH's se llega a observar la aparición de la fase estacionaria; en el pH 7.5 se observó el menor crecimiento.

En la figura 14b se muestra la curva de crecimiento de la cepa M2; se observa que dentro de las primeras 4 horas de incubación el crecimiento en los 4 pH's fue muy parecido; después de las 8 horas de incubación el crecimiento en pH 7 fue un poco mayor con respecto a los demás, para los cuatro pH el comportamiento fue muy similar ya que después de las 10 horas de incubación se llegó a la fase estacionaria del crecimiento en cada uno.

En la figura 14c se muestra la curva de crecimiento de la cepa M3, se observó que a pH 6 y 6.5 el crecimiento fue muy bajo, a pH 7.5 presentó un notable mejor crecimiento con respecto a los demás pH's, aunque el comportamiento y las fases de su crecimiento aparecen de manera muy similar al pH 7 aunque el crecimiento estuvo por debajo del observado en pH 7.5.

La figura 14d muestra la curva de crecimiento de la cepa M4, donde presentó el mismo comportamiento en los cuatro pH's evaluados, en ninguno de los pH's se observan las diferentes fases del crecimiento ya que durante las 12 horas de incubación el crecimiento aumentó. Solamente después de las 10 horas en el pH 7.5 se presentó un crecimiento ligeramente mayor que en los demás pH's.

La figura 14e muestra la curva de crecimiento de la cepa C1; en ésta se pudo observar que a pH de 6.5 el crecimiento fue más rápido, sin embargo, se mantuvo constante el crecimiento después de las 6 horas de incubación, es decir, la fase estacionaria llegó rápidamente. En pH 7 se pudo observar la fase logarítmica, la fase exponencial y ya cerca de las 10 horas la aparición de la fase estacionaria y en general presentó un mayor crecimiento. De la misma manera en pH 7.5 se observan todas las fases de su crecimiento, aunque es relativamente más bajo su crecimiento con respecto al observado en pH 7.

La figura 14f muestra la curva de crecimiento de la cepa C2; donde si se pudo observar una diferencia en el crecimiento entre los diferentes pH's. Dentro de las primeras 4 horas de incubación a los cuatro pH's presentaron un crecimiento muy parecido. Los pH's 7 y 7.5 presentaron el crecimiento más elevado siendo el pH 7.5 un poco mayor que el pH 7, se pudo observar una fase logarítmica un poco larga y cerca de las 12 horas de incubación el comienzo de la fase estacionaria.

De manera general se puede decir que al existir un incremento en la temperatura de incubación el crecimiento se vio favorecido, esto se puede ver en que la masa celular después de las 12 horas de incubación a 22°C y a 27°C no aumentó mucho con respecto a la cantidad de inóculo inicial; sin embargo, dentro de las primeras 12 horas de incubación a 32°C se puede observar una clara diferencia en la cantidad de masa celular con respecto al inicial. La llegada a la fase estacionaria en las temperaturas más bajas se ve después de las 18 horas de incubación, en cambio, en 32°C se observa el inicio de esta fase poco después de las 12 horas de incubación.

Es importante resaltar que a 27°C las seis cepas presentaron un mejor crecimiento en pH 6 y 6.5, por lo cual se podría trabajar a esta temperatura con estos pH's para obtener mejores resultados. Sin embargo, como a 32°C y pH 7 fue donde se presentó el mejor crecimiento se decidió que las mejores condiciones para el crecimiento y cultivo *in vitro* para las seis cepas serían éstas.

Sin embargo, para poder realizar un mejor análisis y determinar las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de las mixobacterias y citofagas, se debería de estudiar el crecimiento un rango más amplio de temperatura y de pH.

5.3 Determinación de condiciones de crecimiento utilizando pectina como fuente de carbono.

Una vez determinadas las condiciones de crecimiento *in vitro* en medio selectivo, se evaluaron estas condiciones pero ahora utilizando a la pectina como única fuente de carbono. También se evaluó el crecimiento con otro pH (5) y otra temperatura (37°C) para poder comparar donde presentaban un mejor crecimiento. Se evaluó el pH 5 con el fin de determinar si al estar bajo condiciones de estrés las mixobacterias y citofagas son

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

capaces de llevar a cabo la producción de la enzima y con esto tener un mejor crecimiento. Se puede observar de manera general que bajo las condiciones determinadas previamente de cultivo *in vitro* las células no presentaron un buen crecimiento utilizando pectina como fuente única de carbono.

En figura 15 se muestran las curvas de crecimiento de las seis cepas en pectina. Se incubaron durante 72 horas, ya que el crecimiento es más lento que en el medio selectivo. Podría suponerse que el microorganismo se encuentra en estrés por lo que es más lento su desarrollo. De manera general el crecimiento se vio favorecido en pH 7 a 37°C. Se podría decir que las mixobacterias y citofagas en este estudio crecen mejor a pH 7 y temperatura de 37°C utilizando pectina como fuente de carbono; por lo que se podría esperar que en estas condiciones presenten una mejor actividad enzimática.

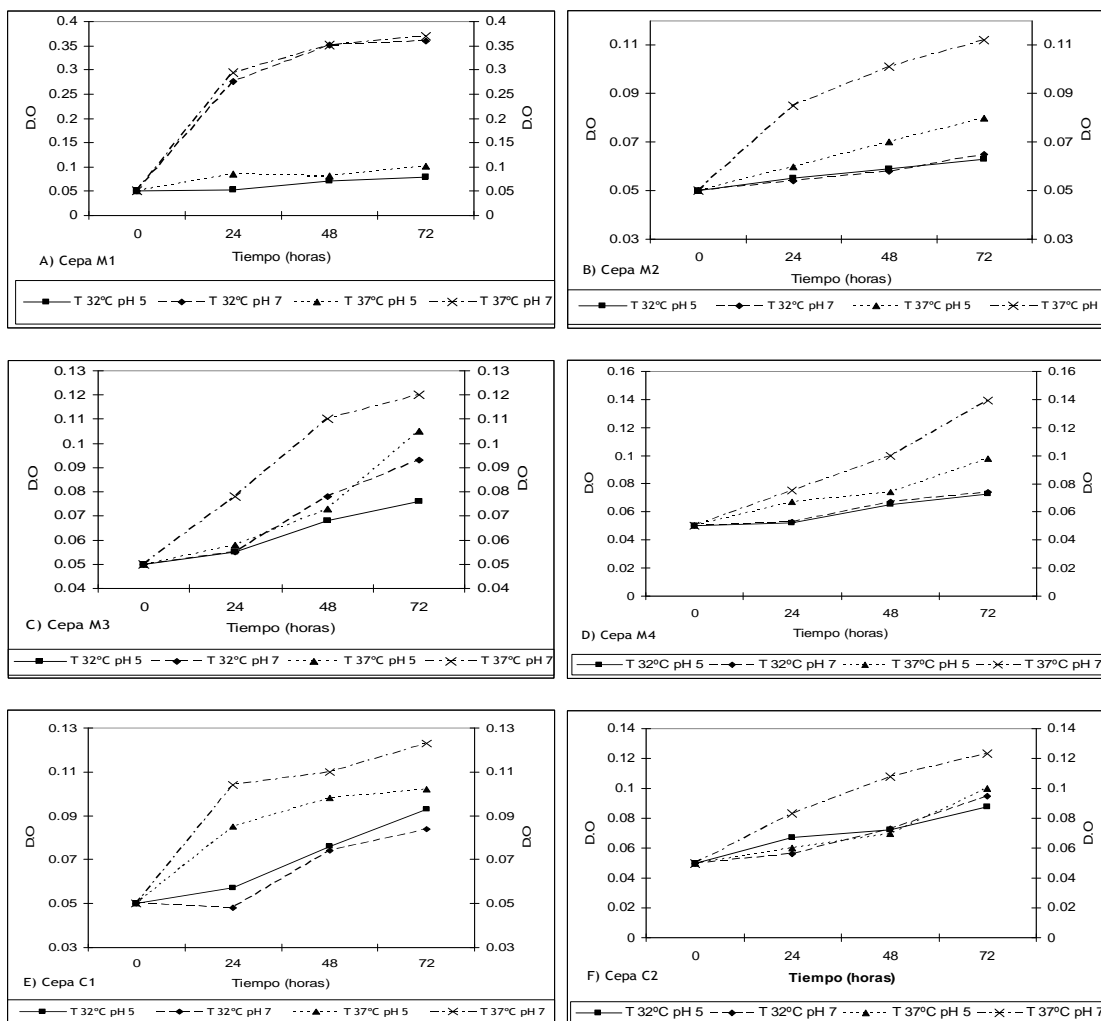


Figura 15. Curvas de crecimiento en pectina a 32 y 37°C y pH 5 y 7 de las seis diferentes cepas evaluadas.

5.4 Comparación del crecimiento y producción de azúcares reductores, variando la composición del medio y la cantidad de inóculo inicial.

Con las condiciones de pH y temperatura determinadas para el crecimiento en pectina se evaluó el crecimiento añadiendo al medio un promotor de crecimiento debido a que, como se observó, el crecimiento de las cepas al evaluar temperatura y pH utilizando pectina como fuente de carbono es más lento que el observado en medio selectivo CY. Sin embargo, también se evalúa la producción de azúcares reductores para observar si la producción de enzimas se ve favorecida. También se duplicó la concentración del inóculo inicial; anteriormente se había utilizado 1×10^5 células/mL y esta vez se utilizó 2×10^5 células/mL. La variación de todas estas condiciones tuvieron como finalidad el poder estandarizar las condiciones en las cuales se podría obtener una mejor actividad enzimática. La cuantificación de los azúcares reductores liberados en estos experimentos se reporta como la concentración de ácido galacturónico.

En la figura 16 se muestran las gráficas comparando el crecimiento en las diferentes condiciones evaluadas. La mayoría de las cepas presentaron un mejor crecimiento al utilizar un promotor de crecimiento, extracto de levadura (YE), comprándolo con el crecimiento con el medio sin el promotor; esto era de esperarse, ya que este compuesto forma parte de la composición del medio selectivo para mixobacterias y citofagas (CY), además de que proporciona fuente de nitrógeno para el desarrollo del microorganismo debido a que contiene vitaminas y aminoácidos, entre otros compuestos que favorecen el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, la producción de ácido galacturónico no se vio favorecida de la misma forma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

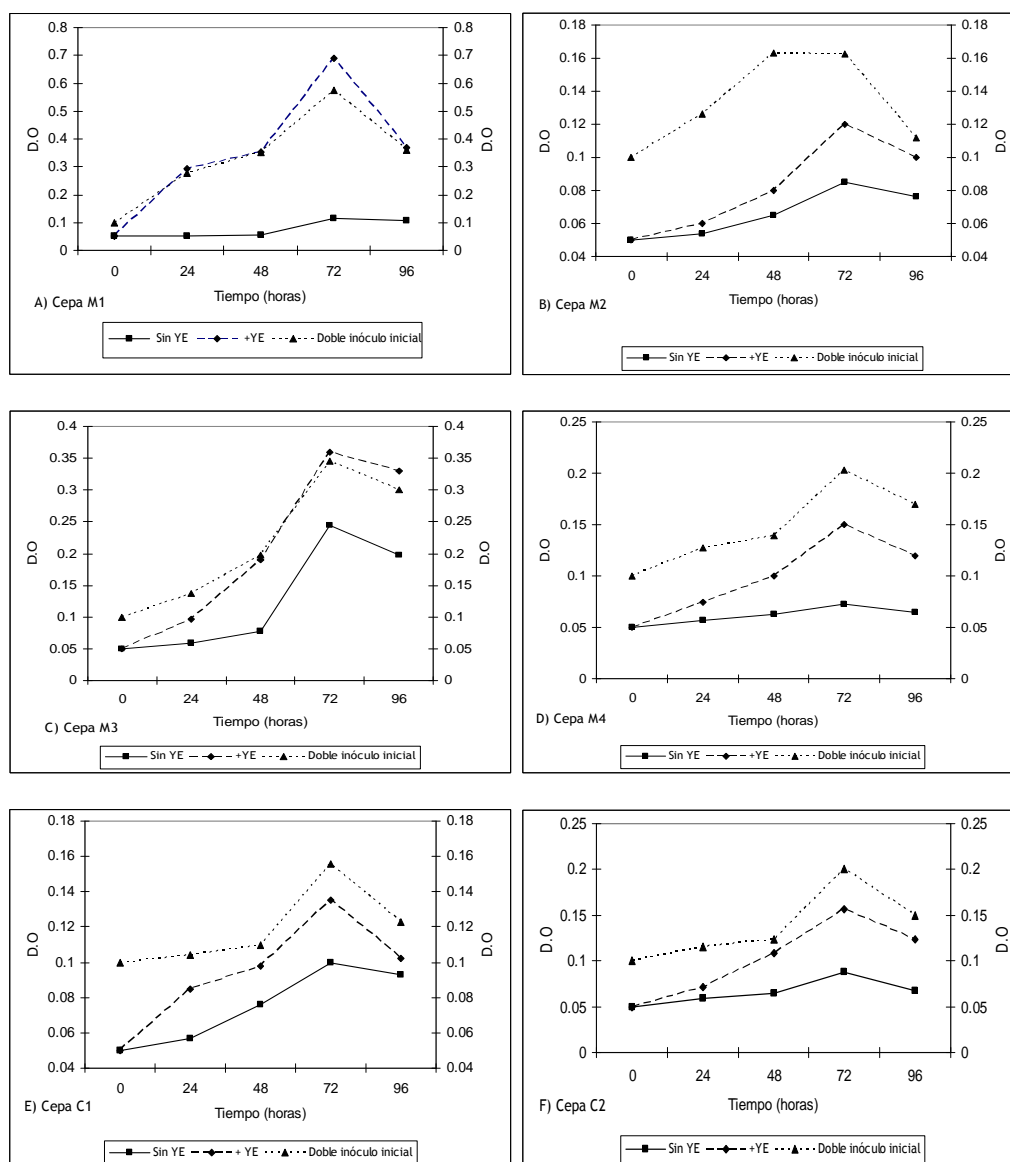
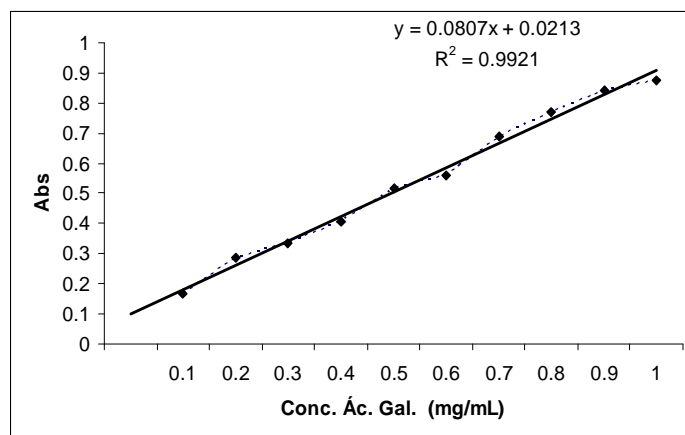


Figura 16. Curvas de crecimiento de las diferentes cepas en medio pectina 1% sin YE, medio pectina 1% +YE y con doble inóculo inicial a 37°C y pH7. YE extracto de levadura (promotor de crecimiento).

En las cepas C1, C2, M2 y M4 se observó que el crecimiento con el doble de inóculo inicial fue mayor que en las tres condiciones evaluadas, las cepas M1 y M3 presentaron mejor crecimiento el utilizar el promotor de crecimiento en el medio que en los demás experimentos.

Sin embargo, no se puede asegurar que al crecer más lleven a cabo una mayor producción de enzimas, ya que normalmente las mixobacterias y citofagas llevan a cabo dicha producción en condiciones de deficiencia de nutrientes; por lo que se cuantificó la producción de ácido galacturónico, por el método de DNS, ya que esto da una idea de la

actividad enzimática. En la gráfica 1 se muestra la curva patrón de ácido galacturónico; utilizando la ecuación de la recta se calculó la concentración de azúcares reductores presentes en el medio.



Gráfica 1. Curva patrón de ácido galacturónico (0.1 a 1mg/mL)

En la figura 17 se muestran las gráficas de producción de ácido galacturónico en las tres condiciones evaluadas.

En la figura 17a se muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa M1. Se observó que la más baja producción se llevó a cabo al adicionar el promotor de crecimiento, que cuando no se adicionó; la mayor producción de ácido galacturónico se llevó a cabo al utilizar el doble de inóculo.

La figura 17b muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa M2. Se pudo observar una gran diferencia en la producción de ácido galacturónico al utilizar el doble de inóculo que en el resto de los casos; la producción de ácido galacturónico al utilizar extracto de levadura y al no utilizarlo fue más baja y no existió gran diferencia en estos casos.

La figura 17c muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa M3. Esta cepa presentó mayor producción de ácido galacturónico al utilizar doble inóculo, ya que en las otras condiciones solo presentó producción de ácido galacturónico a las 72 horas de incubación, aunque si presentó crecimiento en los tres casos.

En la figura 17d se muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa M4. De la misma manera solo presentó producción de ácido galacturónico en el medio sin extracto de levadura y con 1×10^5 células/mL dentro de las primeras 48 horas de incubación; la mayor producción de ácido galacturónico se llevó a cabo al utilizar 2×10^5 células/mL.

La figura 17e muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa C1. Esta cepa no presentó mucha diferencia en su producción al utilizar extracto de levadura o al utilizar el doble de inóculo inicial, siendo un poco mayor en este último caso. Para esta cepa se podría decir que al utilizar un promotor de crecimiento la producción enzimática también ocurre eficientemente.

La figura 17f muestra la producción de ácido galacturónico de la cepa C2. Se observa que presentó una mayor producción al utilizar el doble de inóculo y presentó una producción muy baja al utilizar 1×10^5 células/mL tanto sin utilizar extracto de levadura en el medio como al utilizarlo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

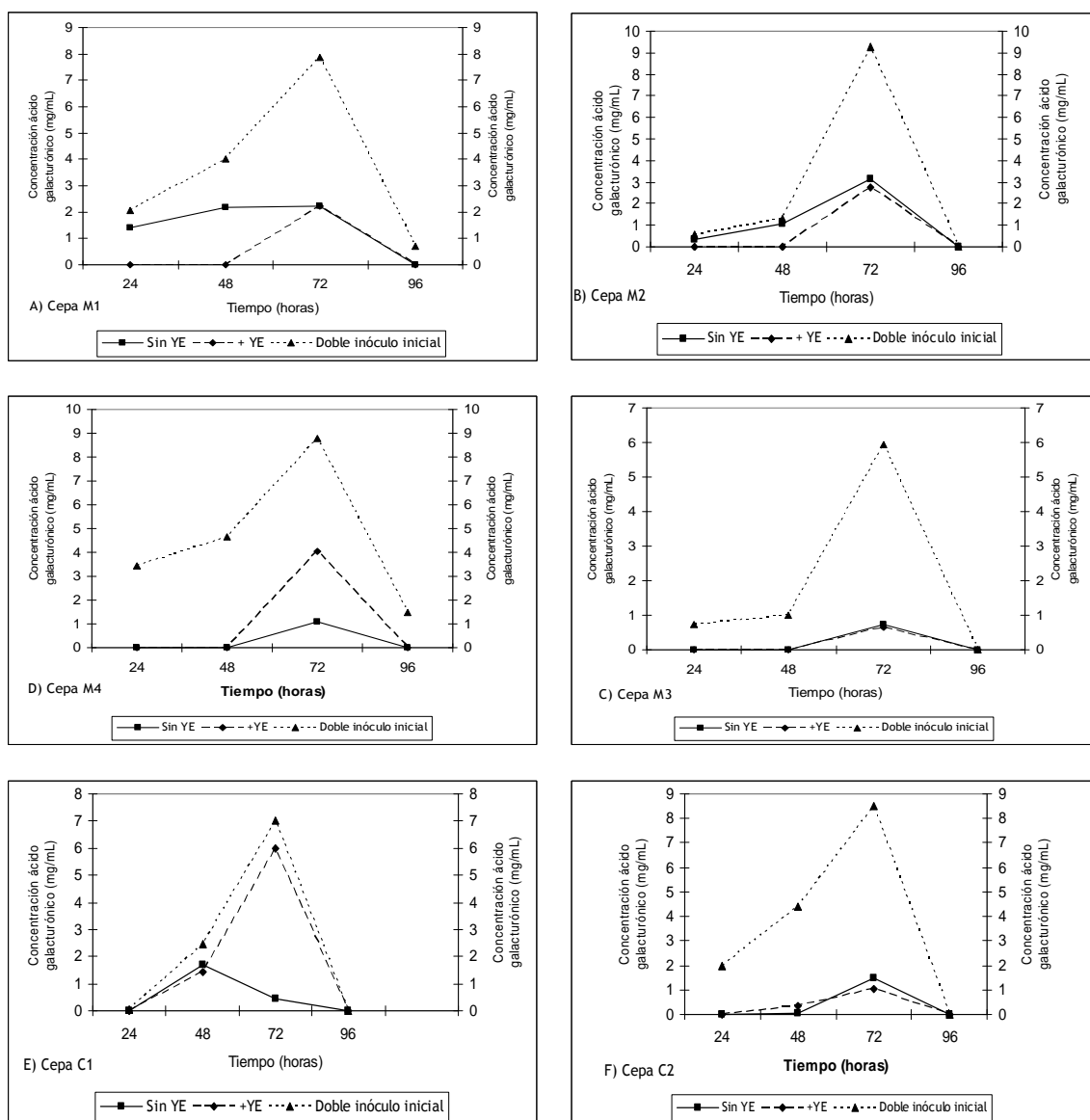


Figura 17. Comparación en la producción de ácido galacturónico en los diferentes medios; medio pectina 1% sin YE, medio pectina 1% +YE y al utilizar el doble inóculo inicial. A 37°C y pH 7. YE extracto de levadura (promotor de crecimiento).

De manera general se observa que al utilizar el doble inóculo (2×10^5 células/mL) se presentó una mayor producción de ácido galacturónico. Por esta razón era importante, además de comparar el crecimiento, cuantificar los azúcares reductores ya que nos sugiere que la secreción de las enzimas no la llevan a cabo de la misma forma al utilizar el promotor de crecimiento pues al contar con este en el medio se favorece el desarrollo pero no son las condiciones naturales en las cuales las mixobacterias y citofagas producen las enzimas. De esta manera se evaluó y cuantificó la actividad exopectinolítica

utilizando esta cantidad de inóculo y descartando el utilizar un promotor de crecimiento en el medio.

Las condiciones determinadas en los experimentos 5.2 y 5.3 no necesariamente son las condiciones óptimas de las enzimas secretadas por las mixobacterias y citofagas, sin embargo, son las condiciones en las que en este trabajo sí presentaron mejores resultados.

5.5 Cuantificación de la actividad enzimática exopectinolítica.

Se evaluó la actividad de la enzima secretada por las cepas a pH 7 y a 37°C durante una hora, para cuantificar la actividad exopectinolítica.

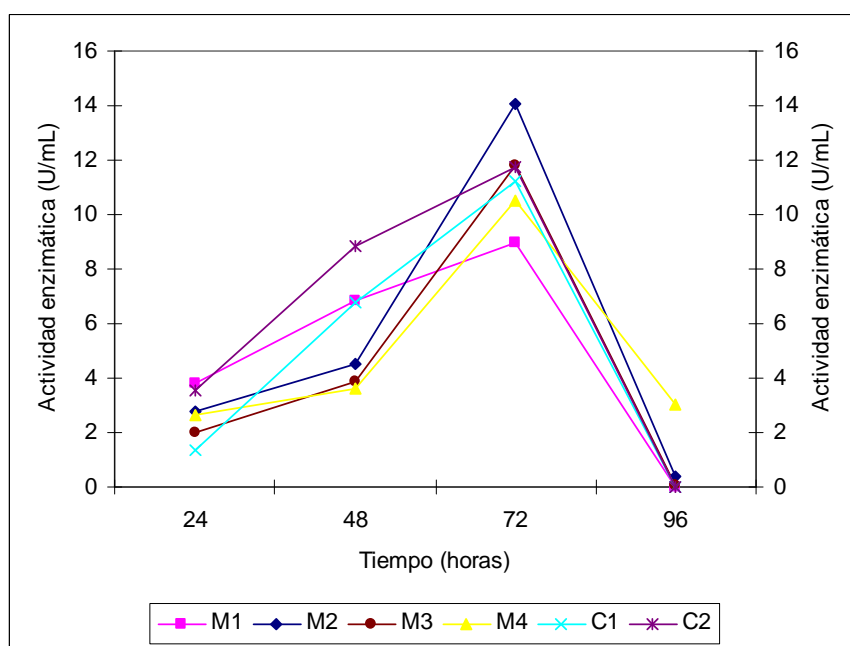


Figura 18. Actividad exopectinolítica de mixobacterias y citofagas crecidas a 37°C y pH 7.

Se observa en la figura 18 que presentaron actividad a partir de las 24 horas presentando un máximo a las 72 horas de incubación.

La cepa M2 fue la que presentó una mayor actividad exopectinolítica (14.091U/mL). Una unidad (U) de actividad pectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para

catalizar la producción de $1\mu\text{mol}$ de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de reacción.

Por otro lado la cepa M1 fue la que presentó menor actividad (8.95U/mL). En comparación al crecimiento observado, la cepa que presentó mayor crecimiento fue C2 y aunque no fue la que presentó mayor actividad exopectinolítica, fue la segunda más alta (11.76U/mL). La cepa M2 no presentó un crecimiento muy diferente con el resto de las cepas. Esto se puede deber a que las condiciones de crecimiento en pectina como fuente de carbono no sean necesariamente las mejores para que la enzima actúe y ello podría no presentar una mayor actividad.

5.6 Evaluación de la actividad enzimática endopectinolítica.

En la figura 19 se muestra la disminución de la viscosidad del medio líquido de pectina (2.5% p/v) a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Los valores mostrados son los porcentajes de disminución de viscosidad con respecto al blanco incubado a las mismas condiciones.

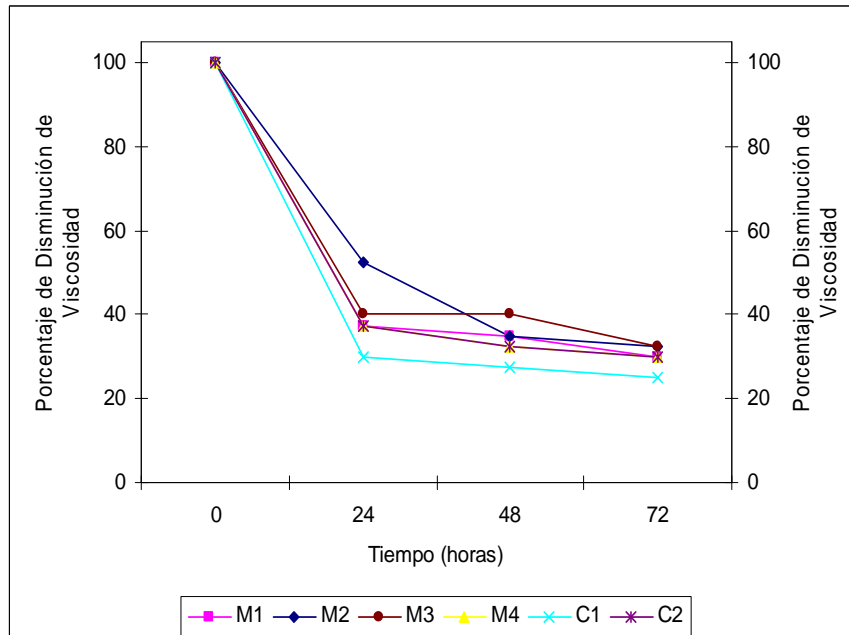


Figura 19. Disminución de la viscosidad del medio con pectina (2.5% p/v) de mixobacterias y citofagas incubadas a 37°C y pH 7.

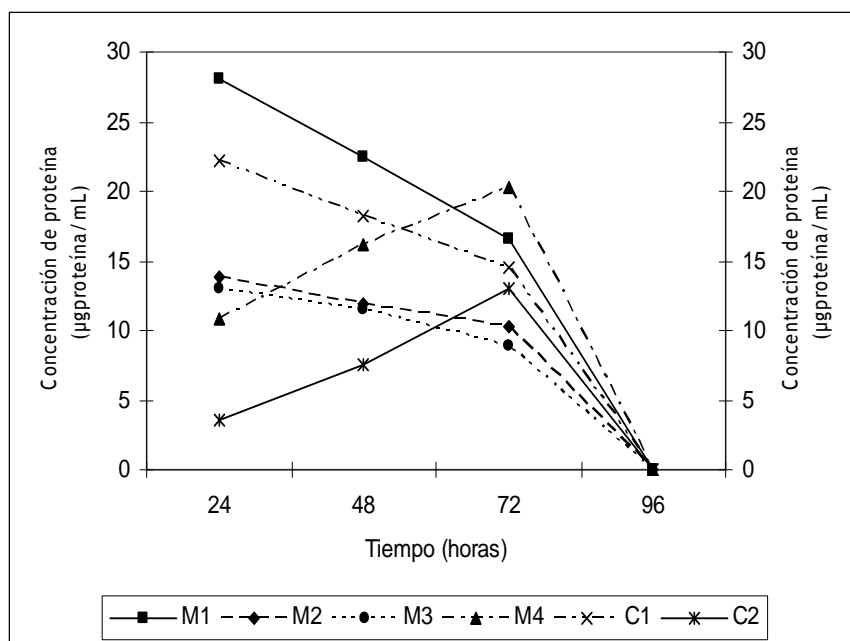
En la figura 19 se observa que después de 24 horas la viscosidad disminuye de manera significativa, es decir, dentro de las primeras 24 de incubación se lleva a cabo la mayor disminución de viscosidad del medio; al llegar a las 72 horas se observa el máximo de disminución.

Se observa que la cepa que presenta una mayor disminución de la viscosidad fue la cepa C1 con un porcentaje máximo de disminución del 75%. La otra cepa que pertenece a las citofagas (C2) presentó un máximo de disminución del 70%. En el caso de las mixobacterias se observó que las cepas M4 y la cepa M1 presentaron el mayor porcentaje de disminución del 70%, la cepa M2, también mixobacteria, presentó un porcentaje de disminución máximo de 67%. De manera general se observa que todas las cepas reducen la viscosidad arriba del 50% en las primeras 24 horas de incubación.

Al comparar la actividad exopectinolítica y la actividad endopectinolítica se observa que la cepa M2 es la que tuvo una mayor actividad exopectinolítica pero no así en actividad endopectinolítica ya que en esta fue la más baja; la cepa C1 que presentó un mayor porcentaje de disminución de la viscosidad no presentó la mayor actividad exopectinolítica, por lo que se puede pensar que no llevan a cabo en la misma cantidad la secreción de todas las enzimas pectinolíticas.

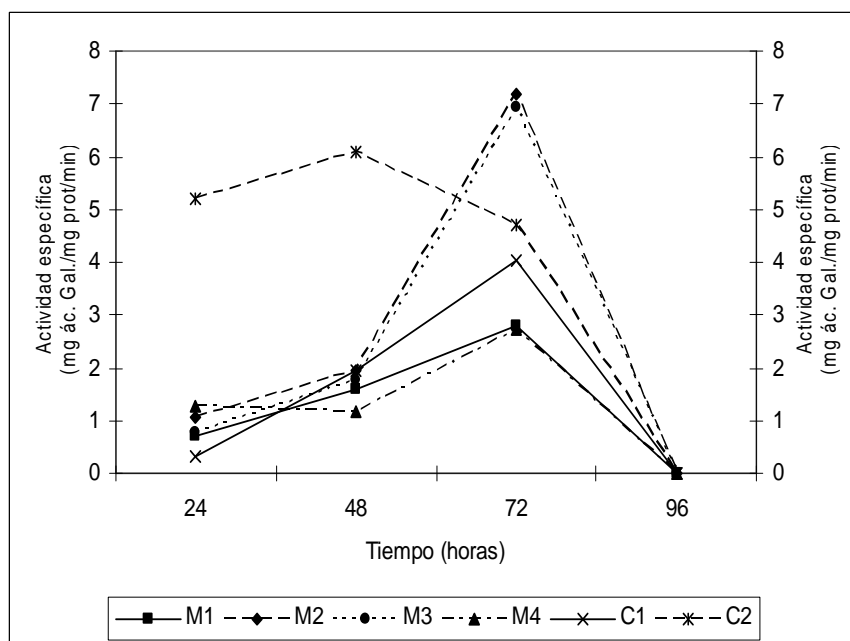
5.7 Relación de la cantidad de proteína secretada con la actividad enzimática.

Se cuantificó la cantidad de proteína secretada con el fin de determinar la actividad específica presentada por esta proteína; ya que se puede relacionar la cantidad de ácido galacturónico producida con la cantidad de proteína activa (enzima) presente que lleva a cabo la reacción de transformación.



Gráfica 2. Cuantificación de proteína total de las diferentes cepas, incubadas a 37°C pH 7, con el método de Bradford.

Se observa en la gráfica 2 la cantidad de proteína total secretada por cada cepa, mixobacterias y citofagas. Se puede observar que la cantidad de proteína producida por las cepas en el tiempo de 96 horas es de cero, no necesariamente significa que no se llevara a cabo la producción de proteína, en algunos casos las concentraciones fueron muy bajas y no pudieron ser detectadas o los valores no entraban dentro de las concentraciones de la curva patrón ya que eran inferiores. En general se observa que conforme pasan las horas de incubación la concentración de la proteína decrece; sin embargo, en las cepas M4 y C2 la concentración de proteína aumenta al paso del tiempo y ya en las 96 horas de incubación disminuyó.



Gráfica 3. Actividad específica de las diferentes cepas, incubadas a 37°C pH7.

En la gráfica 3 se observa la actividad específica de las cepas, la actividad específica relaciona la cantidad de ácido galacturónico producido con la cantidad de proteína presente secretada por minuto de reacción, cuantificado en el ensayo de la actividad exopectinolítica.

Se observa que las cepas M2 y M3 son las que presentan una mayor actividad específica, un promedio de 7mg ácido Gal./mg prot/min. La cepa M2 fue la que presentó una mayor actividad exopectinolítica y de la misma forma la que presentó una mayor actividad específica.

Se puede observar para la cepa M1, que aunque fue la que presentó la más alta cantidad de proteína total (28µg/mL), sin embargo, solo una cantidad pequeña de ésta fue la que presentó actividad enzimática (exopectinolítica), ya que la cantidad producida de ácido galacturónico por proteína presente fue baja, 2.8mg ácido Gal./mg prot/min.

La cepa M4 fue la que presentó una mayor cantidad de proteína total a las 72 horas de incubación (20µg/mL), sin embargo, fue la cepa con una menor actividad específica (2.7mg ácido Gal./mg prot/min), esto nos sugiere de igual forma que en la cepa M1, que una pequeña cantidad de la proteína secretada presentaba actividad.

La cepa C2 fue la que presentó una mayor actividad específica a partir de las 24 horas, 6mg ác.Gal/mg prot/min, aunque en este mismo tiempo fue la que presentó una menor cantidad de proteína total, esto puede sugerir que la proteína total secretada tenía más actividad enzimática. Su máximo de actividad específica fue a las 48 horas a diferencia de las otras cepas que fue a las 72 horas.

En todas las cepas se observó que no se pudo cuantificar la cantidad de proteína a las 96 horas y por lo tanto no se pudo calcular la posible actividad específica, si bien no es posible detectar tampoco actividad exopectinolítica en este tiempo (Figura 18).

5.8 Evaluación cualitativa de la actividad pectinolítica mediante el método en placa con colorante Rojo de Rutenio.

a) Placas con pectina y agar.

En las placas con pectina y agar no se obtuvo ninguna colonia y al ser teñidas con la solución de rojo de rutenio no se presentaron halos de degradación. Esto puede ser porque la pectina con el agar forman redes muy firmes y cerradas por lo que es más complicado para el microorganismo degradar a las cadenas de pectina. Por esta razón, se decidió cambiar el agar por agarosa ya que forma geles de cadenas no tan unidas y firmes y se cambió la pectina por ácido péctico, un derivado de la degradación de pectina que puede ser más fácil de catabolizar.

b) Placas con ácido péctico y agarosa.

En estas placas sí se observaron pequeñas colonias en la superficie después de las 72 horas de incubación a 37°C. Además, al teñir las cajas con la solución del colorante rojo de rutenio se observaron halos de degradación alrededor de estas colonias, esto se debe a que el colorante y el polisacárido forman un complejo por esto se tiñen de color rojo las cajas, al no existir este polisacárido se observan partes más claras o sin teñir y es donde el microorganismo llevó a cabo la degradación del polisacárido.

En la figura 20 se muestran los halos de degradación a las 72 horas de incubación. La figura 20a corresponde a la cepa M3 donde se lograron observar 15 colonias y alrededor de ellas un halo transparente. La figura 20b corresponde a la cepa C2 en las que se

contaron también 15 colonias. De todas las cepas se obtuvieron 75 colonias, partiendo de un inóculo de 500 μ L de cultivo fresco en cada caja.

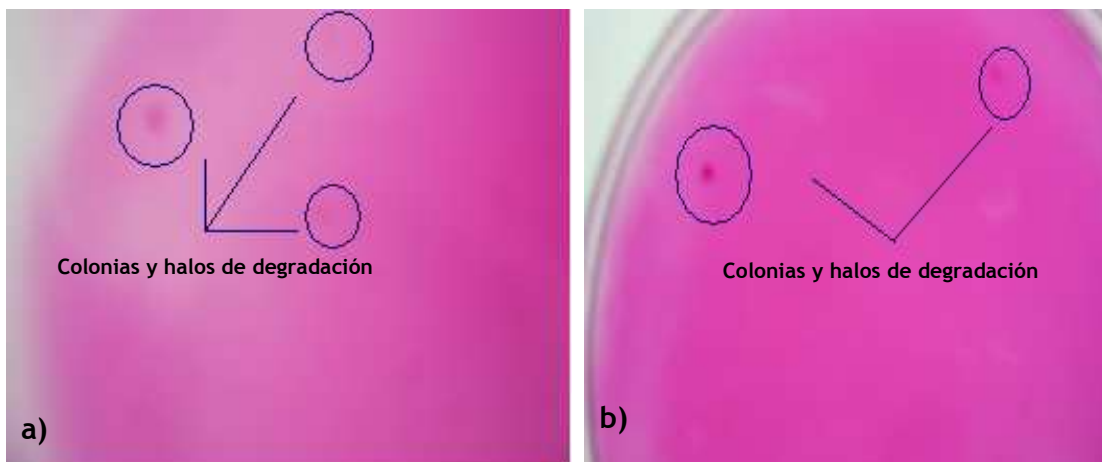


Figura 20. Degradación del ácido péctico en placa. La figura a) corresponde a la cepa M3, la figura b) corresponde a la cepa C2.

En la tabla 5 se muestra el promedio del diámetro de los halos observados y fueron comparados con los obtenidos por la enzima pura *Pectoliasa* (*Pectoliasa*, *Aspergillus japonicus*) 0.01mg/mL para poder comparar como es la actividad de las bacterias. Como se observa en la tabla 5 el diámetro obtenido por la enzima es mayor que el obtenido por las bacterias.

Tabla 5. Halo de degradación en placas con ácido péctico.

Cepas	Promedio del halo (mm)
Control (enzima pura)	27.2
M1	9.5
M2	9.8
M3	11.2
M4	8.8
C1	10.1
C2	12.4

La cepa que presenta un diámetro más grande de degradación es la cepa C2 con 12.4mm, de las mixobacterias la cepa M3 es la que presenta el mayor diámetro de 11.2mm. La cepa M4, mixobacteria, presentó el menor diámetro (8.8mm).

Aunque estos resultados nos dan una idea de la actividad enzimática de las bacterias no se pueden comparar totalmente ya que por una parte se utilizó a todo el microorganismo y por la otra a la enzima pura. Además, las condiciones de pH y temperatura en las cuales fueron incubadas son las determinadas experimentalmente y la cantidad de enzima utilizada es mucho mayor a la producida por el microorganismo.

De las cajas se tomaron muestras para realizarles una tinción para asegurar que las bacterias originales fueran las que llevaron a cabo la degradación y no una fuente de contaminación. Al realizar la tinción se observó que las bacterias se encontraban en forma de esporas; esto se debe a que estuvieron en condiciones de deficiencia de nutrientes en las cajas ya que no contenía ninguna fuente de nitrógeno y para que la fuente de carbono, ácido péctico, fuera aprovechada era necesario llevar a cabo la secreción de enzimas y, aunque si lo llevaron a cabo, muchas bacterias esporularon con el fin de sobrevivir (Figura 21).

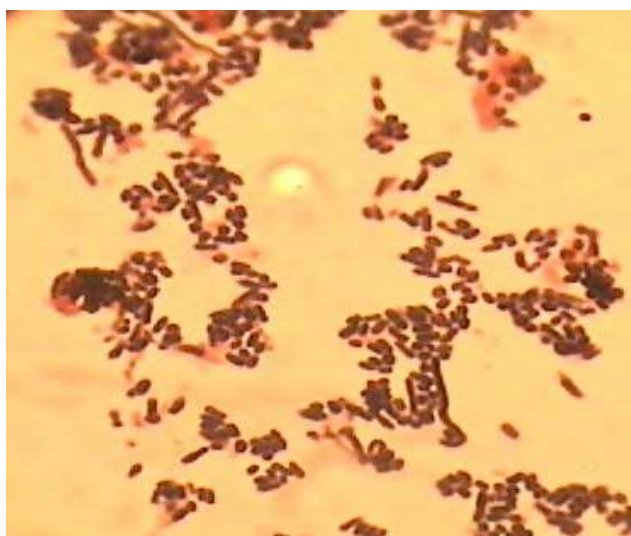


Figura 21. Esporas de la cepa M3 en placas con ácido péctico.

5.9 Evaluación del crecimiento en sustratos complejos.

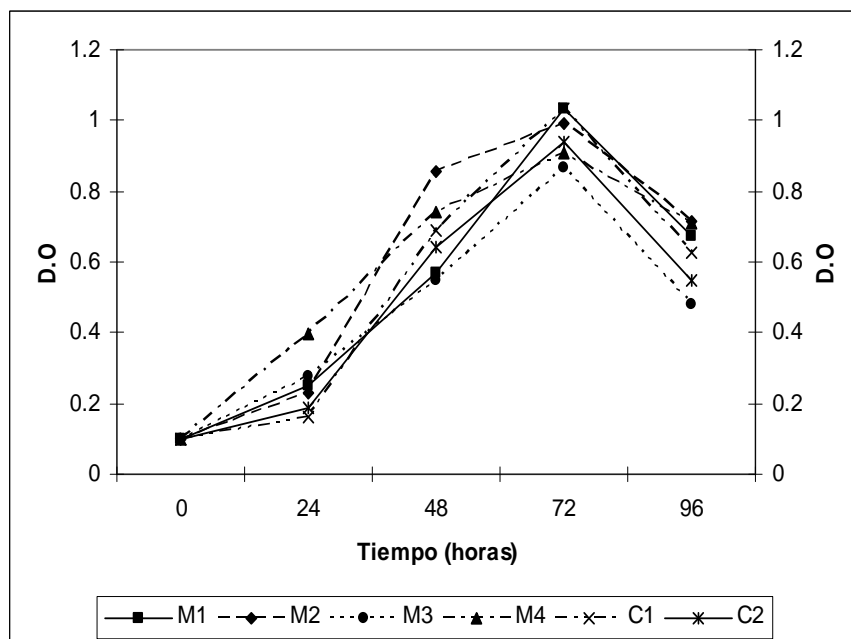
En la figura 22a se pueden observar las curvas de crecimiento en el medio A. Las cepas que presentan un mayor crecimiento son la M1 y C1.

Sin embargo, no se puede asegurar que el crecimiento desde el tiempo cero a las 24 horas se haya llevado a cabo por la degradación de pectina ya que en la piel de naranja se encuentran azúcares más simples como la glucosa, fructosa y sacarosa que puede ser aprovechada por las citofagas y mixobacterias para crecer.

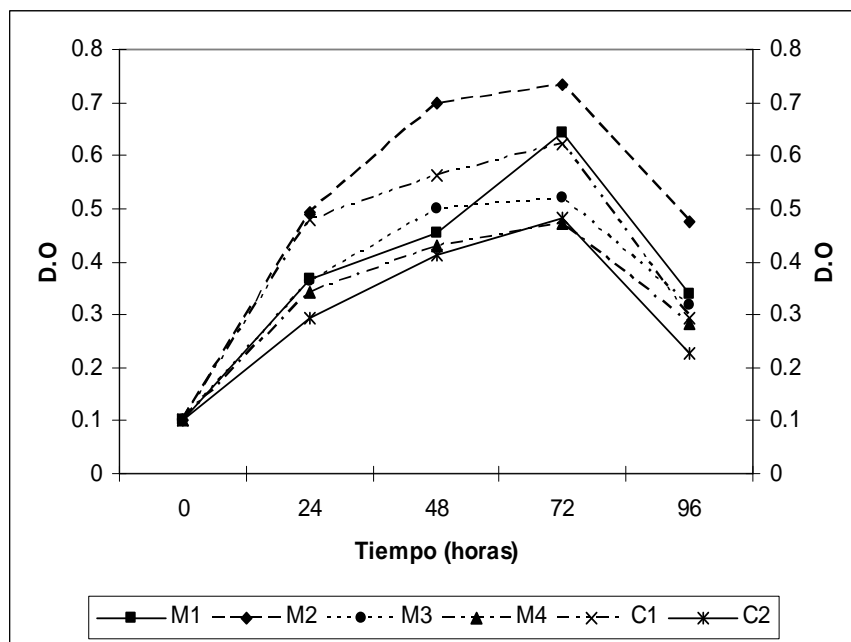
En la figura 22b se muestra el crecimiento de las cepas en el medio B; las cepas que presentan un mayor crecimiento son las cepas M2 y M1. De la misma forma que con respecto al crecimiento en naranja, no se puede asegurar que la diferencia del crecimiento dentro de las 24 horas de incubación se deba exclusivamente a la degradación de la pectina, sino que se puede suponer que inicialmente aprovechen componentes más simples presentes en los sustratos.

Al comparar el desarrollo en ambos sustratos se observa que el crecimiento en el medio A fue mayor que en el medio B. Si bien, dentro de las primeras 24 horas de incubación se observó un mayor desarrollo en el medio B.

El máximo de crecimiento en ambos medios lo presentaron a las 72 horas esto se podría deber a que las mixobacterias y citofagas en este tiempo podrían haber terminado con los nutrientes disponibles para continuar su desarrollo. Tal vez se podría pensar que si se siguen incubando, las cepas se verían obligadas a volver a llevar a cabo la producción de enzimas para hidrolizar los compuestos más complejos y así continuar su reproducción.



Gráfica a) Crecimiento en el medio A.

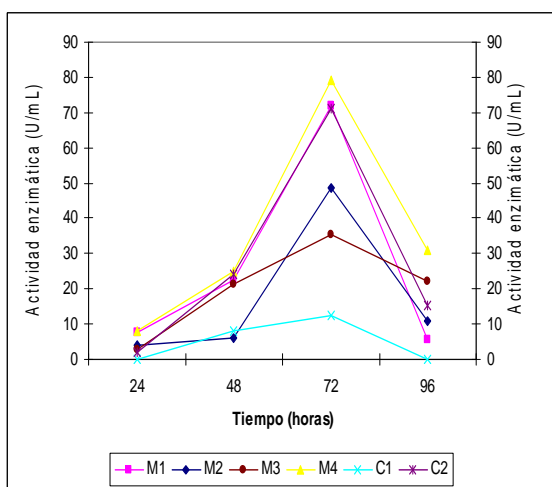


Gráfica b) Crecimiento en el medio B.

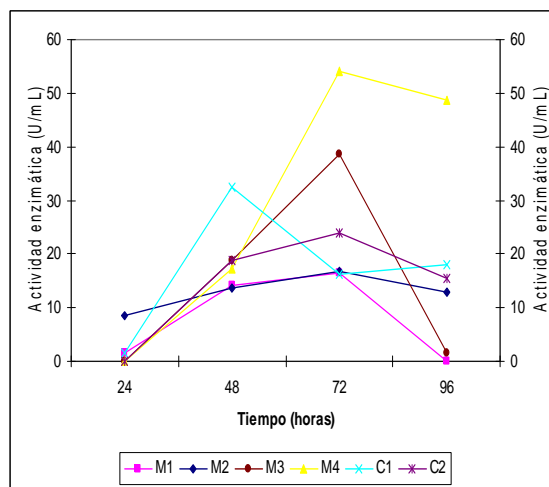
Figura 22. Crecimiento de las diferentes cepas en el los medios A y B de los sustratos complejos incubas a pH 7 y 37°C.

5.10 Cuantificación de actividad enzimática exopectinolítica en los sustratos complejos.

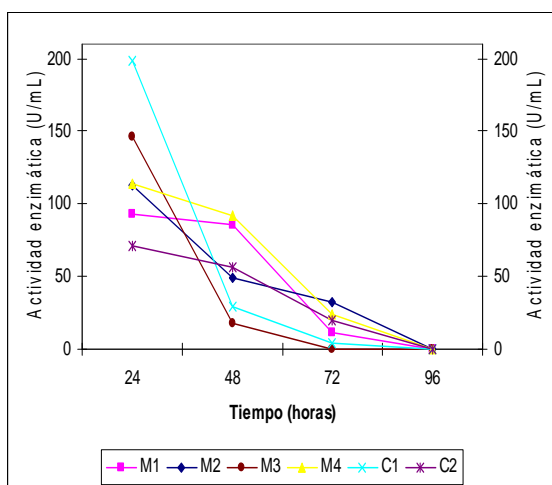
Las cepas fueron crecidas en el medio mineral con el sustrato al 1% (p/v) medios A y B. El sobrenadante obtenido de cada cepa se incubó con el sustrato correspondiente y también con pectina, sustrato puro, para evaluar la actividad de la enzima producida, en las condiciones de temperatura y pH evaluadas en el experimento 5.4.



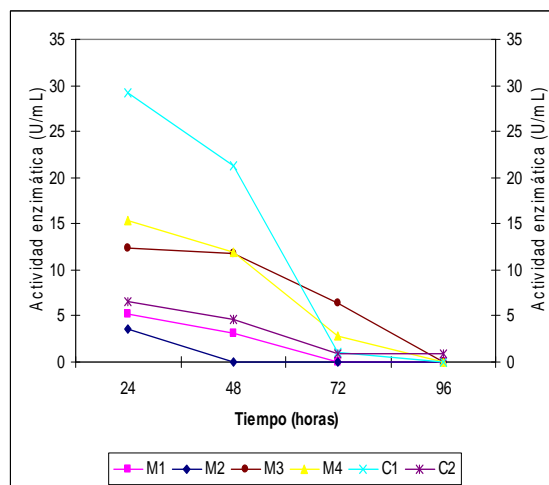
Gráfica a) Actividad exopectinolítica de todas las cepas en el sustrato piel de naranja.



Gráfica b) Actividad exopectinolítica de todas las cepas en el sustrato puro pectina.



Gráfica c) Actividad exopectinolítica de todas las cepas en el sustrato bagazo de manzana.



Gráfica d) Actividad exopectinolítica de todas las cepas en el sustrato puro pectina.

Figura 23. Cuantificación de la actividad exopectinolítica de las diferentes cepas crecidas en los sustratos complejos; cuantificando la actividad en los sustratos y en el sustrato puro pectina.

En la figura 23 se puede observar que las mixobacterias y citofagas presentaron actividad exopectinolítica en ambos sustratos complejos y en el sustrato puro.

Las figuras 23a y 23b muestran la actividad enzimática de las células crecidas en medio A; la figura 23a muestra la actividad enzimática que se obtuvo del sobrenadante al ser incubado con el medio mineral y el pulverizado de piel de naranja. Se pudo observar que la cepa con mayor actividad exopectinolítica (79.19U/mL) fue la cepa M4; en contraste, la cepa C1 presentó la menor actividad exopectinolítica (12.57U/mL), sin embargo, fue la que presentó un mayor crecimiento, lo cual puede sugerir que creció a base de azúcares simples, ya que la concentración de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa forman el 62.7% de la composición de la piel de naranja. La cepa M1 también presentó mayor actividad exopectinolítica (71.85U/mL). Todas las cepas presentaron un máximo en su actividad a las 72 horas de incubación para después decaer a las 96 horas de incubación.

La figura 23b muestra la actividad exopectinolítica de las diferentes cepas crecidas en el medio mineral A; sin embargo, el sobrenadante con las enzimas producidas fue incubado con pectina. De igual manera, el sobrenadante de la cepa M4 fue el que presentó una mayor actividad enzimática, 54.01U/mL, la cepa C1, también presentó la menor actividad enzimática 16.34 U/mL y fue la única cepa que presentó su máximo de actividad a las 48 horas, las demás cepas lo presentaron a las 72 horas de incubación. Se observa que al ser incubado el sobrenadante en pectina la actividad fue menor que al ser incubado con el pulverizado de piel de naranja; esto se puede deber a que no todas las enzimas obtenidas son pectinolíticas así que al ser incubadas en pectina solo actúan aquellas que si lo son, sin embargo, cuando fueron incubadas en piel de naranja puede ser que actúen enzimas celulolíticas, xilanolíticas, etc., también producidas por las mixobacterias y citofagas.

Las figuras 23c y 23d muestran la actividad exopectinolítica de las diferentes cepas crecidas en el medio B. En la figura 23c las enzimas que fueron obtenidas fueron incubadas en el pulverizado de bagazo de manzana para medir su actividad; de manera general se observa que todas las cepas presentan un máximo de actividad a las 24 horas de incubación; a diferencia de lo observado con el pulverizado de piel de naranja en la que presentaron la mayor actividad a las 72 horas de incubación, figura 23a. La cepa que presentó la mayor actividad enzimática fue C1 (198 U/mL), mientras que en el pulverizado

de piel de naranja fue la que presentó una menor actividad, la cepa C2 presentó una menor actividad, 70.86U/mL. En la figura 23d se observa la actividad enzimática que presentó el sobrenadante al ser incubado en pectina; de la misma forma presentan un máximo de actividad a las 24 horas de incubación para después decaer; la cepa C1 presenta también la mayor actividad (29.22U/mL); la cepa M2 fue la que casi no presentó actividad, ya que solo la presentó a las 24 horas de incubación. Los valores de actividad en pectina fueron mucho menores que los presentados al ser incubadas en el sustrato complejo.

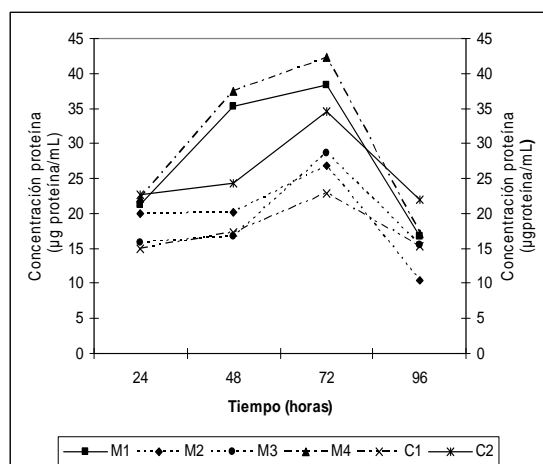
Al comparar las actividades en los dos sustratos se observa que aunque en manzana los valores de actividad fueron más altos solo presentan actividad dentro de las 48 horas de incubación mientras que en piel de naranja siguieron mostrando actividad hasta las 72 horas. Esto se debe de tener muy en cuenta si se quieren obtener enzimas activas de mixobacterias y citofagas; se debe de escoger el sustrato adecuado para que puedan ser producidas. Otro factor que pudo tener efecto fue el pH ya que aunque el pH del medio era de 7 conforme se van consumiendo los sustratos se afecta el pH del medio y eso puede evitar que el microorganismo continúe produciendo las enzimas o bien dichas enzimas pueden perder actividad.

5.11 Relación de la cantidad de proteína con la actividad enzimática en sustratos complejos.

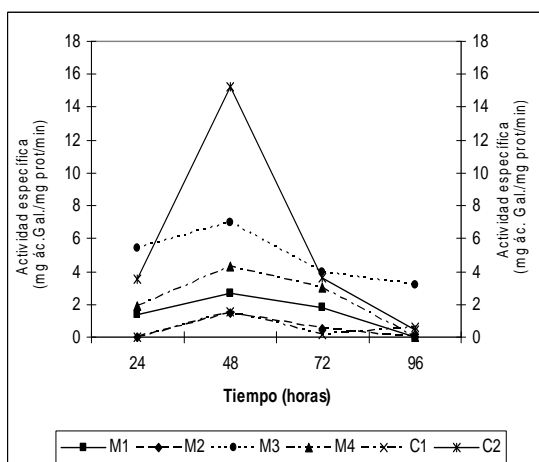
De la misma forma que cuando las cepas fueron incubadas en el sustrato puro pectina, se cuantificó la cantidad de proteína secretada al ser crecidas en el medio A para relacionar la cantidad de proteína presente activa con la producción de ácido galacturónico.

En la figura 24a, se muestra la cantidad de proteína secretada por todas las cepas. Se observa que la cantidad presente es mayor que la observada con el sustrato puro. La cepa que tiene una mayor cantidad de proteína (42µg/mL) secretada al medio es la cepa M4. La cepa con una menor producción de proteína es la cepa C1, 22.79µg/mL, esta cepa fue la que presentó una menor actividad exopectinolítica.

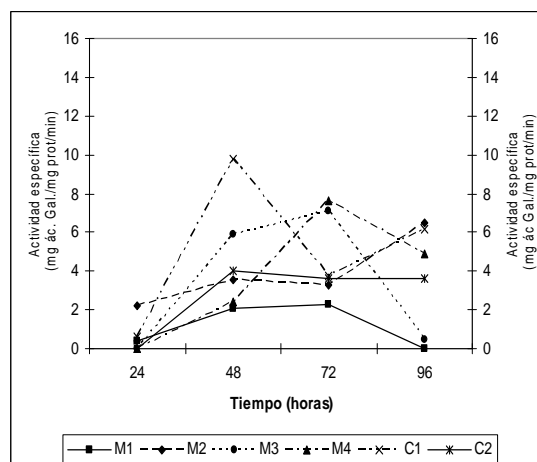
La figura 24b muestra la actividad específica de las diferentes cepas; se observa que la cepa C2 es la que presentó una mayor actividad específica en el medio A (15.25mg ác. Gal/mg proteína/min) esto puede indicar que, aunque no presentó una actividad enzimática mayor que las otras cepas, la cantidad de proteína secretada y cuantificada tenía más actividad con respecto a la proteína cuantificada de las demás cepas.



Gráfica a) Concentración de proteína secretada por todas las cepas crecidas en el medio A.



Gráfica b) Actividad específica de todas las cepas en el pulverizado de piel de naranja.



Gráfica c) Actividad específica de todas las cepas en pectina.

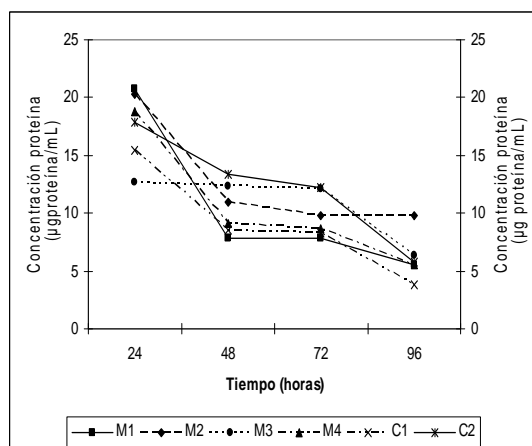
Figura 24. Actividad específica de todas las cepas crecidas en el medio A.

Todas las cepas presentan un máximo en su actividad específica a las 48 horas de incubación. Esto sugiere que en este momento la mayor parte de la proteína secretada es enzima que está llevando a cabo la actividad pectinolítica. El máximo de producción de proteína es a las 72 horas pero la actividad específica es menor. Esto se puede deber a que en este tiempo hay más proteína secretada además de las enzimas pectinolíticas

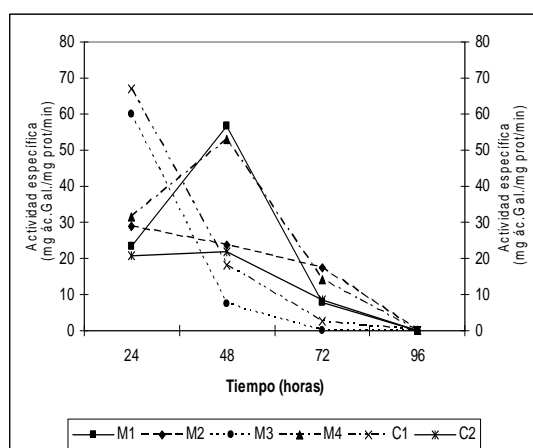
producidas. Si se observa la figura 23a y 23b se puede ver que el máximo de actividad exoenzimática también lo presentan a las 72 horas como en la cantidad de proteína secretada. Esto puede indicar que la actividad específica disminuye en este tiempo de incubación porque no toda la proteína cuantificada en el medio es proteína activa o enzima.

En la figura 24c se muestra la actividad específica del sobrenadante en pectina. La cepa C1 es la que presenta mayor actividad específica, 9.80mg ác. Gal/mg proteína/min, es decir, la cantidad de proteína secretada tenía una mayor actividad a diferencia de las demás cepas. Sin embargo, esta cepa presentó una menor cantidad de proteína total, esto puede indicar que la proteína secretada era en una mayor parte enzima que presentaba actividad.

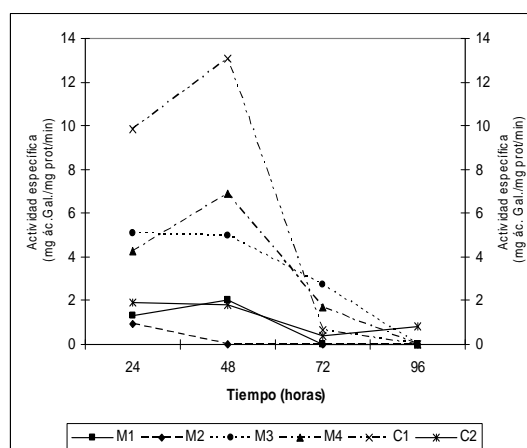
En este caso el máximo de actividad específica fue diferente para cada cepa, esto es porque la proteína secretada con actividad depende de cada cepa y con esto la actividad presentada es diferente en cada caso. Aunque de nueva cuenta se observa que la actividad enzimática presentada en el sustrato complejo es mayor que en el sustrato puro.



Gráfica a) Concentración de proteína secretada por todas las cepas crecidas en el medio B.



Gráfica b) Actividad específica de todas las cepas en el pulverizado de bagazo de manzana.



Gráfica c) Actividad específica de todas las cepas en pectina.

Figura 25. Actividad específica de todas las cepas crecidas en el medio B.

La figura 25a muestra la cantidad de proteína secretada por todas las cepas crecidas en el medio B. No se puede observar una diferencia clara en la producción de proteína de cada cepa para poder establecer la que tuvo una mayor producción. Entre los valores obtenidos un poco más altos con respecto a las demás cepas fueron los de 20.76µg/mL de la cepa M1 y 20.32 µg/mL cepa M2.

Se observa que todas produjeron más proteína a las 24 horas de incubación, entre las 48 y 72 horas de incubación no existió una gran diferencia y a las 96 horas de incubación disminuyó su producción.

La figura 25b muestra la actividad específica al incubar la enzima con el pulverizado de bagazo de manzana. La cepa C1 presentó una mayor actividad específica que las demás cepas (67.06mg ác. Gal/mg proteína/min). De la misma forma que su producción de proteína, el máximo de actividad fue a las 24 horas de incubación y fue disminuyendo al paso del tiempo. La cepa M3 tuvo un comportamiento similar a la cepa C1, fue la segunda cepa con mayor actividad específica: 60.13mg ác. Gal/mg proteína/min y aunque su producción de proteína se mantuvo constante durante las 72 horas de incubación, la parte de proteína activa presente fue mayor a las 24 horas ya que es cuando se presentó una mayor actividad específica y una mayor actividad exopectinolítica. Aunque estas dos cepas presenten un máximo de actividad mayor que las demás se observa que después de las 48 horas la actividad disminuye drásticamente, mientras que las demás cepas siguen presentando actividad hasta las 72 horas de incubación.

La figura 25c muestra la actividad específica en pectina, la cepa C1 es la que muestra de nueva cuenta una mayor actividad específica, 13.08mg ác. Gal/mg proteína/min. Sin embargo, ahora presenta un máximo de actividad a las 48 horas, esto podría indicar que a las 48 horas se secretaron más enzimas pectinolíticas que a las 24 horas de incubación. La cepa M4 presenta el mismo comportamiento de actividad específica en el pulverizado de bagazo de manzana que en pectina, se observa un máximo de actividad a las 48 horas de incubación para después disminuir. Las cepas M1, M2 y C2 son las que presentan una menor actividad específica, esto quiere decir que del total de proteína producida una pequeña parte fue enzima pectinolítica. Las cepas presentaron un máximo de actividad específica a las 48 horas de incubación.

En ambos sustratos complejos, piel de naranja y bagazo de manzana, se observa que tanto la actividad específica en el sustrato complejo como la actividad exopectinolítica es considerablemente mayor que al ser incubada la enzima en el sustrato puro.

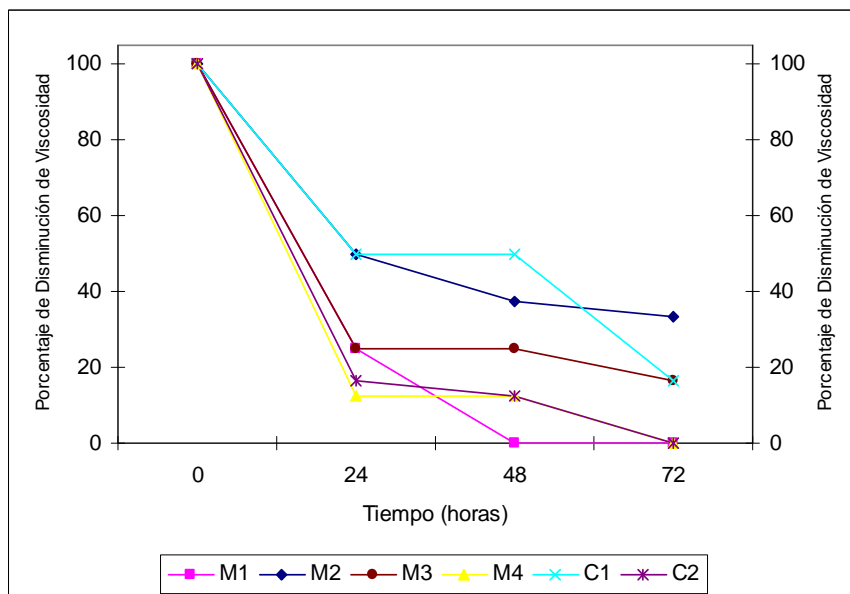
5.12 Evaluación de la actividad endopectinolítica en sustratos complejos.

La figura 26 muestra las gráficas con el porcentaje de disminución de viscosidad de los medios con los pulverizados de los sustratos complejos. La figura 26a presenta la disminución de la viscosidad del medio mineral con pulverizado de piel de naranja; todas las cepas en las primeras 24 horas de incubación disminuyeron hasta un 50% o más la

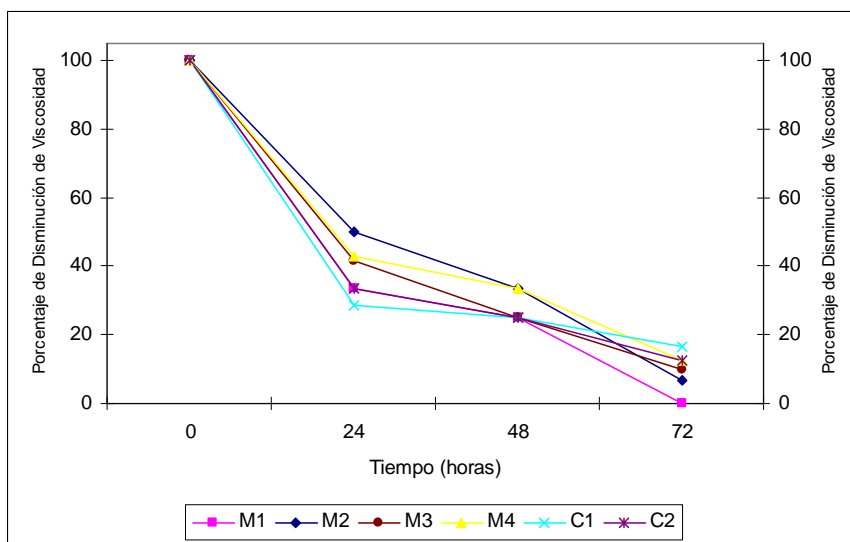
viscosidad del medio, la cepa M1 a las 24 horas de incubación disminuyó la viscosidad al 75%, a las 48 horas disminuyó la viscosidad un 100%, es la cepa que disminuyó más la viscosidad del medio en menos tiempo con respecto a las demás. La cepa C1 dentro de las primeras 48 horas de incubación solo disminuyó el 50% de la viscosidad del medio, hasta las 72 horas disminuyó más la viscosidad a un 83%. La cepa M2 fue la que presentó una menor disminución del medio ya que su máximo fue de 66% en las 72 horas de incubación. La cepa M3 en las primeras 48 horas de incubación disminuyó la viscosidad un 75%, llegó a disminuir la viscosidad a 83%. La cepa M4 disminuyó la viscosidad 87% en las 48 horas de incubación, fue la que disminuyó más la viscosidad dentro de las primeras 24 horas de incubación. La cepa C2 también presentó un total porcentaje de disminución de viscosidad del medio (100%) a las 72 horas de incubación.

En la figura 26b se muestra la disminución relativa de la viscosidad del medio con pulverizado de bagazo de manzana por las mixobacterias y citofagas. De la misma forma que en el medio con pulverizado de piel de naranja, las mixobacterias y citofagas disminuyeron más del 50% de la viscosidad del medio dentro de las primeras 24 horas de incubación. La cepa C1 fue la que presentó una mayor disminución dentro de las primeras 24 horas y fue del 71%, aunque al máximo de disminución que llegó en el tiempo de incubación fue el menor con respecto a las demás cepas (83%). La cepa M1 disminuyó en un 66% la viscosidad en las primeras 24 horas de incubación y presentó el máximo de disminución, 100%, a las 72 horas de incubación. La cepa C2 también disminuyó un 66% la viscosidad en las 24 horas de incubación, sin embargo, su máximo fue de 87% a las 72 horas de incubación. Las cepas M3 y M4 tuvieron comportamientos muy similares, ya que disminuyeron la viscosidad cerca del 60% dentro de las primeras 24 horas de incubación y su máximo fue del 90%. La cepa M2 fue la que produjo una menor disminución de la viscosidad en 24 horas, solo del 50%, aunque el máximo de disminución fue del 93%.

Se observa que los porcentajes de disminución de viscosidad obtenidos fueron mayores en el pulverizado de piel de naranja que en el pulverizado de bagazo de manzana.



Gráfica a) Disminución Relativa de viscosidad del medio mineral con el pulverizado de piel de naranja 5% (p/v), de mixobacterias y citofagas.



Gráfica b) Disminución Relativa de viscosidad del medio mineral con el pulverizado de bagazo de manzana 5% (p/v), de mixobacterias y citofagas.

Figura 26. Disminución Relativa de viscosidad de los medios al 5% de los sustratos complejos de las mixobacterias y citofagas.

5.13 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Para poder observar la posible presencia de enzimas pectinolíticas se corrieron geles de proteínas con el sobrenadante de las bacterias crecidas en el medio con pectina; se utilizó el sobrenadante de las 72 horas de incubación debido que fue el tiempo a la que presentaron una mayor concentración de proteína secretada; sin embargo, las bandas no se lograron observar en los geles cuando fueron teñidos con una solución de Azul de Coomassie R-250; por lo que se tiñeron con plata ya que esta solución tiene mayor sensibilidad.

Se utilizaron marcadores de pesos molecular y además una enzima pectinolítica de referencia; *Pectoliasa* (*Pectoliasa*, *Aspergillus japonicus*).

En la figura 30 se muestra el gel de proteínas realizado; se observan las bandas de los pesos moleculares, la banda de la enzima patrón y la banda obtenida del sobrenadante de la cepa M2 como ejemplo de lo obtenido para las seis cepas. La banda que se obtuvo para cada cepa se observó a la misma distancia que la de referencia; esto nos sugiere que el grupo de enzimas pectinolíticas con la que cuentan las mixobacterias y citofagas son las liasas.

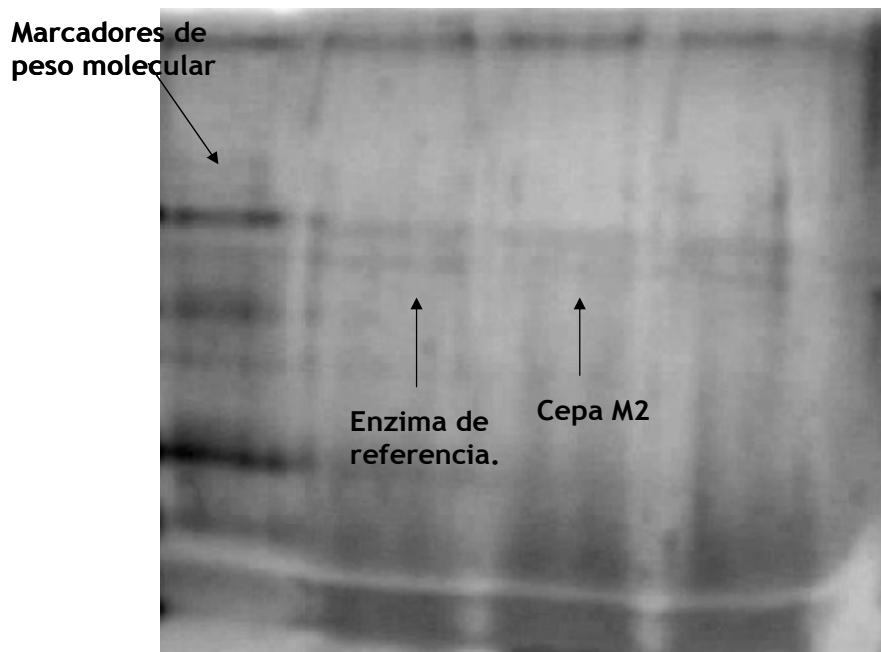
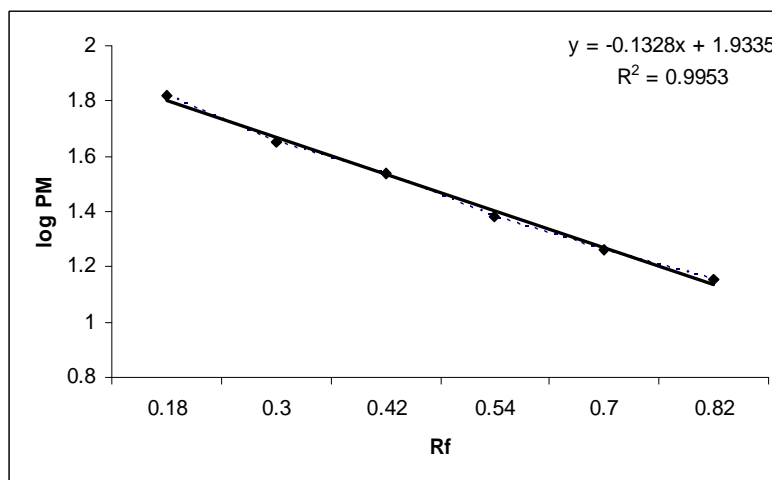


Figura 27. Fotografía de uno de los geles de proteínas realizado con el sobrenadante de las cepas, los marcadores de peso molecular y la enzima referencia.



Gráfica 4. Gráfica del logaritmo del peso molecular de los marcadores contra el Rf de los marcadores para el gel de proteínas.

Para calcular el peso molecular de la banda obtenida se utilizó la siguiente ecuación:

$$y = -0.1328x + 1.9335 \text{ ec. 1}$$

donde x = al Rf de la muestra problema.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la proteína (mm)}}{\text{distancia total recorrida (mm)}} \text{ ec. 2}$$

Tabla 6. Distancia recorrida de la muestra en el gel de proteínas y su peso molecular calculado con la ecuación 1.

Distancia Recorrida (mm)	PM (kDa)
13	77,68

Por los resultados obtenidos con la ecuación 1, se estima que el peso molecular de la enzima es de 77kDa; aunque se haya obtenido la banda a la misma distancia del patrón no se puede asegurar que la enzima presente sea pectoliasa.

Se ha reportado en la literatura que los pesos moleculares de las enzimas pectinolíticas son muy diferentes y dependen del grupo al que pertenezcan; existen enzimas con un peso molecular alrededor de 30 a 40kDa hasta de 400kDa. Algunas enzimas con el peso molecular cercano al obtenido en este trabajo son: Exopoligalacturonasa de *Penicillium frequentans* con un peso molecular de 79kDa; Pectoliasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* con un molecular de 74kDa, entre otras.

5.14 Discusión general.

a) Clasificación e identificación.

Las mixobacterias y citofagas son un grupo de bacterias que se encuentran en el medio ambiente capaces de crecer en sustratos orgánicos complejos. Pueden ser aisladas en el laboratorio por la presencia de cuerpos fructíferos y degradación del papel. El criterio de aislamiento se basó en la búsqueda de cuerpos fructíferos y de las características macroscópicas con la ayuda de la clave de identificación según Reinchenbach. Las mixobacterias utilizadas en este trabajo de investigación fueron las que presentaron una mayor actividad enzimática del total de cepas aisladas en el laboratorio.

b) Determinación de condiciones de crecimiento *in vitro*.

De las bacterias aisladas y purificadas se determinaron las condiciones de temperatura y pH donde presentaron un mejor crecimiento *in vitro*. Como resultado se observó que al incrementar la temperatura se obtuvo un mejor crecimiento (32°C) y a pH de 7.

- c) Determinación de condiciones de crecimiento utilizando pectina como fuente de carbono.

Se evaluaron los parámetros de temperatura, pH, composición del medio y cantidad de inóculo inicial, donde se observó que a temperatura de 37°C, pH 7 y el doble de inóculo inicial se obtuvo una mayor producción de ácido galacturónico como resultado de la degradación de pectina.

- d) Actividad enzimática en pectina.

Posteriormente, se cuantificó la actividad enzimática exopectinolítica con el medio de pectina y se obtuvo actividad a partir de las 24 horas de incubación, sin embargo, la actividad disminuyó después de las 72 horas de incubación.

Otro método para evaluar la actividad pectinolítica es la disminución de la viscosidad de soluciones de pectina, donde se observó que dentro de las primeras 24 horas disminuyó más del 50%. Por lo reportado en la literatura (Jayani, R. et al. 2005) se sabe que el grupo de enzimas que contribuyen a la disminución de la viscosidad son principalmente el grupo de las liasas; por lo que al presentar las cepas una disminución considerable de la viscosidad se puede pensar que las mixobacterias y citofagas cuentan con este grupo de enzimas.

La cepa M2 fue la que presentó una mayor actividad exopectinolítica; la cepa C1 fue la que presentó el máximo de disminución de viscosidad, actividad endopectinolítica.

Los resultados obtenidos en la determinación de las actividades exo y endo enzimáticas pueden ser un punto de partida para llevar a cabo la identificación de qué grupo de enzimas pectinolíticas son con las que cuentan las mixobacterias y citofagas.

También se evaluó su actividad en placas con pectina; aparentemente, no se observó actividad enzimática. Sin embargo, al utilizar un derivado de la pectina, ácido péctico, sí se pudo observar actividad enzimática. La determinación de actividad en placas se basa en la formación de un complejo formado entre un polisacárido y el colorante rojo de rutenio.

e) Sustratos complejos.

Para poder observar el comportamiento de las mixobacterias y citofagas en un sustrato orgánico más parecido al que se encuentra en el medio ambiente se evaluó su crecimiento y actividad en sustratos orgánicos complejos. En estos sustratos se observó una mayor cantidad de actividad enzimática a diferencia de la presentada con el sustrato puro. Sin embargo, por la complejidad de los sustratos y sus compuestos no se puede asegurar que solo se secreten enzimas pectinolíticas o que el crecimiento bacteriano haya sido solamente por la degradación de la pectina presente.

La cepa C1 presentó mejor actividad enzimática tanto exopectinolítica como endopectinolítica en el medio B (medio mineral con el pulverizado de bagazo de manzana) que en el medio A (medio mineral con el pulverizado de piel de naranja).

La cepa M2 presentó una mejor actividad enzimática en el medio que en el medio B; esto puede ser indicativo de las diferencias en el perfil enzimático de mixobacterias y citofagas.

Los geles de proteínas realizados mostraron bandas indicando la posible presencia de enzimas pectinolíticas, la evaluación de la actividad enzimática *in situ* ayudaría a corroborar la presencia de estas enzimas en el sobrenadante de las cepas.

Existen muchos métodos para la evaluación de la actividad pectinolítica de los microorganismos. Con los resultados obtenidos se pueden mejorar las condiciones evaluadas o buscar alternativas para la investigación y extracción de enzimas pectinolíticas de mixobacterias y citofagas.

CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

- ★ Las mixobacterias y citofagas que presentaron una mejor actividad enzimática se lograron identificar en base a las características presentadas en su aislamiento así como con sus características micro y macroscópicas.
- ★ Las condiciones de pH y temperatura en las cuales se obtiene un mejor crecimiento *in vitro* de las mixobacterias y citofagas fueron de pH 7 y 32°C.
- ★ Las mixobacterias y citofagas presentaron un mejor desarrollo en pectina como fuente de carbono a pH 7 y 37°C.
- ★ Las mixobacterias y citofagas presentaron actividad exopectinolítica a partir de las 24 horas de incubación y un máximo a las 72 horas.
- ★ Las mixobacterias y citofagas poseen la capacidad para disminuir la viscosidad en más del 50% dentro de las primeras 24 horas de incubación la viscosidad de una solución de pectina.
- ★ El crecimiento y la actividad enzimática presentada en los sustratos orgánicos complejos pueden ser aprovechados para la extracción de enzima, no solo pectinolíticas, de mixobacterias y citofagas para una posterior aplicación industrial.

PERSPECTIVAS.

7. PERSPECTIVAS.

Las mixobacterias y citofagas son un grupo importante de bacterias del suelo que ayudan a mantener el equilibrio y la transformación de la materia orgánica por medio de la secreción de enzimas que desdoblan polisacáridos.

Las enzimas que hidrolizan polisacáridos tienen grandes aplicaciones en la industria principalmente en la alimentaria y farmacéutica y la mayoría de las enzimas comerciales son obtenidas de hongos. Sin embargo, existen bacterias que tienen la capacidad de producir las enzimas y las mixobacterias y citofagas llevan a cabo de forma natural en el ambiente la producción de estas enzimas por lo que en un futuro podrían representar una alternativa para la obtención de estas y así encontrar una posible aplicación biotecnológica.

Con los resultados obtenidos se observa que las mixobacterias y citofagas son capaces de llevar a cabo la secreción de las enzimas pectinolíticas, aunque la actividad enzimática presentada fue menor al ser comparada con la de referencia. Sin embargo, para mejorar las investigaciones posteriores en este tema se sugiere lo siguiente:

Llevar a cabo la identificación filogenética de las cepas aisladas por técnicas de biología molecular para poder tener un mayor y mejor conocimiento acerca de sus características de crecimiento, requerimientos nutricionales y la secreción de enzimas de interés comercial.

Realizar un análisis estadístico de las variables de crecimiento *in vitro* para obtener las condiciones de crecimiento óptimas en medio selectivo y en medio utilizando pectina como única fuente de carbono.

En las condiciones en las cuales se obtiene una mayor producción de enzima, determinar las condiciones óptimas de dichas enzimas, caracterizarlas bioquímicamente y así se podría determinar si existe una real competencia en la actividad enzimática con las enzimas comerciales en su mayoría provenientes de hongos.

Identificar el grupo de enzimas pectinolíticas producido por las mixobacterias y citofagas con diferentes y más específicos métodos; así como llevar a cabo la evaluación de la actividad *in situ*.

Evaluar el crecimiento en diferentes sustratos complejos, así como en desechos orgánicos sin un tratamiento previo, con el fin de evaluar el potencial hidrolítico que presenten y la producción de enzimas para una comparación con los procesos ya existentes utilizando enzimas comerciales.

REFERENCIAS.

8. REFERENCIAS.

1. Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. y Serra, J.L. **Industrial applications of pectic enzymes: a review.** *Process Biochemistry*. 1998. 33:1 (21-28).
2. Alvarez, A. **Evaluación de residuos de tamarindo como fuente de carbono para la producción de enzimas por cepas *Aspergillus*.** Tesis Licenciatura. 2005. Facultad de Química.
3. Bayer, A.E. **The cellulosomes: Multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides.** *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. 58 (521-554).
4. Barrios, E. **Soil biota, ecosystem services and land productivity.** *Ecological Economics*. 2007. 20 (1-17).
5. Bhat, M.K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology. Research review paper.** *Biotechnology Advances*. 2000. 18 (355-383).
6. Carrera, J.E. **Producción y aplicación de enzimas industriales.** Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2003. 1:1 (10-15).
7. Bajpai, P. **Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry.** *Biotechnol. Prog.* 1999. 15 (147-157).
8. Bradford, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding.** *Analytical Biochem.* 1976. 72 (248-254).
9. Carpita, C.N. **Structure and biogenesis of the cell wall of grasses.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. 47 (445-476).
10. Cosgrove J.D. **Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997. 13 (171-201).
11. Chambers, J. **Waste Management: Fruits and vegetables.** Wiley Encyclopedia of food science and technology. 2a ed. Wiley Interscience Publication. USA. 2000. (2609-2613)
12. Cherry, J.R. y Fidantsef, A.L. **Directed evolution of industrial enzymes: an update.** *Current Opinion in Biotechnology*. 2003. 14 (438-443).
13. Collmer, A., Ried, J.L. y Mount, M.S. **Assay Methods for Pectic Enzymes.** *Methods in Enzymology*. 1988. 161 (329-335).
14. De Vries, R.P. y Visser, J. ***Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001. 65:4 (497-522).
15. Dubey, S.K., Tripathi, A.K. y Upadilla, S.N. **Exploration of soil bacterial communities for their potencial as bioresource.** *Bioresource Technology*. 2006. 97 (2217-2224).

16. Dworkin, M. **Recent advances in the social and developmental biology of the Myxobacteria.** *Microbiological Reviews.* 1996. 60:1 (70–102).
17. Ekschmitt, K., Liub, M., Vettera, S., Foxa, O. y Woltersa, V. **Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter – why is dead organic matter left over in the soil?.** *Geoderma.* 2005. 128 (167-176).
18. Feoli. M., Gómez, Z. y Muñoz, A., **Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Magnifera indica*.** *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 1997. 26 (33-37).
19. Freitag, D.G. **The use of Effective Microorganisms (EM) in Organic Waste Management.** *Sustainable Community Development, L.L.C.* 2000. 1-5
20. Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, Stefan., Müller, R. **Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities- past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*.** *Journal of Biotechnology.* 2003. 106 (233–253).
21. Grigelmo-Miguel, N. y Belloso, M. **Characterization of dietary fiber from orange juice extraction.** *Food Research International.* 1999. 31:5 (355-361).
22. Grilione, P. L., Pangborn, J., **Scanning Electron Microscopy of Fruiting Body Formation by Myxobacteria.** *Journal of Bacteriology.* 1975. 124:3 (1558-1565).
23. Gummadi, S. N. y Panda, T. **Purification and biochemical properties of microbial pectinases- a review.** *Process Biochemistry.* 2003. 38 (987-996).
24. Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewar,R., Dahiya, N. y Beg, Q.K. **Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 59 (409–418).
25. Jayani, R.S., Saxena, S. y Gupta, R. **Microbial pectinolytic enzymes: A review.** *Process Biochemistry.* 2005. 40 (2931–2944).
26. Jia, Y., Molstad, L., Frostega, A., Aagaard, P., Breedveld, G.D. y Bakken, L.R. **Kinetics of microbial growth and degradation of organic substrates in subsoil as affected by an inhibitor, benzotriazole: Model based analyses of experimental results.** *Soil Biology and Biochemistry.* 2007. 39 (1597–1608).
27. Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. y Tewari, R. **Applications of pectinases in the commercial sector: a review.** *Bioresource Technology.* 2001. 77 (215-227).
28. Kimball, D., Parish, M.E. y Braddock, R. **Oranges and Tangerines.** Processing Fruits: Science and Technology. 2a ed. 2005. (617-621).
29. Kirk, J.L., Beaudettea, L.A., Hartb, M. y Moutoglisc, P. **Methods of studying soil microbial diversity. Review.** *Journal of Microbiological Methods.* 2004. 58 169-188.

30. Lanzarini, G. **Enzymes in the Fruit Juice Industry.** *Biotechnology applications in beverage production*, Cantarelli, C., Lanzarini, G. editor. Elsevier applied Food Science Series. Londres y New York. 1989. (189-207).
31. Mamma, D., Kourtoglou, E. y Christakopoulos, P. **Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry.** *Bioresource Technology*. 2007. 1. (1-11).
32. Miller, M.B. y Bassler, B.L. **Quórum Sensing in Bacteria.** *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. 55 (165–99).
33. Miller, G.L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar.** *Anal Chem.* 1959. 31 (426-428).
34. Minic, Z. y Jouanin, L. **Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation.** *Plant Physiology and Biochemistry* . 2006. 44 (435–449).
35. Mutlu, M., Sangolu, K., Demir, N., Ercan, M.T. y Acar, J. **The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity.** *Journal of Food Engineering*. 1999. 41 (147-150).
36. Olsson, L., Christensen, T., Hansen, K.P. y Palmqvist, E.A. **Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30.** *Enzyme and Microbial Technology*. 2003. 33 (612–619).
37. O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G. **Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. 55 (109–139).
38. Paul, E.A. **Dynamics of organic matter in soils.** *Plant and Soil*. 1984. 76 (275-285).
39. Pérez, S., Mazeau, K. y Hervé du Penhoat, C. **The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides.** *Plant Physiol. Biochem.* 2000, 38 (1/2), (37–55).
40. Pilnik, W. y Voragen, A.G.J. **Pectins.** *Food Polysaccharides and their Applications.* Stephen. A.M. editor. Marcel Dekker. 1995. (287-320).
41. Poll, C., Thiede, A., Werbter, N., Sessitsche, A. y Kandeler, E. **Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment.** *European Journal of Soil Science*. 2003. 54 (715-724).
42. Puchart, V., Katapodis, P., Biela, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, D., Macris, B.J. y Bhat, M. K. **Production of xylanases, mannases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*.** *Enzyme and Microbial Technology*. 1999. 24 (355-361).

43. Quiroga, R.G. **Impacto de la apertura comercial de México en el mercado mundial de la naranja.** Facultad de Economía, Universidad Autónoma de Nuevo León. 2001. (1-15)
44. Reddy, N. Yang, Y. **Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications.** *TRENDS in Biothechnology.* 2005. 23:1 (22-27).
45. Reichenbach H. **The ecology of the myxobacteria. Minireview.** *Environmental Microbiology.* 1999. 1:1 (15-21).
46. Reichenbach, H. **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotchnology.* 2001. 27 (149-156).
47. Reinchenbach, H. y Dworkin, M. **The Prokaryotes, the order myxobacterales.** Cap. 20. Col 1. Springer-Verlag. 1981.
48. Reinchenbach H. **The mixobacterias. In: The prokaryotes,** 2a edición. Vol IV. Springer-Verlag. New York. 1990. (3416-3487)
49. Romani, A.M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C. y Tranvik, L.J. **Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter : differential extracellular enzyme activities.** *Ecology.* 2006. 87:10 (2559-2569).
50. Root, W.H. y Barret, D.M. **Apples and Apple Processing.** Processing Fruits: Science and Technology. 2a ed. 2005 (455-461).
51. Ryner, C. **Waste management and resource recovery.** 1995. *Environmental Studies.* CRC Press.
52. Schürmann, C. **Growth of Myxococci in Suspension in Liquid Media.** *Applied Microbiology.* 1967. (971-974).
53. Shimkets, L.J. **Intercellular Signaling During Fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1999. 53 (525-49).
54. Shimkets, L.J. **Social and Developmental Biology of the Myxobacteria.** *Microbiological Reviews.* 1990. 54:4 (473-501).
55. Soriano, M. **Análisis se sistemas pectinolíticos bacterianos. aislamiento y caracterización de las pectinasas. PelA de *Paenibacillus sp.* BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*.** Tesis Doctorado. Universidad de Barcelona. Barcelona. pág 49-55, 81-84.
56. Sterling, C. **Cristal-structure of Ruthenium Red and Stereochemistry of its Pectic Stain.** *Ammer. J. Bot.* 1970. 57:2 (172-175).
57. Stanier, R.Y., **Studies on the Cytophagas.** *Journal of Bacteriology.* 1940. 40 (619-634).
58. Taylor, A. J. **Enzymes in the food industry.** *Enzymes in Food Processing.* 1991 (23-33).

59. Trevors, J. T. **Bacterial Biodiversity in Soil with an Emphasis on Chemically Contaminated Soils.** *Water, Air, and Soil Pollution.* 1998. 101 (45-67).
60. Tsuyumu, S., Ishii, S. y Nakamura, M. **Plate Assay for Differentiation of Different Pectinases.** *Agric. Biol. Chem.* 1989. 53:9 (2509-2511).
61. Underkofler, L.A., Barton, R.R., Rennert, S.S. **Production of microbial enzymes and their applications.** *Microbiological Process Report.* 1957. 6 (212-221).
62. Von Bodman S. B., Bauer, D. y Coplin D.L. **Quorum Sensing in Plant-Pathogenic Bacteria.** *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. 41 (455–82).
63. Waid, J.S. **Biological and biochemical analysis of soils.** *Plant and Soil.* 1984. 76 (127-137).
64. Waldron, K.W, Parker, M.L y Smith, A.C. **Plant Cell Walls and Food Quality.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2003. 2 (128-146).
65. Wattanapinyo, A. **Environmental performance of Agro-Industry in Thailand: Fruit-vegetable Case Studies.** 2003. (1-20)
66. Willats, W., Knox, J. y Mikkelsen, J.D. **Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel.** *Trends in Food Science and Technology.* 2006. 17 (97-104).
67. Wolfgang, D. **Biology and global distribution of myxobacteria in soils.** *Microbiology Reviews.* 2000. 24 (403-427).
68. Wolgemuth, Ch. y Hoiczyk, E., **How Myxobacteria Glide.** *Current Biology.* 2002. 12 (369–377).
69. Yu, R. y Kaiser, D., **Gliding motility and polarized slime secretion.** *Molecular Microbiology.* 2007. 63:2 (454-467).
70. Zhang-Cai, Y., Bing, W., Yue-Zhong, L., Xung, G., Huai-Qiang, Z y Pei-Ji, G. **Morphologies and Phylogenetic Classification of Cellulolytic Myxobacteria.** *Systematic and Applied Microbiology.* 2003. 26 (104-109).

Referencias electrónicas.

- ❖ http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2004/09/02/108242.php Julio 2007
- ❖ http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2006/11/09/157115.php Julio 2007

ANEXOS.

9. ANEXOS.

Composición de los medios empleados.

1. Solución de elementos traza.

Para preparar un litro del medio mineral se disolvieron en agua estéril las siguientes sales:

Micronutrientes	Peso (g)	Volumen final	Concentración [g/mL]
H ₃ BO ₄	2.86	100	0.0286
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.181	100	0.0018
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222	100	0.0022
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.191	100	0.0019
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	100	0.00079
Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0.0494	100	0.00049

Macronutrientes	Peso (g)	Volumen final	Concentración [g/mL]
NH ₄ SO ₄	20	100	0.2
K ₂ HPO ₄	3.9	100	0.039
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.5	100	0.075
Na ₂ CO ₃	2	100	0.020
EDTA	0.1	100	0.010
Citrato de sodio	0.6	100	0.060
FeSO ₄	0.3	100	0.030

Debido a que las sales se precipitan si se esterilizan por calentamiento su preparación debe de llevarse a cabo en condiciones asépticas.

2. Agar CY. Para mantenimiento de mixobacterias.

Componente	Concentración
Peptona de caseína	0.3%
Extracto de levadura	0.1%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1%
Agar bacteriológico	1.5%

pH ajustado a 7.2 y se esteriliza a 121°C por 15min.

3. Medio líquido con pectina cítrica (Sigma) 1% (p/v).

Componente	Concentración
Pectina	1%
Agua estéril	50%.
Medio mineral	50%
Cicloheximida	200µg/mL

La pectina se disuelve primero en agua estéril calentando ligeramente, cuidando que no pase la temperatura más de 60°C, una vez disuelta y a temperatura ambiente se agrega el medio mineral y la cicloheximida para evitar el crecimiento de hongos.

4. Buffer de fosfatos pH=7 [0.1M] y buffer de acetatos pH=5 [0.1M].

a) Buffer de fosfatos.

pH	Na ₂ HPO ₄ [1M]	NaH ₂ PO ₄ [1M]
7	57.7mL	42.3mL

Mezclar los volúmenes indicados para tener una solución stock 1M; diluir con agua destilada a 1000mL para preparar una solución 0.1M.

b) Buffer de acetatos.

Solución A. tomar 1.2mL de ácido acético y llevarlos a 100mL con agua destilada.

Solución B. disolver 2.7g de acetato de sodio en 100mL de agua.

Tomar 2.16mL de la solución A y 8.71mL de la solución de B y aforar a 100mL.

5. Medio líquido con pectina cítrica (Sigma) 1% (p/v). con promotor de crecimiento (extracto de levadura).

Componente	Concentración
Pectina	1%
Agua estéril	50%.
Medio mineral	50%
Cicloheximida	200µg/mL
Extracto de levadura	0.01%

Se disuelve el extracto de levadura en el agua estéril y se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente.

6. Reactivo DNS.

Reactivo	Peso (g)
NaOH [0.35M]	1.4
Ácido 3,5-dinitrosalicílico. (DNS)	0.75
Tartrato de sodio y potasio	10
Fenol.	0.54
Metabisulfito de sodio	0.59

Las cantidades indicadas en la tabla son para preparar 100mL del reactivo.

Primero se disuelve NaOH en 20mL de agua, con agitación; aparte se disuelve el DNS en no más de 40mL de agua; ya disuelto se agrega a la solución de NaOH, seguir agitando (la solución pasa de un color amarillo a naranja). Adicionar los siguientes reactivos en ese orden, esperar a que se disuelvan perfectamente para agregar el siguiente. Ya disueltos todos los reactivos, aforar a 100mL con agua destilada. Mantener en un frasco ámbar.

Método DNS de cuantificación de azúcares reductores.

A la mezcla de reacción se adicionan 2mL del reactivo DNS; se calienta en un baño de agua en ebullición por 5 minutos; al término se añadieron 5mL de H₂O destilada y se leyó a una $\lambda=575\text{nm}$. Se cuantificaron los azúcares reductores liberados utilizando una curva patrón de ácido galacturónico (entre 0.1 y 1mg/mL).

7. Soluciones para geles de poliacrilamida.

Solución	
1. Solución Bis-acrilamida (0.8:30)	-30% (p/v) Acrilamida -0.8% (p/v) Bisacrilamida. -Ajustar el volumen final con agua destilada. -Filtrar y guardar a 4°C protegido de la luz.
2. Tris-HCl pH=6.8 [0.5M] (4x)	Pesar 6.055g Tris. Agregar 50mL de agua destilada Ajustar pH 6.8 con HCl Ajustar volumen final y filtrar. Guardar a temperatura ambiente.
3. Tris-HCl pH=8.8 [3M] (8x)	Pesar 36.33g Tris. Agregar 50mL de agua destilada Ajustar pH 8.8 con HCl Ajustar volumen final y filtrar. Guardar a temperatura ambiente.
4. SDS 10%	Pesar 10g SDS Disolver en 50mL de agua destilada. Aforar al volumen final de 100mL con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
6. Persulfato de amonio al 10%. (APS) (Bio-Rad)	Pesar 0.1g. Llevarlo a 1mL de agua destilada. Guardar a 4°C por no más de 7 días.
7. Buffer de muestra (2x)	Tomar: 5mL solución 1. 8mL solución 2. 4.59mL Glicerol 87%. 2mL β -mercaptoetanol 40mg Azul de bromofenol (2mg/mL) *Para buffer 1x diluir al 50% con agua destilada. *Si no es necesario no agregar colorante.
8. Solución Teñidora.	0.125(p/v) Azul de Coomassie R-250 50%(p/v) Metanol. 10%(p/v) ácido acético glacial. Ajustar volumen con agua destilada.
9. Solución Desteñidora.	40% (p/v) Metanol. 7.0%(p/v) ácido acético glacial. 530mL agua destilada.

8. Composición de geles de poliacrilamida.

a) Gel de separación. 10%

Solución Bis-acrilamida (0.8:30)	3.15mL
Tris-HCl pH=8.8 [3M] (8x)	2.32mL
SDS 10%	94.5µL
Agua destilada.	3.75mL
Persulfato de Amonio al 10%. (APS)	150µL
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad)	10µL

b) Gel de empaquetamiento. 5%

Solución Bis-acrilamida (0.8:30)	1.7mL
Tris-HCl pH=6.8 [0.5M] (4x)	2.5mL
SDS 10%	100µL
Agua destilada.	5.7mL
Persulfato de Amonio al 10%. (APS)	75µL
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) (Bio-Rad)	5µL

9. Marcador pesos moleculares. Dalton Mark VII-L (Sigma).

Proteína	Da
Albumina sérica bovina	66,000
Ovoalbumina	45,000
Pepsina	34,700
Tripsinógeno tratado PMSF	24,000
B-Lactoalbumina	18,400
Lisozima	14,300

10. Pruebas bioquímicas.

10.1 Pruebas de fermentación de carbohidratos.

El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal.

Los polisacáridos son demasiado complejos para penetrar en una célula bacteriana para su degradación. Primero son catabolizados a monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares para que puedan ser incorporados al interior de la célula.

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son: a) ácido láctico, b) ácidos acéticos y fórmicos, c) ácido láctico y alcohol etílico (etanol), d) etanol, e) acetilmetilcarbinol (acetoina) y CO₂ y h) ácido butírico a alcohol butílico (butanol).

Sacarosa $\xrightarrow{\text{invertasa}}$ glucosa + fructosa

Lactosa $\xrightarrow{\beta\text{-galactosidasa}}$ galactosa + glucosa

Glucosa $\xrightarrow{\text{hexocinasa}}$ ácidos orgánicos (aldehídos, alcoholes, CO₂, H₂, energía)

Caldo rojo de fenol como indicador de pH.

Ingredientes pH 7.4 ± 0.2	Concentración
Peptona	10g
Extracto de carne (optativo)	1g
Cloruro de sodio NaCl	5g
Rojo de Fenol	0.0018g
Agua desionizada	1000 mL
Carbohidrato	0.5% (5g/L)

Se esteriliza el medio en el autoclave a 121°C, 15lb, 15 min.

Rojo de fenol como indicador de pH:

- ácido: color amarillo pH 6.8
- Alcalino: color rosado rojo, pH 8.4

Las pruebas de fermentación de hidratos de carbono pueden utilizarse para determinar qué productos finales se han formado pero no las vías metabólicas utilizadas.

El indicador de pH utilizado es el rojo de fenol, ya que la mayoría de los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son ácidos orgánicos. Con el rojo de fenol, el cambio ocurre cerca del pH original del medio (pH ácido 6.8: medio pH 7.4).

La peptona en el medio también es degradada por las especies bacterianas y produce sustancias alcalinas.

Para realizar esta prueba se necesitan tubos con campanas Durhman. En condiciones de asepsia tomar una asada del microorganismo e inocular cada uno de los tubos. Incubar a 37°C durante 24 horas. Se identifican los siguientes cambios:

A. Producción de ácido por la degradación de carbohidratos, vire del color del medio a color amarillo, pH 6.8

(G). Positivo para la producción de gas.

Negativo (-). No se utilizó el carbohidrato, se utilizaron las peptonas y hubo producción de amoniaco y aminas.

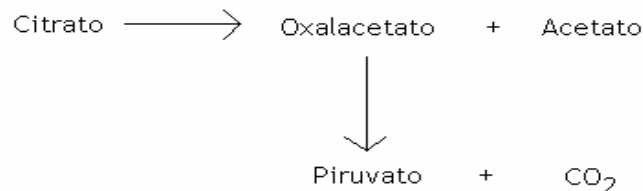
SC. Sin cambio en el medio, no se llevo a cabo la utilización de carbohidratos.

10.2 Citrato.

En esta prueba se puede determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, por ello se provoca una alcalinización del medio.

Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons, el cual contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul

de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que logran multiplicarse en este medio, son aquellas capaces de metabolizar el citrato, y al hacerlo liberan iones amonio. Esta liberación de iones básicos, junto con la combinación del citrato, generará una fuerte alcalinidad del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.



Ingredientes pH 6.9±0.2	Concentración
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.2g
Monofosfato de amonio (NH ₄)H ₂ PO ₄	1g
Fosfato dipotasico (K ₂ HPO ₄)	1g
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	2g
Azul de Bromotimol	0.08g
Cloruro de sodio NaCl	5g
Agar	15-20g
Agua desionizada	1000mL

Se esteriliza el medio en el autoclave a 121°C, 15lb, 15 min. Dejar que el medio solidifique en posición inclinada.

Se inocula el microorganismo por estría solo en el pico de flauta. Se incuban los tubos a 37°C de 24-48 h.

Interpretación:

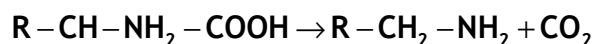
Positivo (+): crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.

Negativo (-): ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color verde.

10.3 LIA (Agar Hierro Lisina)

Determinar la capacidad enzimática del microorganismo de descarboxilar o desaminar la lisina.

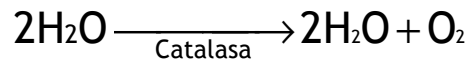
La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan los aminoácidos en su carboxilo terminal (COOH) para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono.



Aminoácido → Amina + Dióxido de carbono

10.4 Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa, es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células bacterianas.



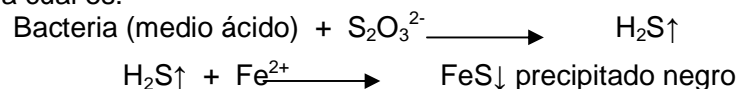
En una caja petri con agar nutritivo, se siembra por estría recta el microorganismo, se invierten las cajas e incuban a 37°C durante 24 horas. Se agregan unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre el desarrollo microbiano. Una rápida efervescencia indica la producción de oxígeno gaseoso y una prueba positiva.

10.5 Agar Hierro Kligler.

En este medio se pueden varias condiciones enzimáticas de las bacterias. Este compuesto principalmente por dos azúcares en distinta proporción, glucosa al 0.1% y lactosa al 1%, además este medio contiene tiosulfato sódico, citrato férrico y rojo de fenol como indicador de pH. Para estudiar el comportamiento de las bacterias en aerobiosis y anaerobiosis, la siembra en este cultivo se deberá realizar tanto en la superficie del agar, como en la profundidad del mismo.

La información que nos proporciona este medio es la siguiente:

- **Fermentación de la glucosa:** se presenta un viraje a color amarillo en el fondo. Si las bacterias fermentan solo la glucosa, en la superficie la utilizará por vía respiratoria, donde la tensión de oxígeno disminuye lo suficiente, empleará una pequeña porción por la vía fermentativa. Esto producirá una pequeña cantidad de ácidos que serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas, por lo que el medio mantendrá su color rojo en la superficie, al no haber cambio de pH. En el caso contrario, las bacterias crecidas en la profundidad emplearán desde el principio la glucosa por la vía fermentativa, produciendo ácidos que no serán neutralizados, provocando un descenso del pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo.
- **Fermentación de lactosa:** presencia de viraje a color amarillo en la superficie. Si las bacterias fermentan la lactosa, los ácidos producidos modifican el pH de la superficie del medio. En este caso las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa. Por lo que el color del medio en la superficie cambiara a amarillo.
- **No- fermentación de los azúcares:** Si la bacteria es aerobia estricta, el medio permanecerá de color rojo. En este caso, los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO₂, que se elimina y no modifica el pH.
- **Producción de gas en la fermentación:** aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo.
- **Producción de ácido sulfhídrico:** ocurre la misma reacción que en la prueba de SIM, la cual es:



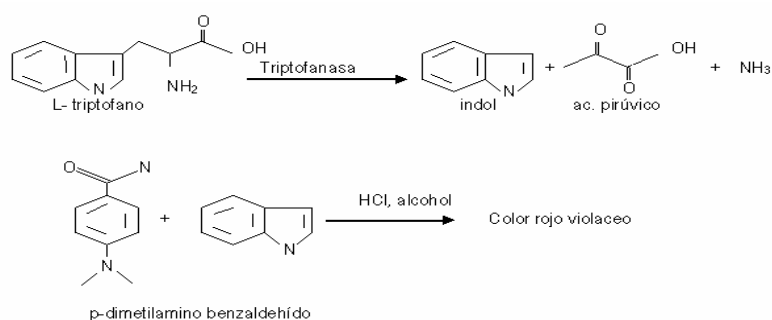
10.6 Indol.

Aquí se puede observar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual es capaz de degradar el amonioácido triptofano a indol, que es el compuesto que se detecta en este ensayo. Para realizar esta prueba es necesario que la bacteria se cultive durante 24 – 48 horas en un caldo de triptona con NaCl al 0.5 % (este digerido de proteínas animales es especialmente rico en triptófano). Para la posterior detección del indol se utiliza el reactivo de Kovacs que se puede preparar utilizando la siguiente formulación:

Componente	Concentración
Alcohol amílico o isoamílico (o alcohol butírico)	150 ml
p- dimetilamino-benzaldehído	10 g
HCl concentrado	50 ml

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol, agregando después lentamente a esta mezcla el ácido. Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir al medio 5 gotas del reactivo de Kovacs, se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, la prueba se considera completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo inclinado sino en una porción de unos 2 ml que se retira de él asépticamente.

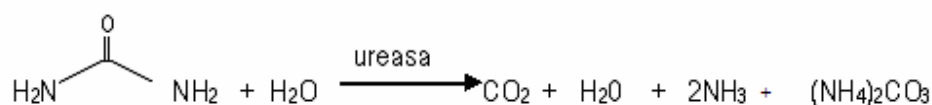
La reacción presente en esta prueba es la siguiente:



10.7 Urea.

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa.

Se cultiva el microorganismo en slant en agar urea de Christensen. Este medio se complementa después del autoclavado con 50ml/l de urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa.

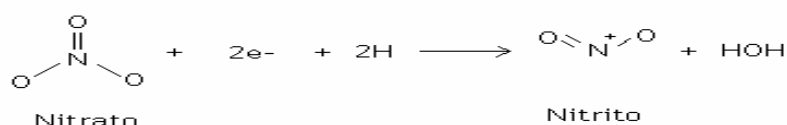


10.8 Reducción de nitratos.

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno (N_2), tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo realiza su respiración con el nitrato, el que sirve como aceptor de electrones. La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculas aceptoras específicas. A través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.

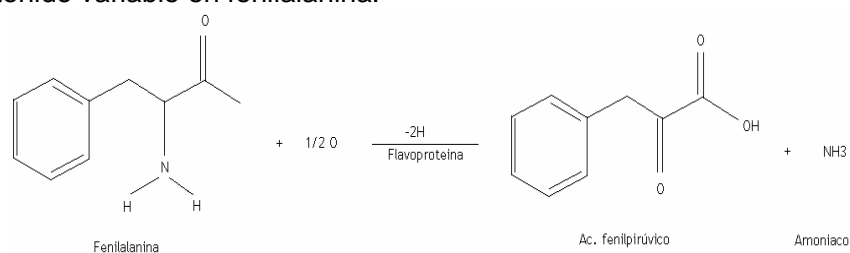
Esta reacción se revela mediante dos reactivos. Reactivo A (α -naftilamina y ácido acético 5N) más el reactivo B (ácido sulfanílico y ácido acético 5N). Un resultado positivo lo da un color rojo, que indica la presencia de nitritos. La ausencia de color después de haber adicionado los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrógeno molecular (desnitrificación). Dado que los reactivos detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas.

Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un color rojo tras adicionar el polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera, pero si no aparece el color rojo tras haber adicionado el polvo de zinc confirma la prueba positiva.



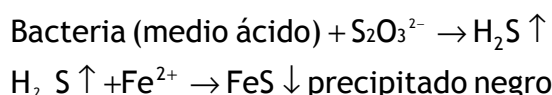
10.9 Fenilalanina desaminasa.

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. La prueba se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para esto se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico que indica reacción positiva. El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina.



10.10 Medio SIM.

Producción de ácido sulfhídrico: En esta prueba se observa un precipitado de color negro en el fondo del tubo. Algunas especies respiradoras anoxibiónticas son capaces de emplear el tiosulfato sódico como aceptor final de electrones en la cadena transportadora. Por lo que este compuesto se reduce a ácido sulfhídrico, que a su vez reacciona con el hierro (Fe^{2+}) presente en el medio formando un precipitado negro de sulfuro de hierro. Los iones Fe^{2+} produciendo los iones Fe^{3+} del citrato férrico y aparecen debido a los cambios en los potenciales redox producidos al someter al autoclave el medio de cultivo. La reacción presente es la siguiente:



Prueba de la movilidad: Está prueba nos ayuda a determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio SIM permite que esta prueba se realice, gracias a ser un medio semisólido, ya que presenta solamente 3.5 g/l de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por lo contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron.

10.11 Degradación de polímeros (agar, almidón, gelatina, pectina y quitina)

La hidrólisis de los polisacáridos son ensayos ampliamente utilizados en la identificación y caracterización de microorganismos.

En condiciones de asepsia, se toma una asada del cultivo fresco (24 horas de incubación), se siembra por estría recta empezando por el borde de la caja que contienen cada uno de los polímeros. Invertir las cajas e incubar a 37°C durante 3 días.

Degradación de almidón: se cubre la superficie de la caja con solución de lugol, observar la coloración que se produce al reaccionar el almidón del medio con el lugol, las zonas transparentes son indicativos de la degradación del polisacárido.

Degradación de gelatina: determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinazas) que licúan o hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. Si el microorganismo lleva a cabo la hidrólisis de la gelatina el medio presenta licuefacción; sino permanece sólido.