



Growth of soil lipolitic microorganisms in different culture media with vegetal oil

Crecimiento de microorganismos lipolíticos del suelo en diferentes medios de cultivo adicionados con aceite vegetal

Leobardo Iracheta-Donjuan*, Ana Laura Reyes-Reyes, Elizabeth Hernández-Gómez, Pablo López-Gómez, Leiver Alexander Cruz-López, Ana Odeth Quintana-Escobar
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Rosario Izapa. Carretera Tapachula-Cacahoatán km 18. Tuxtla Chico Chiapas, México.

*iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

ABSTRACT

Specific culture media are used for lipolytic fungi and bacteria growth. It is possible that more complex culture media, used for plant tissue culture, allows a higher expression of fungi and bacteria growth. The aim was to evaluate the effect of the addition of vegetable oil in different culture media for micropropagation, on growth of fungi and bacteria from soil samples. Ten soil samples from different sites in Chiapas, two types of culture media (MS con 1.48 mg/L TDZ y 1 mg/L AIB; Yasuda con 1.25 mg/L KIN y 1 mg/L AIB) and the presence or absence of olive oil (1 %) in the culture media were evaluated. Expression of fungi and bacteria was significantly affected by at least two factors evaluated. The factor soil sample led fungal expression percentages from 47.5 to 100 %, while in bacteria was from 95 to 100 %. The presence of olive oil favored fungal expression (94.5 %). Both culture media allowed the growth of microorganisms. The factor vegetable oil promoted 94.5 % of fungi expression and 99.5 % of bacteria. It was found more diversity on fungi expression compared to bacteria. Differences in microorganisms growth were mainly due to the soil sample.

Keywords: biofuels, biodiesel, enzymes, *Jatropha curcas*.

RESUMEN

Para el crecimiento de hongos y bacterias lipolíticas se utilizan medios de cultivo específicos. Es posible que medios más complejos, utilizados para el cultivo de tejidos vegetales, permitan una mayor expresión del crecimiento de hongos y bacterias. El objetivo fue evaluar el efecto del aceite vegetal, en diferentes medios de cultivo para micropropagación, en el crecimiento de hongos y bacterias provenientes de muestras de suelo. Se evaluaron 10 muestras de suelo de diferentes sitios del estado de Chiapas, dos tipos de medio de cultivo (MS con 1.48 mg/L TDZ y 1 mg/L AIB; Yasuda con 1.25 mg/L KIN y 1 mg/L AIB) y presencia o ausencia de aceite de oliva (1 %) en el medio de cultivo.

La expresión de hongos y bacterias fue afectada por dos de los factores evaluados. El factor muestra de suelo propició porcentajes de expresión de hongos de 47.5 a 100 %, mientras que en bacterias fue de 95 a 100 %. El factor aceite de oliva favoreció un 94.5 % la expresión de hongos y 99.5 % de bacterias. Se observó mayor diversidad de hongos que bacterias. Las diferencias en el crecimiento de microorganismos se debieron principalmente a la muestra de suelo.

Palabras clave: biocombustibles, biodiesel, enzimas, *Jatropha curcas*

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos utilizados para la obtención de bioenergéticos presentan diversos problemas técnicos. Entre los cuales se encuentran el uso de catalizadores alcalinos y ácidos, los cuales repercuten en la calidad del biocombustible, así como el uso de catalizadores enzimáticos que incrementan los costos del proceso (Zheng *et al.*, 2006). Por ello se ha planteado como alternativa la identificación y selección de microorganismos con capacidad lipolítica, que a su vez puedan ser integrados al proceso de producción y contribuyan a optimizar la obtención de biodiesel y aprovechamiento de subproductos de mejor calidad y bajos costos de producción (Khan, 2012).

Jatropha curcas Linneo. (*J. curcas* L.) es una especie arbórea cuyo cultivo tiene potencial bioenergético para la producción de biodiesel. El biodiesel es el producto de la reacción de un aceite vegetal con un alcohol, en presencia ya sea de catalizadores alcalinos, ácidos o enzimáticos. Existe una gran diversidad de microorganismos productores de enzimas lipolíticas en el suelo que permiten la transesterificación de aceite para la producción de biodiesel (Fjerbaek *et al.*, 2009); sin embargo, se desconocen aquellos microorganismos asociados naturalmente a *J. curcas*, así como los medios de cultivo que promuevan el crecimiento de una gran diversidad de los mismos (Matthys, 2013). Para el crecimiento de microorganismos se utilizan medios específicos como el papa dextrosa agar (hongos) y el agar nutritivo (bacterias), pero es posible que medios de cultivo más complejos, como los usados para el cultivo de tejidos vegetales de *J. curcas* o *Coffea canephora*, permitan mayor expresión del crecimiento. El objetivo consistió en evaluar el efecto de la adición del aceite vegetal en diferentes medios de cultivo para micropropagación, en el crecimiento de hongos y bacterias provenientes de muestras de suelo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se utilizaron diez muestras de suelo de diferente sitio de colecta: 1) Chiapa de Corzo, 2) Villaflores, 3) El Triunfo, 4) Charco Encendido, 5) Río Florido, 6) Buenos Aires, 7) Huehuetán, 8) Pijijiapan, 9) Cacahoatán, 10) Tuxtla Chico; dichas muestras de suelo con microorganismos se almacenaron por aproximadamente seis meses a temperatura de -82 °C. Se realizaron diluciones de 1 g de cada muestra de suelo en 10 mL de agua destilada esterilizada. Las diluciones obtenidas fueron filtradas en matraces Erlenmeyer de 50 ml con embudos y gasas estériles (Protec®) de 10 x 10 cm.

Se utilizaron dos medios de cultivo semisólido: a) sales MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 1.48 mg/L de thidiazuron (TDZ) Sigma® y 1 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) Sigma®; b) sales Yasuda (Yasuda, 1985) con 1.25 mg/L de kinetina (KIN) Sigma® y 1 mg/L de AIB. Ambos fueron esterilizados en autoclave a 1.1 kg/cm² de presión y 121 ± 1° C durante 20 minutos y vertidos en placas Petri de 60 x 15 mm (10 mL de medio por placa).

Se establecieron 40 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, producto de la combinación de 10 muestras de suelo de diferentes sitios de colecta en el estado de Chiapas, dos tipos de medio de cultivo (MS y Yasuda) y presencia o ausencia de aceite de oliva (1 %) en el medio de cultivo. La unidad experimental fue una caja Petri con los medios de cultivo antes mencionados y 100 µL de inóculo del filtrado de cada tipo de suelo, con un promedio general de unidades formadoras de colonias de 23900 UFC/ml. La inoculación y siembra en placa se realizó por dispersión con espátula de vidrio. Los tratamientos fueron incubados durante 28 días en condiciones de oscuridad a 26 °C. Se evaluó la presencia o ausencia de microorganismos (hongos o bacterias) y el color de las colonias fue registrado. Después, se identificaron las repeticiones con los diferentes hongos y bacterias encontrados, a las cuales se adicionaron aproximadamente 2 mL de aceite de oliva hasta cubrir por completo las colonias, con la finalidad de detectar aquellos microorganismos con capacidad lipolítica. Posteriormente, se seleccionaron los hongos y bacterias capaces de crecer sobre el aceite y se asilaron en dos medios de cultivo selectivos para microorganismos lipolíticos: 1) LB con rodamina y aceite de oliva y 2) azul de nilo con trioleína; los cuales, fueron observados con luz ultravioleta (UV) para detectar la degradación lipolítica.

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias de los datos por Tukey o LSD con un nivel de significancia de $\underline{P} \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS System for Windows 9.0 (USA).

3. RESULTADOS

Las muestras de suelo colectadas en distintos sitios, presentaron diferencias significativas para los 40 tratamientos a los 3 d después del establecimiento. Los porcentajes de expresión de bacteria oscilaron en un rango general entre 70 y 100 % en la mayoría de los tratamientos (Tabla 1); sin embargo, el rango general del porcentaje de expresión de hongos, presentó mayor variación entre tratamientos (0 a 100 %). En los tratamientos 13 y 14, con la muestra procedente de Huehuetán Pueblo en sales MS, no hubo crecimiento de hongos a los 3 d. Por otro lado, los tratamientos correspondientes a las muestras de Charco Encendido y Buenos Aires (T 7, 8, 27, 28, 11, 12, 31 y 32), independientemente del tipo de medio de cultivo y adición de aceite, originaron porcentajes de expresión de hongos que van del 10 al 40 %. En el caso de los tratamientos 15 y 16, con muestra de Pijijiapan, tuvieron menores porcentajes de expresión de hongos en el medio MS (30 a 40 %) en comparación con el medio Yasuda (70 a 80 %). De igual forma, los tratamientos 2, 4, 6, 19, y 33 fueron los que presentaron bajos porcentajes de crecimiento de hongos (20 a 40 %). Cabe mencionar, que al inicio, a los 3 d después de la inoculación, sólo el tratamiento 30

(Río Florido en sales Yasuda con aceite), propició hasta el 100 % de expresión de hongos. Para los tratamientos restantes se observó la aparición de hongos de 50 a 90 % (Tabla 1).

En relación a las muestras de suelo, a los 3 d después de la inoculación, los porcentajes de expresión de hongo más bajos fueron los de las muestras 7) Huehuetán Pueblo, 4) Charco Encendido y 6) Buenos Aires Mazatán, mientras que el valor más alto en esa fecha fue de 90 %, de la muestra 5) Río Florido; sin embargo, a los 14 d se registraron valores máximos de 90 a 100 % en nueve de las 10 muestras de suelo (Fig. 1), a excepción de la muestra 7) Huehuetán Pueblo, donde el máximo porcentaje de hongos fue de 47.5 % (Fig. 1). A partir de los 14 d en adelante, el crecimiento de hongos se mantuvo constante.

Tabla 1. Expresión de microorganismos (%) en medios de cultivo utilizados para micropropagación vegetal, de diferentes muestras de suelo de *J. curcas* a los 3 d después de la siembra.

	Tratamientos	Tipo de microorganismo	
		Hongo (%)	Bacteria (%)
1	Chiapa de Corzo/MS/Sin	90 ab	100 a
2	Chiapa de Corzo/MS/Con	40 abcd	100 a
3	Villaflores/MS/Sin	70 abcd	100 a
4	Villaflores/MS/Con	30 abcd	90 ab
5	El Triunfo/MS/Sin	70 abcd	100 a
6	El Triunfo/MS/Con	30 abcd	100 a
7	Charco Encendido/MS/Sin	30 abcd	100 a
8	Charco Encendido/MS/Con	10 cd	70 b
9	Rio Florido/MS/Sin	80 abc	90 ab
10	Rio Florido/MS/Con	90 aB	90 a
11	Buenos Aires Mazatán/MS/Sin	20 bcd	100 a
12	Buenos Aires Mazatán/MS/Con	10 cd	100 a
13	Huehuetán Pueblo/MS/Sin	0 d	100 a
14	Huehuetán Pueblo/MS/Con	0 d	100 a
15	Pijijiapan/MS/Sin	30 abcd	100 a
16	Pijijiapan/MS/Con	40 abcd	100 a
17	Cacahoatán/MS/Sin	80 abc	100 a
18	Cacahoatán/MS/Con	50 abcd	80 ab
19	Tuxtla Chico/MS/Sin	30 abcd	100 a
20	Tuxtla Chico/MS/Con	60 abcd	100 a
21	Chiapa de Corzo/Yasuda/Sin	70 abcd	70 b
22	Chiapa de Corzo/Yasuda/Con	90 ab	100 a
23	Villaflores/Yasuda/Sin	70 abcd	80 ab
24	Villaflores/Yasuda/Con	80 abc	100 a
25	El Triunfo/Yasuda/Sin	90 ab	100 a
26	El Triunfo/Yasuda/Con	70 abcd	100 a
27	Charco Encendido/Yasuda /Sin	40 abcd	100 a
28	Charco Encendido/Yasuda/Con	10 cd	100 a
29	Rio Florido/Yasuda/Sin	90 ab	100 a
30	Rio Florido/Yasuda/Con	100 a	100 a

31	Buenos Aires Mazatán/Yasuda/Sin	30 abcd	100 a
32	Buenos Aires Mazatán/Yasuda/Con	40 abcd	100 a
33	Huehuetán Pueblo/Yasuda/Sin	20 bcd	100 a
34	Huehuetán Pueblo/Yasuda/Con	50 abcd	100 a
35	Pijijiapan/Yasuda/Sin	80 abc	100 a
36	Pijijiapan/Yasuda/Con	70 abcd	100 a
37	Cacahoatán/Yasuda/Sin	80 abc	100 a
38	Cacahoatán/Yasuda/Con	60 abcd	100 a
39	Tuxtla Chico/Yasuda/Sin	90 ab	100 a
40	Tuxtla Chico/Yasuda/Con	90 ab	100 a
	C.V	14	4

[†]Medias con letras diferentes por columna presentan diferencias significativas Tukey ($P \leq 0.05$). C.V.= coeficiente de variación. Para el ANOVA, los datos fueron transformados previamente con la ecuación $\sqrt{(x+1)}$.

En el caso de las bacterias los porcentajes de expresión no fueron tan variados entre la media para cada tipo de suelo, como factor de efecto simple (Fig. 2); desde la primera fecha de evaluación (3 d), se obtuvieron porcentajes del 92 al 100 % en todas las muestras de suelo y estos valores se mantuvieron constantes hasta los 14 d, a partir de los cuales se observó un ligero crecimiento para las muestras 1) Chiapa de Corzo (de 92 a 95 %), 2) Villaflores (92 a 95 %), 4) Charco Encendido (92 a 100 %), y 9) Cacahoatán (92 a 95 %) (Fig. 2).

Por otra parte, de acuerdo al análisis factorial, para los 28 d después de la siembra, la expresión de hongos y bacterias fue afectada de forma significativa al menos por dos de los factores de estudio y sus niveles. El factor muestra de suelo propició porcentajes de expresión de hongos de 47.5 a 100 %, mientras que en bacterias fue de 95 a 100 %. Cabe mencionar que la muestra 3) El Triunfo y 9) Cacahoatán, propiciaron 100 % tanto de hongos como de bacterias. El medio de cultivo no propició diferencias en el crecimiento de hongos y bacterias; por lo que la composición en cuanto al tipo y cantidad de sales inorgánicas no fue un factor que determine el crecimiento de microorganismos provenientes de suelo. En cuanto a la adición de aceite de oliva, se encontraron diferencias significativas sólo para el porcentaje de expresión de hongos, donde la presencia de aceite indujo los valores más altos (94.5 %) para esta variable (Tabla 2).

El análisis de los cuadrados medios evidenció que el factor tipo de suelo, aceite de oliva y la combinación entre el aceite con el suelo y el medio, fueron los que aportaron mayor variación para la expresión y crecimiento de hongos, mientras que para la expresión de bacterias la mayor variación la aportó la interacción del medio de cultivo con aceite de oliva, sin aporte de variaciones por efecto simple de ningún factor (Tabla 3).

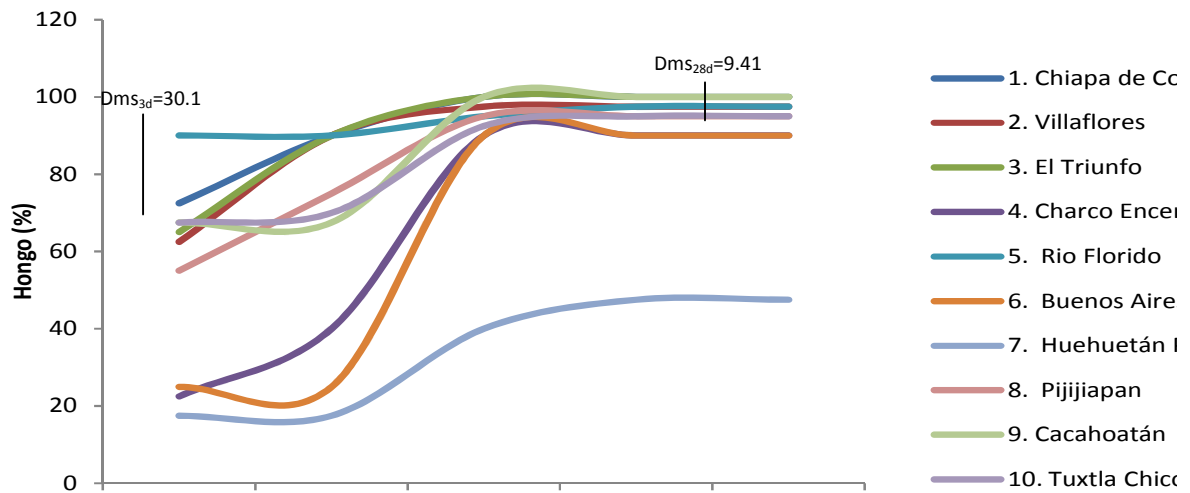


Fig. 1. Porcentaje de expresión de hongos durante 28 d en distintas muestras de suelo.

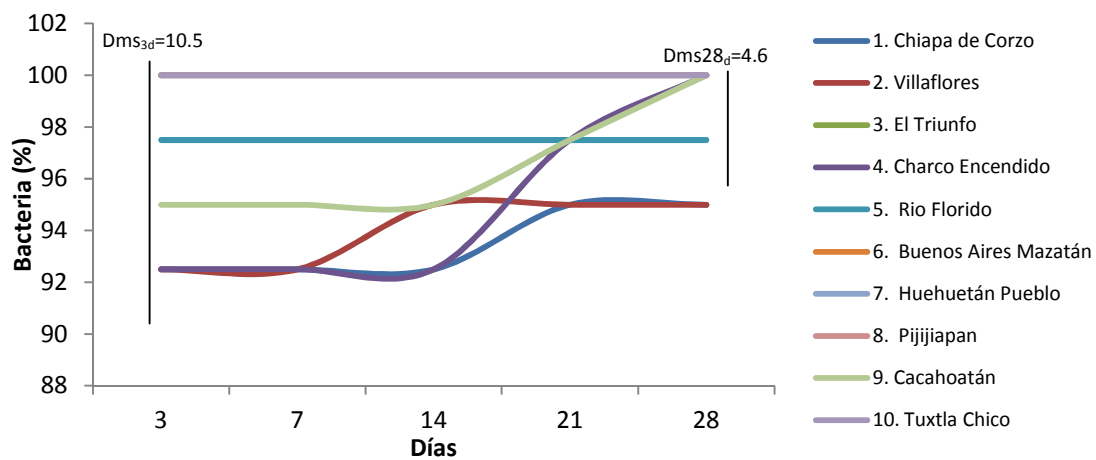


Fig. 2. Porcentaje de expresión de bacterias durante 28 d en distintas muestras de suelo.

Tabla 2. Efecto de la muestra de suelo, medio de cultivo y aceite en la expresión de hongos o bacterias. Datos a los 28 días después del establecimiento.

Factores de estudio	Hongo	Bacteria
Suelo		
1. Chiapa de Corzo	100.0 a	95.0 b
2. Villaflores	97.5 ab	95.0 b
3. El Triunfo	100.0 a	100.0 a
4. Charco Encendido	90.0 b	100.0 a
5. Rio Florido	97.5 ab	97.5 ab
6. Buenos Aires Mazatán	90.0 b	100.0 a
7. Huehuetán Pueblo	47.5 c	100.0 a
8. Pijijiapan	95.0 ab	100.0 a
9. Cacahoatán	100.0 a	100.0 a
10. Tuxtla Chico	95.0 ab	100.0 a
Medio		
MS	91.0 a	99.5 a
Yasuda	91.5 a	98.0 a
Aceite		
Sin	88.0 b	98.0 a
Con	94.5 a	99.5 a
CV	7.19	3.51

[†]Medias con letras iguales no presentan diferencias significativas LSD ($P \leq 0.05$). C.V.= coeficiente de variación. Para el ANOVA, los datos fueron transformados previamente con la ecuación $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 3. Cuadrados medios para la expresión de hongo o bacteria, con respecto a los factores de estudio y sus interacciones. Datos a los 28 días después de la siembra.

Fuente de variación	Hongo	Bacteria
Suelo	1.00 **	0.01 ns
Medio	0.00 ns	0.02 ns
Aceite	0.42 **	0.02 ns
Suelo*Medio	0.11 **	0.02 **
Medio*Aceite	0.42 **	0.06 **
Aceite*Suelo	0.45 **	0.02 **
Suelo*Medio*Aceite	0.05 ns	0.01 ns

*= Significativo ($P = 0.05$)

**= Altamente significativo ($P \leq 0.05$)

ns= No significativo ($P > 0.05$)

En las diferentes muestras de suelo fue posible apreciar 11 tipos de hongos diferentes en cuanto a su coloración a los 28 d después de la siembra (Fig. 3). Los colores fueron de

blanco (con crecimiento de micelio), al color negro (con presencia de estructuras sexuales). La mayor diversidad de hongos (los 11 tipos) se observó en las muestras 1) Chiapa de Corzo, 3) El Triunfo y 8) Pijijiapan; por el contrario, las muestras 2) Villaflores y 7) Huehuetán Pueblo propiciaron la menor expresión y diversidad de hongos, con sólo siete tipos de hongos. Invariablemente, los hongos blancos, amarillos y verdes se presentaron con mayor porcentaje en cada una de las muestras de suelo.

Fue posible detectar 10 tipos de bacterias según la coloración en las diferentes muestras de suelo. Las muestras cuatro (Charco Encendido) y siete (Huehuetán Pueblo) presentaron mayor diversidad con ocho y nueve tipos de bacterias, respectivamente. Por otro lado, las muestras 3) El Triunfo) y 5) Río Florido, propiciaron menor expresión y diversidad, con sólo cinco tipos. Las bacterias cremas, fueron las que se presentaron con mayor porcentaje en todas las muestras de suelo evaluadas, seguidas de las blancas y grises en la mayoría de los tipos de suelo, excepto en el caso de 9) Cacahoatán y 10) Tuxtla Chico (Fig. 4).

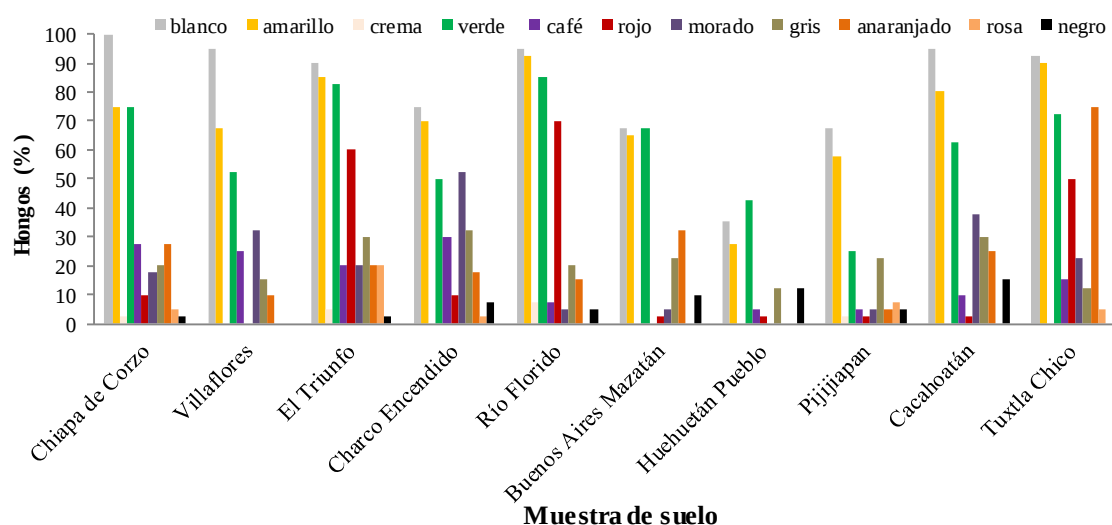


Fig. 3. Nivel de incidencia y diversidad de colores en hongos expresados *in vitro* en diez muestras de suelo a los 28 d después de la siembra.

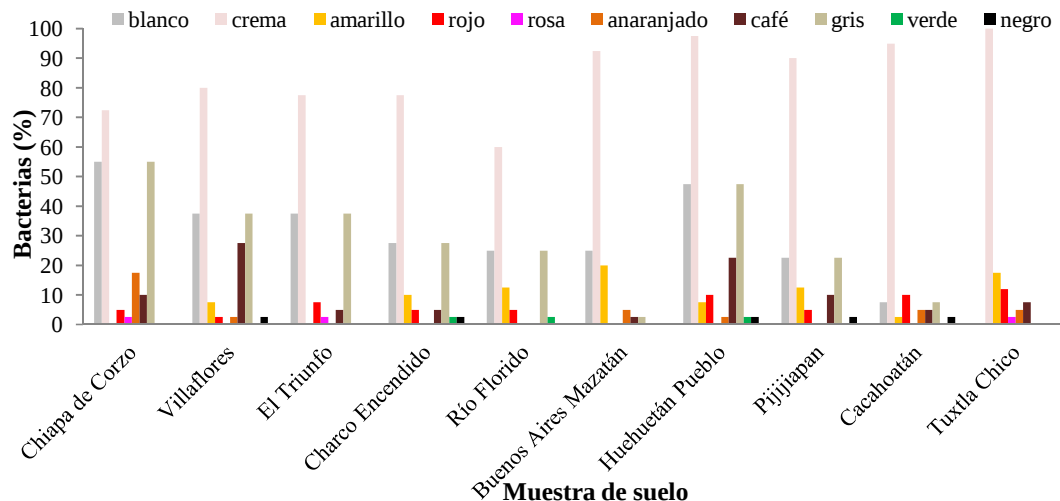


Fig. 4. Nivel de incidencia y diversidad de colores en bacterias expresadas *in vitro* en diez muestras de suelo a los 28 d después de la siembra.

Es posible observar diferencias notables en el tipo de muestra y lugar de procedencia en cuanto al porcentaje de expresión de microorganismos, de tal manera que la muestra colectada en Huehuetán Pueblo propició una mayor expresión de bacterias, pero una menor incidencia de hongos.

A los 28 d después de la inoculación fue posible observar gran cantidad de muestras con hongos en estadios de crecimiento micelial; los cuales se caracterizaron por la formación de colonias de apariencia algodonosa de color blanco. Sin embargo, también fueron observadas colonias de hongos con crecimiento acelerado, que les permitió formar estructuras reproductivas de colores verdosas y oscuras en tan sólo 28 d (Fig. 5). De igual forma, el crecimiento de los tipos de hongo o bacteria dependió del tipo de microorganismo, así como a la competencia asociada con la diversidad presente en cada placa.

Se detectaron dos tipos de hongos y un tipo de bacteria con la capacidad de continuar su crecimiento aún después de la saturación con aceite de oliva (Fig. 6 a), de los cuales, al ser asilados en medios selectivos de microorganismos lipolíticos y observados con luz ultravioleta, uno de los hongos blancos, presentó fluorescencia en el medio LB (Fig. 6 b); lo cual podría indicar cierta actividad lipolítica; sin embargo, aun se requieren pruebas posteriores para confirmar dicha capacidad, así como llevar a cabo la identificación del hongo en cuestión (Fig. 6).

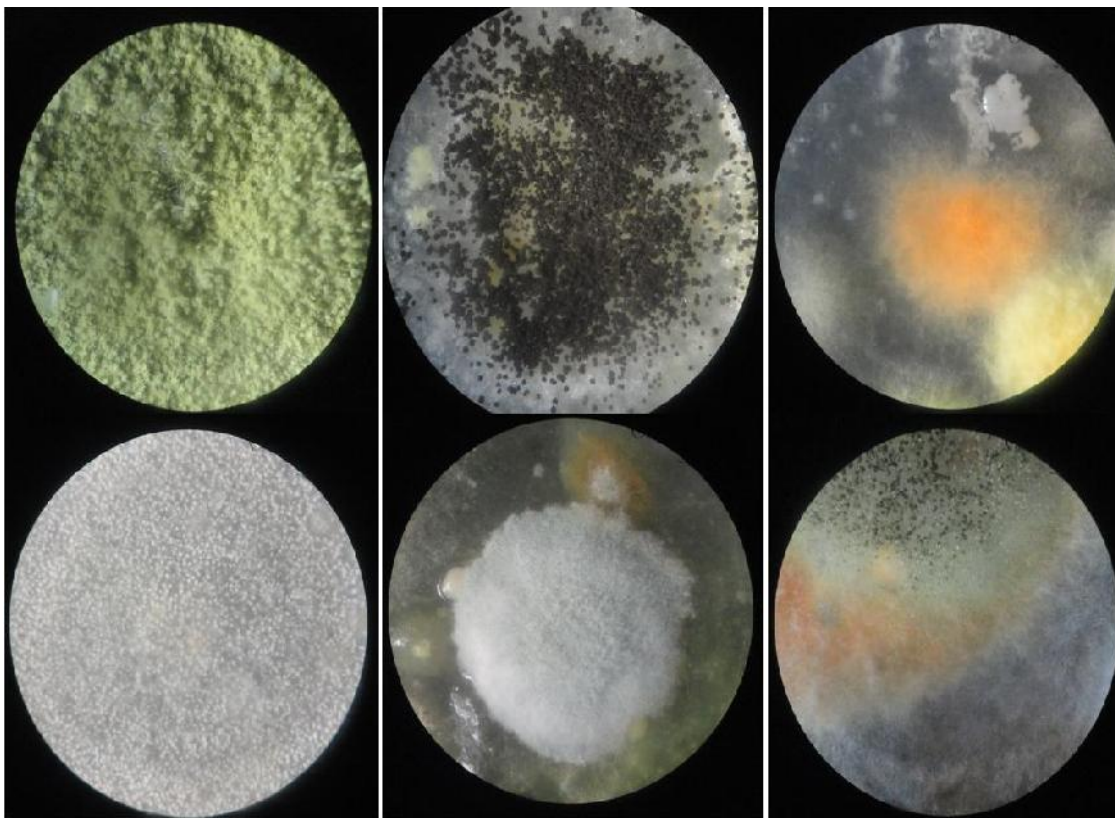


Fig. 5. Aspecto de microorganismos expresados con mayor frecuencia en diferentes muestras de suelo. Imágenes a los 28 días después de la siembra.

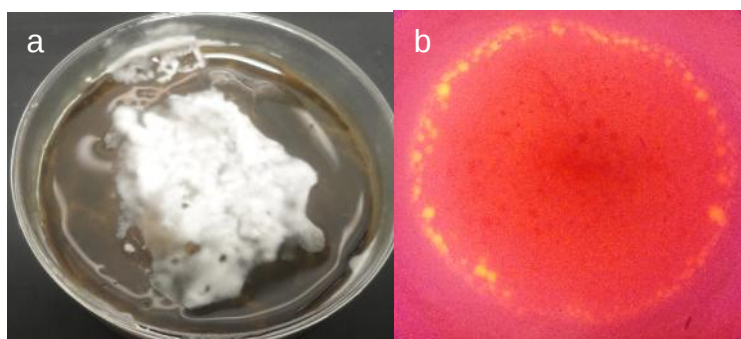


Fig 6. Proceso de selección de hongos con actividad lipolítica. a) Hongo blanco con crecimiento sobre aceite de oliva. b) Fluorescencia con luz UV en medio selectivo LB.

4. DISCUSIONES

Con este trabajo, se reporta por primera vez el crecimiento de microorganismos (hongos y bacterias) en medios utilizados en cultivo de tejidos vegetales en interacción con otros factores.

El valor de 100 % observado a los 3 d en bacterias, se puede atribuir al crecimiento más acelerado de éstas, en comparación de los hongos que fue más lento y tomó hasta 14 d para alcanzar los valores máximos de crecimiento (100 %). Esto pudo estar asociado a la condición de la muestra inicial de suelo, ya que este por ser un ecosistema con gran diversidad microbiana (Olalde y Aguilera, 1998), es posible encontrar diferencias en la velocidad de crecimiento de dicha microbiota. En este sentido Calvo *et al.* (2008), consideran que las bacterias corresponden a los microorganismos más numerosos, que debido a su rápido crecimiento representan el 5 % de la materia orgánica seca; mientras que los hongos, aun y cuando tienen la biomasa más significativa (representan del 10 al 20 % de la microbiota), su crecimiento es más lento (Calvo *et al.*, 2008).

Al evaluar el crecimiento de microorganismos provenientes de diferentes sitios de colecta es importante tener en cuenta que cada sitio tiene un tipo de suelo con características fisicoquímicas diferentes, lo cual influye en la cantidad y diversidad de hongos y bacterias presentes en las diez muestras de suelos colectados. Es por lo anterior que el factor tipo de suelo fue el determinante en cuanto a la diversidad en la expresión de microorganismos. Al respecto Calvo *et al.* (2008), consideran que el pH del suelo y su afectación en la disponibilidad de nutrientes, así como presencia de exudados vegetales y las prácticas agrícolas, son factores determinantes para el crecimiento y diversidad de microorganismos.

En particular, la muestra proveniente de Huehuetán Pueblo indujo los menores niveles de expresión de hongos, esto debido a que son suelos de tipo luvisol y cambisol. Dichos suelos se caracterizan por una acumulación de arcilla y de óxidos de hierro y poca cantidad de materia orgánica (IUSS Grupo de Trabajo WRB, 2007); lo anterior posiblemente esté asociado a que el análisis previo de este tipo de suelo, arrojó el pH más bajo (5.95); además en este mismo análisis previo, éste fue el suelo con menor UFC con 23,000 UFC/ml, sobre todo al compararlo con el suelo proveniente de Río Florido, con 33,000 UFC/ml.

El aceite de oliva presente en el medio de cultivo influyó en la cantidad de hongos expresados. De manera similar, Franco (2010) reportó que el aceite de oliva fue uno de los sustratos donde hubo mejor crecimiento de microorganismos. Esto es corroborado por Moreno (2012), quien encontró que las cepas estudiadas tuvieron mayor crecimiento en sustrato con aceites dentro de los cuales se encuentra el de oliva, ya que además de contener compuestos lipídicos, aportan vitaminas que promueven el crecimiento aunado a las sales del medio de cultivo; además, el aceite de oliva fue capaz de inducir la actividad lipolítica en las cepas.

En conclusión, ambos medios de cultivo permitieron el crecimiento de microorganismos; sin embargo, el aceite vegetal favoreció el crecimiento de hongos, los cuales podrían tener potencial como microorganismos lipolíticos. De igual forma se observó mayor diversidad en la expresión de hongos en comparación con bacterias; donde las diferencias en el crecimiento de microorganismos se debieron principalmente a la muestra de suelo.

AGRADECIMIENTOS

A los fondos fiscales del INIFAP mediante el proyecto “Identificación, selección y caracterización de microorganismos con capacidad lipolítica para producir biodiesel de calidad a partir de aceite de *Jatropha curcas*” con número SIGI 10594032501.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Calvo V. P., Reymundo M. L. y Zúñiga D. D. 2008. Estudios de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7(1,2): 141-148.

Fjerbaek L., Christensen K., Norddahl B. 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*. 102 (5): 1298-1315.

Franco G. L. 2010. valuación de la actividad lipolítica de microorganismos aislados de suelos del Parque Natural Nacional (PNN) Los Nevados. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá D. C. 23 pp.

IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO, Roma.

Khan A. K. 2012. Research into biodiesel, kinetics and catalyst development, in Department of Chemical Engineering. University of Queensland: Brisbane, Queensland, Australia. 20(1): 125-133.

Madigan M.T. Martinko J.M. y Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. Tenth Edition. Prentice Hall. Pearson Education, Inc. NJ. 160 p.

Moreno G. L. 2012. Evaluación de la actividad lipolítica de microorganismos aislados de ambientes salinos. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá D. C. 46 pp.

Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum*. 15: 473-497

Matthys D. 2003. Producing Biodiesel A Simple Affair? A Practical Guide to Read Before Building Your Plant. Ghent, Bélgica: América Soybean Association. 23 pp

Olalde P. V. y Aguilera G. L. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Terra* 16(3): 289-292.

Yasuda T, & Fujii Y. & Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explant by benzyladenina. *Plant Cell Physiology*. 26 (3): 595-597.

Zheng S., Shi Zhong & Wei Biao L. 2006. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy*. 30 (3): 267-272.