

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la cepa *Idiomarina* B7H2 e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.

# T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BIOL. ELIAN ITZEL NARVAEZ BAHENA**

ASESOR: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

CO-ASESOR: DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2020

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CeIB-UAEM), bajo la dirección del Dr. Fernando Martínez Morales y con la codirección de la Dra. María del Refugio Trejo Hernández.

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACYT-SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM). Reconocemos a PEMEX por promover ante el Fondo la demanda específica sobre los derrames de hidrocarburos y el medio ambiente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Fernando Martínez Morales y a la Dra. María del Refugio Trejo Hernández, por aceptarme en su grupo de trabajo, en el laboratorio de Biotecnología ambiental, por su tiempo para aclarar mis dudas y sus aportaciones a mejorar día con día, así como su total apoyo, Gracias.

A la Dra. Constanza Machín Ramírez, a la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango, y al Dr. Lorenzo Segovia, ya que junto con mi tutor y co-tutora formaron parte de mi comité revisor, por sus comentarios y aportaciones a lo largo de la realización de este proyecto.

A la M.C. Margarita Sánchez Arias del laboratorio de resistencia bacteriana a cargo del Dr. Jesús Silva del CISEI-INSP. Por su ayuda para la estandarización de las pruebas API 20 y API ZYM.

Al Dr. Marco Rogel y a la Dra. Gabriela Guerrero del CCG-UNAM por su ayuda para el ensamblaje y anotación del genoma, así como la obtención del ADN genómico para la secuenciación.

A la técnico Lucero Valladares Cisneros del laboratorio de Neurofarmacología del CeIB-UAEM, por su ayuda para la liofilización del compuesto.

A Conacyt por la beca otorgada de maestría no. de becario 709424

## DEDICATORIAS

A mi madre por estar presente en todos los momentos de mi vida, apoyarme y siempre creer que puedo hacer todo lo que me proponga, gracias por alegrarte por mis triunfos. Te amaré toda la vida.

A mi abuela, por ser mi compañera todos los días de mi vida, mi segunda madre, por quererme y apoyarme en cada momento, por apoyarme siempre. Te amaré toda la vida.

A mis tías, Lourdes y Graciela, por ser incondicionales y estar conmigo desde que era una niña, apoyándome en cada una de las etapas de mi vida, por estar siempre que las necesito.

A Josselin, quien sigue creciendo y me hace feliz tenerla en mi vida, por sus ocurrencias tan propias de su niñez, por querernos muy a nuestro modo.

A mis amigas, Pilar, Thalía, Paola, por su apoyo y amistad a lo largo de tantos años, por estar siempre para hacerme reír y por compartir conmigo sus logros personales como profesionales y por alegrarse de los míos.

A mis nuevos amigos que ahora son muy especiales para mí, por todas las buenas aventuras, risas y recuerdos, a ustedes Alejandra, Samir y Moisés. A ti Agustín por ya ser parte importante en mi vida.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Ambiental.

A mis tíos Raúl y Juan porque estarían contentos de un logro más, algún día nos volveremos a ver.

*A mi madre y mi abuela*

# ÍNDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
II. Antecedentes.....	3
2.1 Biosurfactantes.....	3
2.1.1 Propiedades de los biosurfactantes.....	3
2.1.2 Aplicaciones de los biosurfactantes.....	4
2.1.3 Clasificación de los biosurfactantes.....	4
2.2 Bioemulsificadores.....	5
2.2.1 Polisacáridos.....	6
2.2.2 Exopolisacáridos.....	6
2.2.2.1 Función y propiedades de los EPS.....	6 2.3
Ruta de biosíntesis de exopolisacáridos.....	8
2.4 Genes implicados en la biosíntesis de exopolisacáridos.....	9
2.5 Bacterias marinas productoras de EPS.....	10
2.5.1 <i>Idiomarina</i> .....	12
2.5.2 <i>Idiomarina</i> y la producción de EPS.....	13
2.6 Antecedentes directos.....	20
III. Justificación.....	21
V. Objetivos.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
VI. Metodología.....	23
6.1 Aislamiento de la cepa.....	24
6.2 Caracterización polifásica.....	25
6.2.1 Microbiológica.....	25
6.2.1.1 Caracterización morfológica.....	25
6.2.1.2 Tinción de Gram.....	25
6.2.1.3 Observación al microscopio electrónico.....	25
6.2.2 Pruebas bioquímicas.....	26

6.2.2.1	Pruebas API 20NE.....	26
6.2.2.2	Pruebas API ZYM.....	26
6.2.3	Análisis genómico.....	27
6.2.4	Tolerancia a la concentración de NaCl.....	28
6.2.5	Determinación del rango de temperatura de crecimiento.....	29
6.2.6	Determinación del rango de pH de crecimiento.....	29
6.3	Determinación de la actividad biosurfactante.....	29
6.3.1	CTAB.....	29
6.3.2	Actividad hemolítica.....	30
6.3.3	Tensión superficial e índice de emulsión .....	30
6.3.3.1	Tensión superficial.....	30
6.3.3.2	Índice de emulsión IE <sub>24</sub> .....	30
6.4	Determinación de la temperatura 5, 15 y 25°C sobre el crecimiento y la producción de EPS.....	31
6.5	Obtención del EPS.....	31
6.6	Formación de biofilm.....	32
6.7	Experimentos de degradación de hidrocarburos.....	32
VII.	Resultados y discusión.....	34
7.1	Caracterización polifásica.....	34
7.1.1	Microbiológica.....	34
7.1.1.1	Tinción de Gram y observación al microscopio.....	34
7.1.1.2	Identificación del género.....	36
7.1.2	Caracterización bioquímica.....	37
7.1.3	Análisis genómico.....	39
7.1.4	Tolerancia a la concentración de NaCl.....	40
7.1.5	Determinación del rango de temperatura de crecimiento.....	41
7.1.6	Determinación de rango de pH de crecimiento.....	42
7.2	Determinación de la actividad biosurfactante.....	43
7.2.1	Actividad hemolítica y CTAB.....	43

7.2.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la actividad BS.....	44
7.2.3 Efecto de las temperaturas 25, 15 y 5°C sobre la producción de EPS.....	46
7.3 Obtención del exopolisacárido.....	49
7.4 Formación de biofilm.....	52
7.5 Degradación de hidrocarburos.....	54
7.6 Identificación de genes de la cepa <i>Idiomarina</i> B7H2 involucrados en la producción de EPS.....	57
VIII. Conclusiones.....	62
IX. Perspectivas.....	62
X. Bibliografía.....	63
XI. Anexos.....	69



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Molécula biosurfactante.....	3
<b>Figura 2.</b> Representaciones de exopolisacáridos capsulares (CPS) y los liberados al medio (MPR).....	6
<b>Figura 3.</b> Diferentes vías de síntesis de EPS.....	9
<b>Figura 4.</b> Comparación de clúster de genes de algunos EPS.....	10
<b>Figura 5.</b> Imagen microscópica de <i>Idiomarina loihiensis</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Genoma completo en forma circular de <i>Idiomarina loihiensis</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Representación del clúster de genes para la síntesis de exopolisacáridos en <i>Idiomarina loihiensis</i> .....	17
<b>Figura 8.</b> Representación del clúster de genes para la formación de biofilm en <i>Idiomarina loihiensis</i> .....	17
<b>Figura 9.</b> Diagrama del diseño experimental.....	23
<b>Figura 10.</b> Medio de cultivo con petróleo.....	24
<b>Figura 11.</b> Crecimiento en caja de 48 horas 25°C de la cepa <i>Idiomarina B7H2</i> ...	34
<b>Figura 12.</b> Bacteria <i>Idiomarina B7H2</i> Gram negativa.....	35
<b>Figura 13.</b> Microfotografía de <i>Idiomarina B7H2</i> a las 24 horas en medio marino al 0.5% de sales marinas.....	35
<b>Figura 14.</b> Árbol filogenético de la cepa <i>Idiomarina B7H2</i> .....	36
<b>Figura 15.</b> Catalasa positiva en <i>Idiomarina B7H2</i> .....	37
<b>Figura 16</b> Mapa circular del genoma de la cepa de <i>Idiomarina B7H2</i> .....	40
<b>Figura 17.</b> Prueba de actividad hemolítica en <i>Idiomarina B7H2</i> .....	43
<b>Figura 18.</b> Prueba de agar CTAB en <i>Idiomarina B7H2</i> a 25°C.....	43
<b>Figura 19.</b> Emulsiones obtenidas durante la cinética de producción a las diferentes temperaturas durante cada 24 horas.....	48
<b>Figura 20.</b> Microfotografía de <i>Idiomarina B7H2</i> , en medio marino líquido al 0.5% de sales marinas a 25°C y 72 horas de incubación.....	49
<b>Figura 21.</b> Imagen de microscopio electrónico de transmisión de <i>Idiomarina ramblicola</i> en medio MY líquido al 7.5% (p/v) de sales tras incubación a 120 h...	50
<b>Figura 22.</b> EPS obtenido después de liofilizarlo a 5, 15 y 25°C.....	51

<b>Figura 23.</b> Microfotografía de <i>Idiomarina</i> B7H2 uniéndose entre sí por medio de la formación de biofilm y secretando EPS.....	53
<b>Figura 24.</b> Placa de 96 pozos, incubada durante 120 horas con las diferentes cepas aisladas en el laboratorio de biotecnología ambiental.....	53
<b>Figura 25.</b> Representación del clúster de genes involucrados en la formación del biofilm en la cepa <i>Idiomarina</i> B7H2.....	54
<b>Figura 26.</b> Perfil cromatográfico de la extracción del petróleo crudo.....	55
<b>Figura 27.</b> Representación del clúster de <i>Idiomarina</i> B7H2, involucrado en la producción de EPS.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Exopolisacáridos de importancia industrial, organismos que los producen y aplicación.....	7
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de algunos organismos aislados productores de EPS.....	11
<b>Tabla 3.</b> Especies de <i>Idiomarina</i> productoras de EPS.....	12
<b>Tabla 4.</b> Clúster de genes de la biosíntesis de EPS de <i>Idiomarina loihiensis</i> .....	14
<b>Tabla 5.</b> Clúster de genes para la formación de biofilm de <i>Idiomarina loihiensis</i> ...	15
<b>Tabla 6.</b> Proteínas involucradas en la biosíntesis de EPS en el género <i>Idiomarina</i> por medio de la vía dependiente de Wzx/Wzy.....	18
<b>Tabla 7.</b> Proteínas involucrados en la biosíntesis de EPS en el género de <i>Idiomarina</i> encontradas en otros géneros.....	19
<b>Tabla 8.</b> Cepas aisladas del Golfo de México.....	16
<b>Tabla 9.</b> Comparación entre distintas especies del género <i>Idiomarina</i> .....	38
<b>Tabla 10.</b> Genomas de especies pertenecientes al género de <i>Idiomarina</i> .....	39
<b>Tabla 11.</b> Crecimiento de la cepa <i>Idiomarina</i> B7H2 a diferentes temperaturas durante 12 horas.....	41
<b>Tabla 12.</b> Tiempo de duplicación de <i>Idiomarina</i> B7H2, a las temperaturas de 5°C, 15°C y 25°C.....	44
<b>Tabla 13.</b> Producción de EPS a 120 horas obtenido a diferentes temperaturas...	51
<b>Tabla 14.</b> Genes de <i>Idiomarina</i> B7H2, involucrados en la producción del biofilm	54
<b>Tabla 15.</b> Degradación de hidrocarburos por parte de la cepa <i>Idiomarina</i> B7H2	55
<b>Tabla 16.</b> Genes encontrados en el genoma de <i>Idiomarina</i> B7H2 relacionados con la producción de EPS.....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Crecimiento de <i>Idiomarina</i> B7H2 en concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10% de NaCl.....	41
<b>Gráfica 2.</b> Crecimiento de <i>Idiomarina</i> B7H2 a diferentes pH a 25°C durante 120 horas a 160 rpm.....	42
<b>Gráfica 3.</b> Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de BS de <i>Idiomarina</i> B7H2 a 5, 15 y 25°C.....	45
<b>Gráfica 4.</b> Efecto de la temperatura 25, 15 y 5°C sobre la producción de EPS en <i>Idiomarina</i> B7H2.....	47
<b>Gráfica 5.</b> Emulsiones a 1, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 miligramos del EPS obtenido a diferentes T°.....	52
<b>Gráfica 6.</b> Formación de biofilm en diferentes cepas utilizando medio marino y medio M9.....	53

## ABREVIATURAS

BS. Biosurfactantes

BE. Bioemulsificantes

CPS. Polisacáridos capsulares

EPS. Exopolisacárido

GTs. Glicosiltransferasas

PCP. Co-polimerasas de polisacáridos

OPX. Proteínas de exportación de polisacáridos

## Resumen

Los biosurfactantes son considerados como moléculas anfipáticas ya que constan de dos partes, una que porción que es soluble en agua y la otra que es hidrofóbica. Estos se clasifican en moléculas de bajo peso molecular como los glicolípidos principalmente, y los de alto peso molecular como los polisacáridos, glicoproteínas, exopolisacáridos (EPS) por mencionar algunos. Las bacterias son los principales organismos que producen EPS, la mayoría los sintetizan para protegerse de los factores ambientales del hábitat en que viven.

Existen muchos géneros bacterianos que han sido reportados como productores de EPS, sin embargo, en la actualidad, los estudios han estado más enfocados en las bacterias de ambientes extremos debido a la estabilidad que pueden llegar a presentar las moléculas que sintetizan.

Entre los géneros que se han estudiado poco, se encuentra el género de *Idiomarina*, el cual fue reportado como tal en el año 2004 por Ivanova y colaboradores, los miembros de este suelen considerarse halófilos por su amplio rango de tolerancia a NaCl, temperatura de crecimiento y son bacilos ligeramente curvados Gram negativos. Algunas especies han sido reportadas como productoras de EPS, la principal *Idiomarina loihiensis* en la cual se encontró un clúster de 32 genes para la biosíntesis de estos, de igual forma se encontró uno de 17 genes para la formación de biofilm, algunas otras como *Idiomarina sp Strain 5.13* tiene 6 genes para la producción de EPS.

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la cepa *Idiomarina* B7H2, la cual fue aislada del Golfo de México. Los estudios demostraron que es un bacilo ligeramente curvado que mide 0.3-0.6  $\mu\text{m}$ - 1.8-2.0  $\mu\text{m}$ , Gram negativo, que puede crecer en un rango de 4-45°C, tolerar NaCl desde 0.5-15%. En la caracterización bioquímica resulto positiva hacia oxidasa y catalasa, así como algunos carbohidratos, los cuales, son indispensables para los precursores de la ruta metabólica de los EPS. En la caracterización genómica se encontró que este contiene 2, 976, 838 pb con un contenido en G-C del 46%, con 2775 genes que pueden codificar para proteínas.

El análisis del genoma nos arrojó que la cepa *Idiomarina* B7H2 contiene un clúster de 34 genes con 34914 pb, que podrían estar implicados en la producción de EPS el cual se encuentra en la ubicación 458-491, también posee un clúster de 4 genes para la formación de biofilm (715-718). De manera experimental se encontró que es capaz de producir EPS desde los 5-25°C, forma biofilm y tiene la capacidad de utilizar hidrocarburos.

## I. Introducción

Los microorganismos marinos representan una fuente potencial de moléculas con amplias aplicaciones en la biotecnología. La diversidad de nichos ecológicos marinos influye en las características fisiológicas y metabólicas y se ve reflejada en una gama amplia de metabolitos producidos como biosurfactantes, antibióticos, toxinas, pigmentos, polímeros, entre otros (Poli *et al.*, 2010). Estos metabolitos pueden ser usados por los microorganismos como herramientas de adaptación, defensa, y alimentación que se suman a su metabolismo basal confiriéndoles una mayor plasticidad fisiológica (Satpute *et al.*, 2010; Desai y Banat, 1997).

El interés por estos microorganismos ha ido creciendo en las últimas décadas, debido a la importancia biotecnológica que representan los productos de su metabolismo (enzimas y metabolitos secundarios). Muchos de ellos son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y biorremediación (Desai y Banat., 1997), entre estos podemos encontrar proteínas, glicolípidos y poliméricos como los exopolisacáridos (EPS). En este contexto, se están describiendo nuevas especies marinas e incluso nuevas familias y a nivel de clase. Por lo que es relevante aislar de forma viable a estos microorganismos, que su crecimiento sea óptimo en el laboratorio y que no pierda sus capacidades metabólicas.

Los biosurfactantes (BS) son de los metabolitos de las bacterias que han llamado mucho la atención en el campo de la biotecnología. Estos son moléculas anfipáticas que confieren la capacidad de poder solubilizar compuestos complejos como los hidrocarburos, y que representan una gran ventaja sobre los surfactantes químicos por ser biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y con amplias aplicaciones (White *et al.*, 2013; Satpute *et al.*, 2010; Desai y Banat., 1997). Los BS tienen propiedades tensoactivas y/o emulsificantes. Una de las propiedades de los emulsificantes es que son estabilizadores de fases inmiscibles.

En los últimos años el estudio de bioemulsificantes (BE) ha sido de gran importancia por su amplio rango de aplicación en la industria.

## II. Antecedentes

### 2.1 Biosurfactantes.

Los biosurfactantes (BS) son considerados metabolitos secundarios y son producidos principalmente por bacterias, hongos y algunas levaduras (White *et al.*, 2013; Desai y Banat., 1997). Los BS presentan la característica de ser moléculas anfipáticas con una parte polar o soluble en agua que puede ser aniónica o catiónica (Dell'Anno *et al.*, 2018) y una parte no polar o hidrofóbica compuesta por una cadena de ácidos grasos (Mao *et al.*, 2015; Desai y Banat., 1997). Su naturaleza les permite interaccionar en la superficie de contacto de dos líquidos insolubles entre sí, reduciendo la tensión entre ellas (Satpute *et al.*, 2010; Desai y Banat., 1997), (Figura 1).



**Figura 1.** Molécula biosurfactante (modificado de Santos *et al.*, 2016)

Los BS presentan ventajas sobre los surfactantes sintéticos debido que son más estables en cuanto al rango de pH, temperatura, concentración de iones, salinidad, son biodegradables y amigables con el planeta (Santos *et al.*, 2016; Makkar *et al.*, 2011).

#### 2.1.1 Propiedades de los biosurfactantes.

La naturaleza anfipática de los biosurfactantes les confiere propiedades únicas. Los BS tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua de 72 dinas/cm en un rango de 25-30 dinas/cm (Satpute *et al.*, 2010), en mezclas acuosas, o con hidrocarburos (Wen-Jie *et al.*, 2011; Desai y Banat., 1997).

La tensión interfacial se disminuye hasta que la concentración del surfactante alcance una concentración micelar crítica (CMC) (Santos *et al.*, 2016).

Las características más importantes que ofrecen los BS son una alta compatibilidad ambiental (Desai y Banat., 1997), una baja toxicidad (Mukherjee *et*

*al.*, 2006), biodegradabilidad, mayor selectividad y estabilidad en condiciones ambientales extremas (Satpute *et al.*, 2010; Desai y Banat, 1997).

### **2.1.2 Aplicaciones de los biosurfactantes.**

En los últimos años los biosurfactantes han tomado gran importancia, debido al gran potencial que presentan, como un reemplazo de los surfactantes sintéticos, y sus aplicaciones industriales y ambientales, (Satpute *et al.*, 2010; Banat *et al.*, 2000). Se pueden producir a partir de materia prima de precio accesible (Mukherjee *et al.*, 2006).

Las propiedades anfipáticas de los biosurfactantes, les ha conferido una gran importancia en la industria farmacéutica y alimentaria, en su uso para la elaboración de detergentes, cosméticos, alimentos y medicinas (Desai y Banat., 1997). Además, pueden presentar propiedades con importancia terapéutica y biomédica importante, como antibacteriales, antifúngicas, y antivirales (Mukherjee *et al.*, 2006). La aplicación ambiental es importante, por ejemplo la utilización de BS en la biorremediación de suelos contaminados y el tratamiento de agua y tierra (Sachdev y Cameotra., 2013). Facilita la biodisponibilidad de los hidrocarburos para su degradación por microorganismos (Bayat *et al.*, 2015; Sachdev y Cameotra., 2013; Das *et al.*, 2008). También pueden usarse en la agricultura para mejorar la calidad del suelo (Desai y Banat., 1997; Sachdev y Cameotra., 2013).

### **2.1.3 Clasificación de los biosurfactantes.**

Los biosurfactantes presentan una amplia variación en cuanto a las moléculas que los conforman. Generalmente son clasificados en dos grupos; los de bajo peso molecular, constituidos principalmente por glicolípidos (ramnolípidos), ácidos grasos, fosfolípidos y lipopéptidos. Por otra parte, se encuentran los de alto peso molecular como las proteínas, lipoproteínas y polisacáridos (White *et al.*, 2013; Satpute *et al.*, 2010). Entre los BS de alto peso molecular se encuentran los BE.



## **2.2 Bioemulsificadores.**

Los bioemulsificadores (BE) al igual que los BS son moléculas que presentan una porción hidrofóbica no polar y una hidrofílica (Rosenberg y Ron., 1999), tienen la capacidad de incrementar el área entre dos fases que no se mezclan entre sí, e incrementar la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos (Tripathi *et al.*, 2018). Aunque poseen la capacidad de disminuir la tensión superficial, no lo hacen como un BS, por lo cual actúan principalmente como agentes estabilizadores de fases o bioemulsificantes. Este tipo de emulsificantes se consideran de alto peso por estar compuestos principalmente de lipopolisacáridos, polisacáridos o proteínas (Rosenberg y Ron., 1999).

### **2.2.1 Polisacáridos.**

Los polisacáridos son moléculas complejas compuestas por un solo tipo de monosacáridos o por varios tipos como los heteropolisacáridos (Casillo *et al.*, 2018; Poli *et al.*, 2010), entre los azúcares, sin embargo también pueden contener ácido urónico o aminoácidos. Son moléculas de alto peso molecular desde 50 Da hasta miles de KDa (Casillo *et al.*, 2018). Estos pueden proceder de diversos organismos como plantas, hongos, algas o bacterias (Becker., 2015; Poli *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2008).

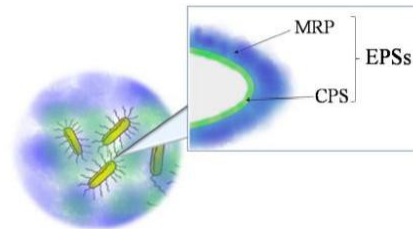
Las bacterias sintetizan polisacáridos como los liposacáridos, polisacáridos capsulares, y exopolisacáridos (EPS) (Becker., 2015). Los polisacáridos presentan funciones biológicas diversas, y generalmente son clasificados en intracelulares, capsulares y extracelulares, los cuales son importantes para la formación de biofilms y, en algunos casos, para su patogenicidad (Ates., 2015).

Las propiedades que confieren los polisacáridos como la resistencia mecánica, la emulsión, adhesión y formación de coloides; las cuales tienen aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y especialmente en la biotecnología (Song *et al.*, 2019; Casillo *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Exopolisacáridos (EPS).

Los exopolisacáridos (EPS) son sustancias poliméricas generadas intracelularmente y secretadas al exterior (Tripathi *et al.*, 2018; Ates., 2015; Satpute *et al.*, 2010; Poli *et al.*, 2010) constituidos de azúcares como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-ramnosa, amino azúcares (Poli *et al.*, 2010), ácidos nucleicos, proteínas, lípidos (Casillo *et al.*, 2018) y ácido urónico (Tripathi *et al.*, 2018). Muchos de estos EPS son lineares, con un peso molecular promedio de  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  Da (Poli *et al.*, 2010). La mayoría de las veces se encuentran compuestos por unidades repetidas de un monosacárido en especial, el cual sirve para ensamblar a los demás componentes orgánicos e inorgánicos (Becker., 2015).

Los EPS bacterianos pueden encontrarse en dos tipos diferentes (Figura 2), en forma de cápsula (CPS) los cuales están asociados a la membrana celular y los que se encuentran como red unidos de una manera débil a la superficie celular (MPR) (Casillo *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2017; Sathiyarayanan *et al.*, 2017; Poli *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Representación de exopolisacáridos capsulares (CPS), y los liberados al medio (MPR), Casillo *et al.*, 2018.

#### 2.2.2.1 Función y propiedades de los EPS.

Los EPS son sintetizados principalmente por bacterias, que se pueden encontrar en el agua, suelo, ambientes marinos y ecosistemas, a veces, en condiciones extremas (Wang *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2017; Nichols *et al.*, 2005). El papel fisiológico de los EPS depende del nicho ecológico y del ambiente natural del

donde se han aislado los microorganismos; la producción de estos representa un costo del 70% de la energía de la bacteria (Poli *et al.*, 2010).

Los EPS juegan un importante papel en la recolección de nutrientes, adherencia a la superficie, protección contra factores abióticos, temperatura, pH, metales pesados (Freitas *et al.*, 2017; Becker., 2015) y formación de biofilms (Mata *et al.*, 2008; Guezennec., 2002). Sin embargo también se ha observado que algunos presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes o antivirales (Danielli *et al.*, 2018).

El estudio de los EPS en el laboratorio se ve influenciado por los componentes del medio, la fuente de carbono, nitrógeno, sales minerales, elementos traza, pH, temperatura y agitación (Nicolaus *et al.*, 2010).

Existen EPS ampliamente estudiados como el xantano, gelano, emulsano, alginato entre otros, los cuales se utilizan ampliamente en la industria y tienen alto valor agregado (Tripathi *et al.*, 2018; Becker., 2015).

**Tabla 1.** Exopolisacáridos de importancia industrial, organismos que los producen y aplicación.

<b>EPS</b>	<b>Organismo</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Xantano</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Preparación de alimentos, cosméticos, pinturas, adhesivos	Vicente <i>et al.</i> , 2018
<b>Dextrano</b>	<i>Leuconostoc spp</i> <i>Streptococcus spp</i>	Extensor de plasma sanguíneo y medios de cromatografía	Ates <i>et al.</i> , 2015
<b>Gelano</b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Industria alimentaria, farmacéutica, uso antifúngico y antimicrobiano.	Zia <i>et al.</i> , 2018
<b>Emulsano</b>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Industria petrolera. Disminuye viscosidad del crudo	Rubinovitz <i>et al.</i> , 1982.
<b>Alginato</b>	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Fertilizantes, desecación,	Suresh K <i>et al.</i> , 2007
<b>Succinoglicano</b>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Industria petrolera	Becker 2015

La capacidad que tienen los EPS de estabilizar emulsiones así como su viscosidad, les permite tener un amplio rango de aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Song *et al.*, 2019; Chikkanna *et al.*, 2018; Mata *et al.*, 2008).

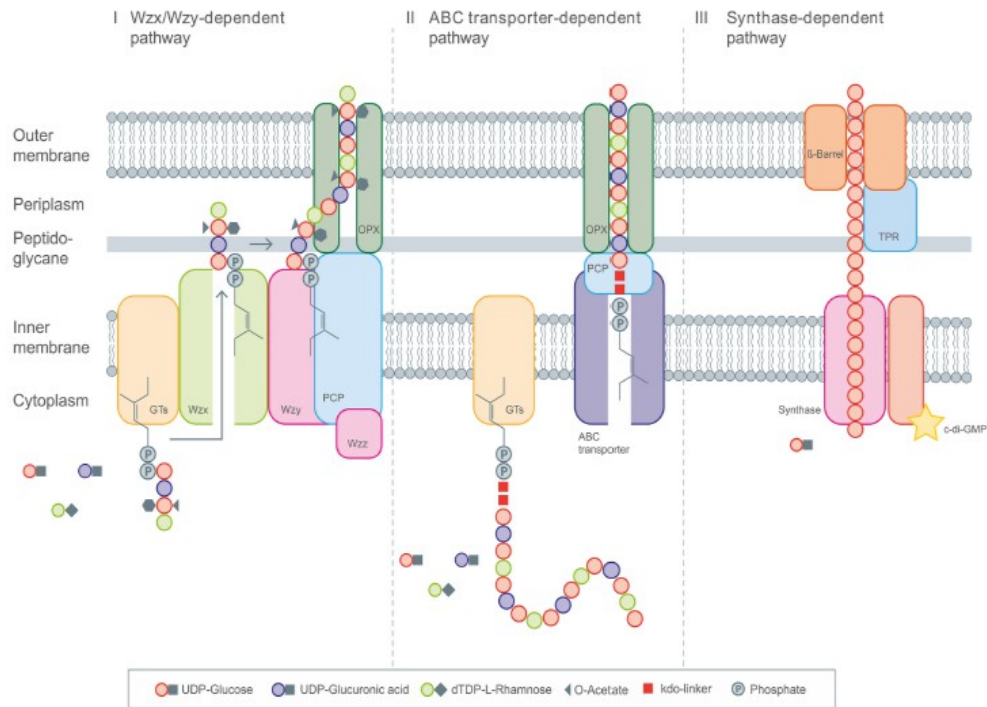
### **2.3 Ruta de biosíntesis de exopolisacáridos.**

Los mecanismos generales para la producción de polisacáridos bacterianos en las bacterias Gram (-) se realizan por 3 vías de síntesis; la vía dependiente de Wzx/Wzy, vía dependiente de transportador ABC y la vía dependiente de sintasa (figura 3). Los precursores para iniciar la biosíntesis son transformados dentro de la célula por enzimas produciendo azúcares activados (Ates., 2015, Schmid *et al.*, 2015).

En la vía dependiente de Wzx/Wzy los azúcares activados o unidades repetidas se unen en una secuencia específica mediante glicosiltransferasas (GTs) y son translocadas a través de la membrana interna por la proteína Wzx (flipasa), la polimerización ocurre en el espacio periplasmático, posteriormente, esta es exportada por la proteína Wzy a la superficie celular (Islam y Lam., 2014). La transportación del periplasma a la superficie celular se lleva por medio de proteínas co-polimerasas de polisacárido (PCP) y proteínas de exportación de polisacáridos (OPX) (Schmid *et al.*, 2015).

La vía dependiente del transportador ABC se encuentra presente principalmente en la biosíntesis de los polisacáridos capsulares (CPS), estos son ensamblados por medio de GTs en el citoplasma de la membrana interna (Ates., 2015; Schmid *et al.*, 2015; Islam y Lam., 2014). La exportación hacia la membrana externa se realiza por medio de los transportadores ABC insertados en la membrana interna y las proteínas periplasmáticas como las PCP y las OPX. Una de las características principales de esta vía es que llevan un glicolípido conservado (Schmid *et al.*, 2015).

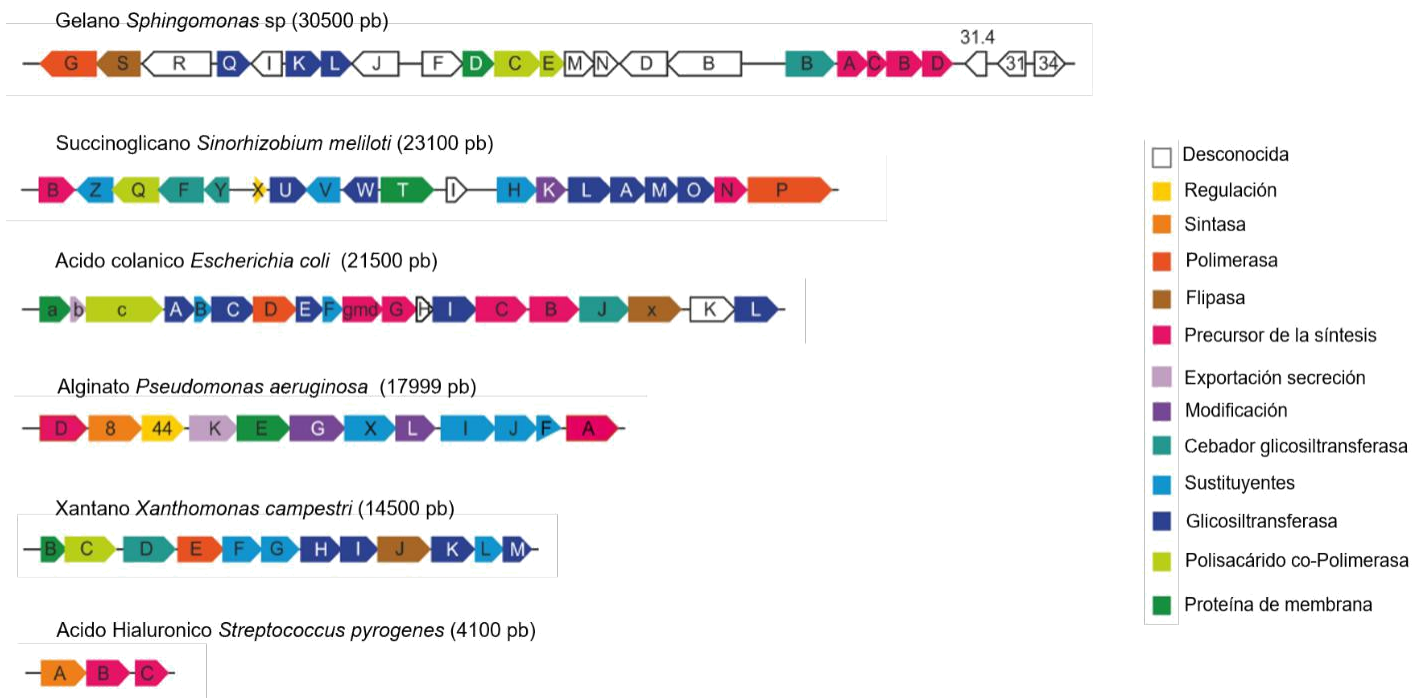
La vía dependiente de la sintasa, esta pasa polímeros completos a través de la membrana celular, siendo dependiente de una flipasa para poder translocar las unidades repetidas (Schmid *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Diferentes vías de síntesis de EPS. I) Vía dependiente de Wzx/Wzy, II) vía dependiente de transportador ABC, III) vía dependiente de sintasa. (Schmid *et al.*, 2015)

## 2.4 Genes implicados en la biosíntesis de exopolisacáridos.

En la producción de EPS, los genes responsables incluyen la síntesis de los precursores o síntesis de azúcares, la síntesis de unidades de repetición de oligosacáridos, el ensamblaje de las unidades del polisacárido (polimerización) y la exportación del producto (Ates., 2015; Becker., 2015). Estos genes involucrados en la biosíntesis de los EPS se encuentran principalmente en el cromosoma bacteriano, sin embargo se ha demostrado que también pueden encontrarse en plásmidos (Harding *et al.*, 1993). La información para la biosíntesis de los EPS se encuentra organizada en clústers (Tripathi *et al.*, 2018) (Figura 4). Existen diversos EPS, el xantano es uno de los más estudiados y se han logrado identificar genes involucrados en las 4 etapas de la ruta metabólica, la cual posee 12 marcos abiertos de lectura (Vicente *et al.*, 2018; Becker., 2015; Harding *et al.*, 1993).



**Figura 4.** Comparación de clúster de genes de algunos EPS en distintas bacterias (modificada de Schmid *et al.*, 2015)

Otro de los EPS estudiados es el alginato el cual tiene asociado un clúster de 23 genes (Muhammadi y Ahmed., 2007). Sin embargo aunque se han descrito los clústers de genes de EPS de importancia comercial, existen otros que se han encontrado por medio de la secuenciación y análisis completo del genoma, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 (Hao *et al*, 2011), *Zunongwangia profunda* SM-A87, *Pseudoalteromonas* sp SM9913 (Ates *et al.*, 2015). El aislamiento de bacterias de aguas profundas como *Alteromonas macleodii* (Ates., 2015) e *Idiomarina loihiensis* han demostrado la presencia de clústers de los genes de biosíntesis de EPS (Huo *et al.*, 2004).

## 2.5 Bacterias marinas productoras de EPS.

Debido a la gran diversidad de bacterias marinas, es mayor el potencial para encontrar nuevos y mejores EPS que los existentes actualmente (Casillo *et al.*, 2018). El ambiente marino, es diverso en ambientes relacionados con la profundidad de los mares y océanos, en donde hay microambientes por ejemplo: a distintas profundidades los factores como la composición química del agua, la luz, afectan a las poblaciones de bacterias; en los sedimentos marinos, áreas

hidrotermales y volcánicas, estos nichos suelen ser habitados por bacterias mesófilas y extremófilas (Tripathi *et al.*, 2018; Casillo *et al.*, 2018; Poli *et al.*, 2010).

Así, los ambientes marinos albergan una gran variedad de bacterias que han desarrollado capacidades fisiológicas específicas, encontrándose vías metabólicas únicas, que no solo les permite sobrevivir a este tipo de ambiente, sino también desarrollar metabolitos nuevos de interés para la biotecnología (Sran *et al.*, 2019; Nerurkar *et al.*, 2009). El Golfo de México es un ecosistema con influencia de actividades humanas que representan factores adicionales que pueden influir en la composición de diversos macro y micro organismos. La actividad petrolera es una de ellas. La exploración y explotación petrolera, en esta región, así como emanaciones naturales o accidentales de hidrocarburos podrían ser un factor que seleccione o afecte a diversas poblaciones de seres vivos así como a factores fisicoquímicos.

Un gran número de especies bacterianas sintetizan EPS con propiedades emulsificantes, la mayoría de estos están aislados de ambientes marinos (Poli *et al.*, 2010), los cuales son producidos por los organismos que los habitan, existen muchas bacterias que producen EPS como los géneros de *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Halomonas* (Poli *et al.*, 2010), *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Vibrio*, *Idiomarina* entre otros, (Casillo *et al.*, 2018; Guezennec., 2002). Tabla 2. Sin embargo, debido la gran biodiversidad bacteriana en el mar se espera encontrar nuevos bioemulsificantes (BS) con mejores propiedades a los conocidos hasta ahora.

**Tabla 2.** Ejemplos de algunos organismos aislados productores de EPS (tomado de Casillo *et al.*, 2018)

<b>Microorganismo</b>	<b>Aislado</b>	<b>Composición EPS</b>	<b>Función y aplicación</b>
<i>Alteromonas hispánica</i>	Hipersalina interior	Glc:Man:Rha:Xyl 18:63:7:12	-
<i>Bacillus</i> Halófilo	Aguas termales marinas	Manosa	-

<i>Halomonas maura</i> Halófilo	Salina solar	Man:Gal:Glc:GlcA 34.8:14:29.3:21.9	Viscoso, pseudoplástico
<i>Pseudoalteromonas rutherfordia</i>	Agua de mar	Manosa, y ácido urónico	pseudoplástico
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sedimentos marinos	GlcN:Rha:Glc:Man 35.4:28.6:27.2:8.7	Biofilm, antioxidante.

### 2.5.1 Género *Idiomarina*.

La familia *idiomarinaceae* pertenece a la clase de las *Gammaproteobacterias*; esta fue propuesta por Ivanova y colaboradores en el año 2000, consolidada como tal en el año 2004 (Zachariah y Das., 2017; Zhang *et al.*, 2012). Crece en ambientes salinos como aguas, sedimentos, salinas solares y humedales hipersalinos, requiere  $\text{Na}^+$  para su crecimiento (Liu *et al.*, 2018), excepto *Idiomarina xiamensis* (Liu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2011), contiene 28 especies reportadas (Chen C., *et al.*, 2019). Se les considera halófilas moderadas de acuerdo a la concentración de sal que necesitan para crecer (5-20%) (Liu *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2017).

Los miembros de esta familia son bacilos Gram (-) cortos ligeramente curvados con un tamaño entre 0.3-0.9  $\mu\text{m}$  a 0.8-3.5  $\mu\text{m}$  (Yoon *et al.*, 2006) Figura 5, estrictamente aerobios, (Zachariah y Das., 2017; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Donachie *et al.*, 2003). Pueden crecer en un amplio rango de temperatura que va desde los 4 a los 42°C (Liu., *et al* 2018; Jean *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Imagen microscópica de *Idiomarina loihiensis*. (Donachie *et al.*, 2003)



Son positivas para pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa, (Zachariah y Das., 2017; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Donachie *et al.*, 2003) lipasa, ureasa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, esterasa, aminopeptidasa (Wang *et al.*, 2011). Pueden reducir nitrato a nitrito (Wang *et al.*, 2011), aunque no todas poseen esta capacidad (Donachie *et al.*, 2003). Utiliza como fuentes de carbono la alanina, prolina, glicerol, Tween 40 y Tween 80 (Donachie *et al.*, 2003), entre otros.

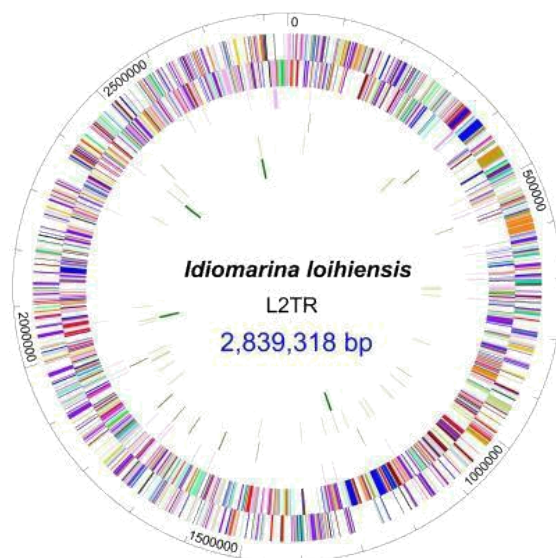
### 2.5.2 *Idiomarina* y la producción de EPS.

*Idiomarina* es un género que ha sido poco estudiado en la producción de EPS, en el 2008 Mata y colaboradores caracterizaron los exopolisacáridos de dos especies de *Idiomarina*, *ramblicola* y *fontislapidosa*, las cuales fueron crecidas en un medio con 7.5% de NaCl y 1% de glucosa, se observó que los EPS fueron sintetizados en la fase estacionaria.

**Tabla 3.** Ejemplos de dos especies del género *Idiomarina* productores de EPS (Mata *et al.*, 2008)

	Origen	Composición de EPS	Función y aplicaciones
<i>Idiomarina ramblicola</i>	Laguna	Glc, Man, Xyl, Rha Sulfato y grupos fosfato	Emulsificante y estabilizantes de metales
<i>Idiomarina fontislapidosa</i>	Corriente de agua	Glc, Man, Xyl, Rha Sulfato y grupos fosfato	Emulsificante y estabilizantes de metales

En el 2004 Huo y colaboradores secuenciaron y describieron el genoma completo de *Idiomarina loihiensis* y encontraron que posee un único cromosoma circular (figura 6), de 2839318 pb, con 2640 marcos de lectura abierta, 4 operones de RNAr y 56 genes de RNAt. In vitro se ha demostrado que puede producir un EPS viscoso, lo cual fue confirmado al encontrar un clúster con 32 genes (Tabla 4, Figura 7) que codifican enzimas involucradas en la síntesis, modificación, polimerización y exportación de EPS, de igual manera presenta un clúster para la formación de biofilm de 17 genes (tabla 5, figura 8).



**Figura 6.** Genoma completo en forma circular de *Idiomarina loihiensis* (Huo *et al.*, 2004)

**Tabla 4.** Clúster de genes de la biosíntesis de EPS de *Idiomarina loihiensis* (datos obtenidos de NCBI, n. de accesión AE017340)

Ubicación	Gen	Producto	AA	kDa
IL0538	A	UDP-glucose 6-dehydrogenase	388	43.6
IL0539	B	Chain length determinant protein	336	37.7
IL0540	C	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components	598	65.3
IL0541	D	DTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	352	39.7
IL0542	E	DTDP-glucose pyrophosphorylase	292	32.5
IL0543	F	Acetyltransferase, isoleucine patch superfamily	185	20.1
IL0544	G	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase, putative	241	26.2
IL0545	H	Predicted pyridoxal phosphate-dependent enzyme	380	43
IL0546	I	Uncharacterized conserved membrane protein	378	44.2
IL0547	J	Acetyltransferase, isoleucine patch superfamily	173	18.8
IL0548	K	Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerases	396	45.1
IL0549	L	Predicted pyridoxal phosphate-dependent enzyme	380	42.4
IL0550	M	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	387	42.2
IL0551	N	Sialic acid synthase	357	39.2
IL0552	Ñ	Acetyltransferase, isoleucine patch superfamily	213	22.7
IL0553	O	Nucleoside-diphosphate-sugar pyrophosphorylase	351	39.5
IL0554	P	CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase	236	26.5

IL0555	Q	UDP-glucose:glucosyl LPS a 1,2-glucosyltransferase	342	39.9
IL0556	R	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronate dehydrogenase	420	46.4
IL0557	S	Glycosyltransferase	270	31.1
IL0558	T	Glycosyltransferase	373	41.1
IL0559	U	UDP-glucose 4-epimerase	336	37.2
IL0560	V	Uncharacterized conserved membrane protein	345	39.2
IL0561	W	Uncharacterized conserved protein	207	23
IL0562	X	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	308	33.3
IL0563	Y	involved in lipopolysaccharide synthesis, sugar transferase	183	20.3
IL0564	Z	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	351	38.9
IL0565	A1	Polysaccharide biosynthesis/export protein	920	101.4
IL0566	B2	Uncharacterized conserved secreted protein	98	9.4
IL0567	C3	WbfD-like uncharacterized domain involved in polysaccharide synthesis	236	26.7
IL0568	D4	Fusion of WbfC- and WbfB-like uncharacterized domains involved in polysaccharide synthesis	955	109
IL0569	E5	Membrane-associated enzyme of epimerase/dehydratase family, wbfY-like protein	634	69.8

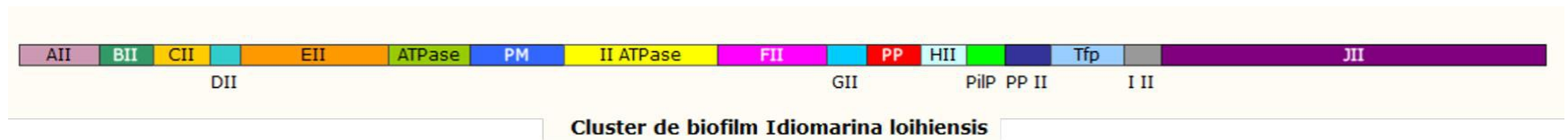
**Tabla 5.** Clúster de genes para la formación de biofilm de *Idiomarina loihiensis* (datos obtenidos de NCBI, n. de accesoión AE017340).

Ubicación	Gen	Producto	Peso kDa	aa
IL0363	AII	Type II secretory pathway component	33.7	303
IL0364	BII	Type II secretory pathway component	23.1	202
IL0365	CII	Type II secretory pathway component	24.1	211
IL0366	DII	Type II secretory pathway component"	12.7	113
IL0367	EII	Type II secretory pathway	60.4	557
IL0368	ATPase	General secretion pathway protein, ATPase	34.5	302
IL0369	PM	Membrane associated TPR repeats containing protein	40	357
IL0370	II ATPase	Type II secretory pathway, ATPase	63.8	571
IL0371	FII	Type II secretory pathway	46.6	412

IL0372	GII	Predicted Type II secretory pathway component	17.2	149
IL0373	PP	Pilin protein	21.2	201
IL0374	HII	Type II secretory pathway, pseudopilin	17.2	170
IL0375	PilP	PilE-like protein	15.4	144
IL0376	PP II	Pilin protein	19	173
IL0377	Tfp	Tfp-like pilus assembly protein	30.5	272
IL0378	I II	Type II secretory pathway component	15.2	143
IL0379	J II	Type II secretory pathway component	153.9	1431



**Figura 7.** Representación del clúster de genes para la síntesis de exopolisacáridos en *Idiomarina loihiensis*



**Figura 8.** Representación del clúster de genes para la formación de biofilm de *Idiomarina loihiensis*

El análisis de las diferentes enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de los EPS dependiente de las proteínas Wzx/wzy, arrojó que existen diferentes miembros del género *Idiomarina* que poseen las enzimas necesarias para la formación de estos (Tabla 6), sin embargo, una búsqueda general nos arrojó diversos genes que podrían estar, adicionalmente, involucrados en la producción de EPS en el género, (Tabla 7), los cuales fueron descritos en otros géneros para la producción de EPS.

**Tabla 6.** Proteínas involucradas en la biosíntesis de EPS en el género *Idiomarina* por medio de la de la vía dependiente de Wzx/Wzy.

<b>Proteína</b>	<b>Producto</b>	<b>Organismo</b>
<b>Wzx</b>	Flipasa	<i>Idiomarina aestuarii</i> <i>Idiomarina sediminum</i>
<b>Wzy</b>	Polimerasa del polímero O-antígeno	<i>Idiomarina báltica</i> <i>Idiomarina fontislapidosi</i>
<b>Wza</b>	Proteína de exportación del polisacárido	<i>Idiomarina báltica</i> <i>Idiomarina atlántica</i> <i>Idiomarina halophila</i> <i>Idiomarina fontislapidosi</i> <i>Idiomarina sediminum</i> <i>Idiomarina aquimaris</i> <i>Idiomarina aestuarii</i> <i>Idiomarina woesei</i> <i>Idiomarina marítima</i>
<b>Wzb</b>	Tirosina fosfatasa	<i>Idiomarina halophila</i>
<b>Wzc</b>	Tirosina quinasa	<i>Idiomarina báltica</i> <i>Idiomarina atlántica</i> <i>Idiomarina halophila</i> <i>Idiomarina fontislapidosi</i> <i>Idiomarina aquimaris</i> <i>Idiomarina aestuarii</i>
<b>WzzB</b>	Proteína determinante de la longitud de la cadena LPS-O antígeno	<i>Idiomarina loihiensis</i> GSL 199
	Proteína de biosíntesis de lipopolisacáridos	<i>Idiomarina zobelli</i>

**Tabla 7.** Proteínas involucradas en la síntesis de EPS en el género *Idiomarina*, mencionadas en otros géneros.

<b>Gene</b>	<b>Producto</b>	<b>Organismo</b>
exoD	Proteína de biosíntesis de exopolisacáridos	<i>Idiomarina sp H105</i> <i>Idiomarina sp. WRN-38</i>
EpsB2	Biosíntesis de exopolisacáridos polipropilenglucosil fosfotransferasa	<i>Idiomarina</i> <i>Idiomarina tainanensis</i> <i>Idiomarina woesei</i>
EpsB2	Azúcar transferasa	<i>Idiomarina xiamenensis</i> <i>Idiomarina planktonica</i>
YjbH	Proteína de biosíntesis de exopolisacáridos (lipoproteína de membrana externa)	<i>Idiomarina fontislapidosi</i> <i>Idiomarina aquatica</i> <i>Idiomarina ramblicola</i> <i>Idiomarina sp</i> <i>Idiomarina báltica</i> <i>Idiomarina marítima</i> <i>Idiomarina tainanensis</i> <i>Idiomarina indica</i> <i>Idiomarina atlántica</i>
	Biosíntesis de exopolisacáridos polipropilenglucosil fosfotransferasa	<i>Idiomarina seosinensis</i>
	Biosíntesis de exopolisacáridos polipropilenglucosil fosfotransferasa Azúcar transferasa bacteriana; pfam02397)	<i>Idiomarina xiamenensis 10-D-4</i> <i>Idiomarina planktonica</i>
	Exopolisacárido capsular (tirosina quinasa)	<i>Idiomarina woesei</i>
GfcC	Síntesis de polisacáridos	<i>Idiomarina loihiensis</i> <i>Idiomarina piscisalsi</i> <i>Idiomarina zobelli</i> <i>Idiomarina abyssalis</i>
OtnB	Proteína determinante de la longitud de la cadena LPS-O antígeno	<i>Idiomarina xiamenensis</i>

## 2.6 Antecedentes directos.

En el marco del proyecto integral del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGOM), el objetivo de este proyecto global es el de establecer una línea base de las condiciones biogeográficas de esta área marina para responder en el futuro ante posibles contingencias por derrames de petróleo. El laboratorio de Biotecnología Ambiental de la UAEM participa en el CIGOM. En este proyecto sitios seleccionados en el Golfo de México fueron muestreados a distintas profundidades, incluyendo los sedimentos marinos. Las muestras colectadas se procesaron en el laboratorio para aislar y purificar bacterias cultivables. La identificación de los aislados bacterianos se realiza con un enfoque polifásico. Uno de los objetivos es aislar y caracterizar bacterias marinas productoras de BS. De esta forma se han encontrado aislados bacterianos con capacidad de producir BS. En particular, la cepa de *Idiomarina* sp B7H2 fue aislada e identificada de muestras de sedimentos marinos con presencia de hidrocarburos a 1210 m. Experimentos previos demuestran que presenta una reducción del 25.43% de la tensión superficial, así como una emulsión del 68.46%. Adicionalmente, no presenta actividad hemolítica y la prueba de CTAB fue negativa. (Bertrand B; Morales-Guzmán D. Rosas-Galván N. Datos sin publicar).

**Tabla 8.** Cepas aisladas del Golfo de México en el laboratorio de Biotecnología ambiental-Ceib

Cepa	Tensión superficial (% reducción)	Emulsión (%)	Hemólisis	CTAB	Swarming	Secuencia Identificada (%)
<i>Idiomarina</i> sp	25.43	68.43	-	-	++	99
<i>Enterobacter</i> sp	58.7	47.5	-	-	+	98
<i>Bacillus</i> sp	40.57	30.33	+	-	+	97
<i>Pseudomonas</i> sp	32.13	38.2	-	+	+	99
<i>Thalassospira</i> sp	7.55	71.19	+	-	+	95

Bertrand, Morales-Guzmán D., Curiel Maciel, etc. (Datos sin publicar)



### III. Justificación.

La tendencia global para la búsqueda de nuevos productos con aplicaciones y usos novedosos respetando la integridad o estabilidad de los ambientes se ha visto impulsada positivamente por los efectos del cambio climático. El descubrimiento de materias primas baratas y renovables como plataforma para la producción o desarrollo de precursores de energías o materiales verdes son las nuevas fronteras que están agrupando esfuerzos en el mundo para hacer un uso eficiente de los recursos tratando de no alterar los balances biogeoquímicos de nuestro planeta.

Actualmente se estudian cientos de microorganismos provenientes de diferentes ambientes que se consideran extremos como el marino, con características únicas que los hacen candidatos idóneos a producir algún metabolito o molécula que pueda tener interés y aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria, biotecnológica, petrolera, etc. Una de las dificultades y oportunidades de trabajar con estos organismos es su manejo en el laboratorio, ya que no todos pueden ser cultivables, así el primer reto es aislar de forma viable a organismos de los distintos nichos que se presentan en el ambiente marino.

Los exopolisacáridos poseen principalmente actividad emulsificante, existen diversos géneros bacterianos productores de estos, sin embargo aún hay géneros que han sido poco estudiados en el ámbito como es el género de *Idiomarina*.

## **IV. Hipótesis.**

La cepa *Idiomarina* B7H2 tendrá un clúster de genes el cual estará relacionado con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.

## **V. Objetivos.**

### **5.1 Objetivo general.**

Caracterizar polifásicamente la cepa *Idiomarina* B7H2 e identificar los genes implicados en la producción de EPS.

### **5.2 Objetivos particulares.**

- 1) Caracterización polifásica (morfológica, bioquímica y genómica) de la cepa *Idiomarina* B7H2.
- 2) Obtención del exopolisacárido.
- 3) Buscar e identificar los genes involucrados en la producción de EPS.

## VI. Metodología

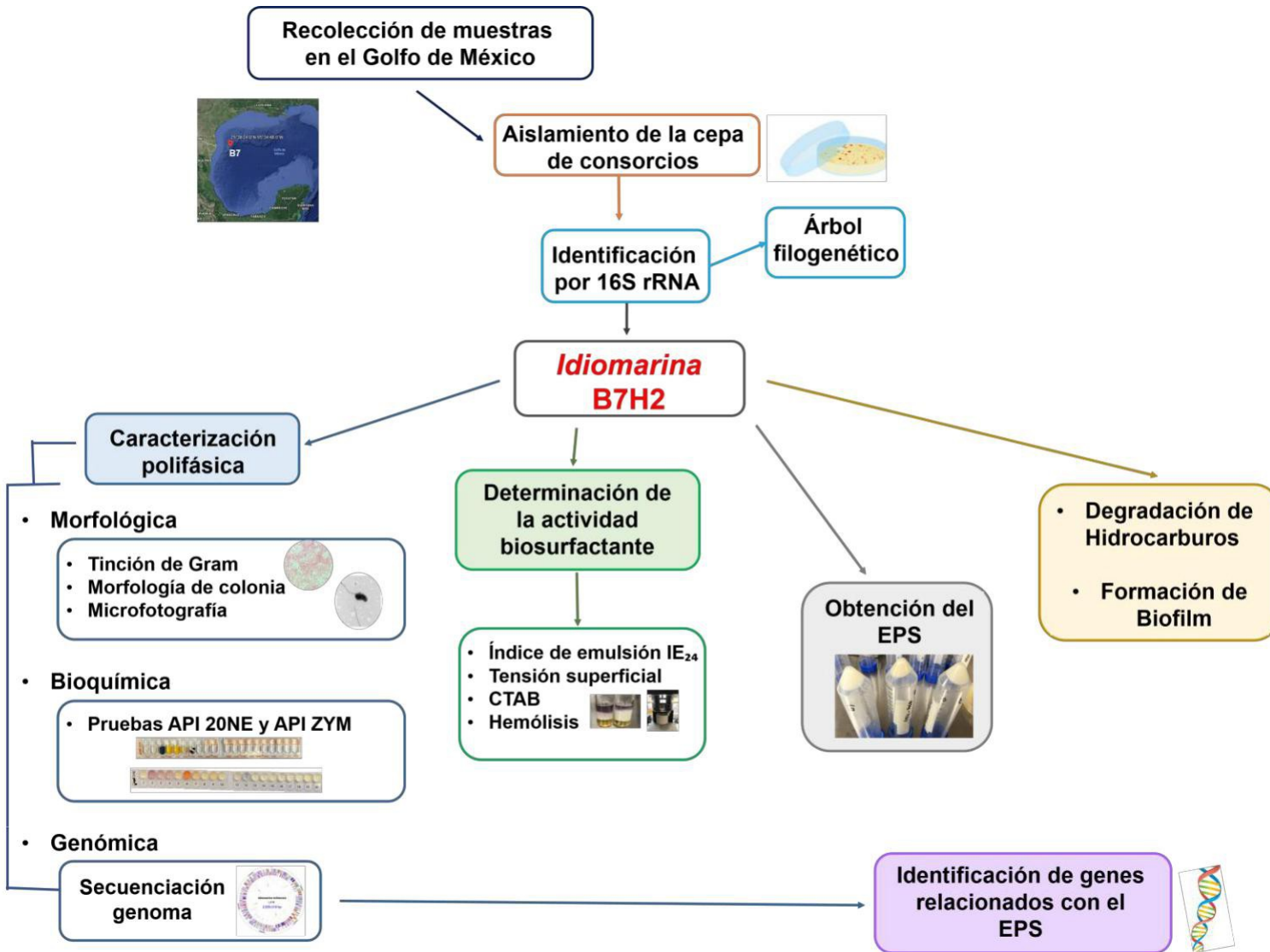


Figura 9. Diagrama del diseño experimental

## 6.1 Aislamiento de la cepa.

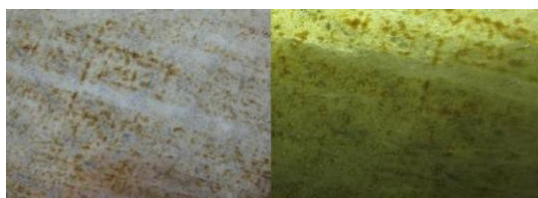
La cepa *Idiomarina* fue aislada de un consorcio B7 crecido en petróleo que proviene de una muestra de sedimento situado en la región del Cinturón de Perdido (coordenadas 25°38'24" N 95°34'48" W) en el Golfo de México. Esta muestra fue tomada a una profundidad de 1210 m con las siguientes características fisicoquímicas: 4.3°C de temperatura, concentración de oxígeno de 6.58 ppm y una concentración de sales de 34.96 pso.

Para su aislamiento se tomó 1 ml de la muestra original de sedimentos, el cual fue sembrado en 20 ml de medio marino, que contiene 40 g/L de sal marina, 0.5 g/L de peptona y 0.25 g/L de extracto de levadura y se les agregó 500 µl de aromina. Los cultivos fueron incubados durante dos meses a 20°C con agitación constante de 70 rpm (Bertrand *et al*, datos sin publicar)

Posteriormente, en cajas de medio marino, adicionado con 1 ml de petróleo y 1 ml de Tween-80, se le añadieron 10, 50, 100 y 200 µl de cultivo, se dejaron crecer a temperatura ambiente. Después de 4 semanas se observó la aparición de colonias. Para purificar la colonia se realizaron transferencias continuas en medio sólido hasta obtener colonias homogéneas.

Para su identificación, se realizó una tinción de Gram de la colonia para verificar a nivel microscópico la pureza. Se prepararon criotubos con glicerol al 20% final para almacenar la cepa a -80°C. Se preparó el ADN genómico de la cepa y se mandó a secuenciar la región V3-V4 del gen ribosomal 16S. El servicio de secuenciación de la compañía Macrogen utiliza los primers universales para bacteria:

27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')      primer Forward  
1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3')      primer Reverse



**Figura. 10** Medio de cultivo con petróleo. Los puntos indican las colonias. (Brandt-Bertrand)

## **6.2 Caracterización polifásica.**

### **6.2.1 Microbiológica.**

**Medio de cultivo:** Para todos los parámetros la cepa de *Idiomarina* B7H2 se creció en medio marino (caldo de soya de tripticaseina 30 g/l, dextrosa 2.5 g/l, extracto de carne 1.2 g/l, sulfato de amonio 1.2 g/l y cloruro de calcio 1.2 g/l y 5 g/l de sal marina).

#### **6.2.1.1 Caracterización morfológica:**

La cepa se sembró en caja con medio marino y se dejó crecer 48 horas a una temperatura de 25°C, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: forma de la colonia, bordes, elevación, tipo de superficie, color y consistencia.

#### **6.2.1.2 Tinción de Gram:**

Para determinar si era una bacteria Gram negativa o positiva se realizó una tinción de Gram, para lo cual la cepa se sembró en caja con medio marino y se dejó crecer 24 horas, posteriormente se tomó una colonia y por medio de calor se fijó en un portaobjetos para ser teñida por medio de los siguientes pasos:

1. Se añadió cristal violeta, después se incubó 30 segundos y se enjuagó con agua destilada.
2. Se añadió lugol, se incubó 30 segundos y se enjuagó con agua destilada.
3. Se colocó alcohol-cetona 70-30% durante 30 segundos y se enjuagó con agua destilada.
4. Se añadió safranina durante 30 segundos y se enjuagó con agua destilada, posteriormente se dejó secar.
5. Una vez seca la muestra teñida, se procedió a su observación al microscopio óptico a 100x.

#### **6.2.1.3 Observación en el microscopio electrónico:**

Para la observación de la cepa se hizo un cultivo en 20 ml de medio marino a 160 rpm, se dejó crecer 12 horas a 25°C y se llevó al servicio de microscopía en el

Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se hizo la preparación con ayuda de la encargada, la observación se hizo en un microscopio electrónico.

### **6.2.2 Pruebas Bioquímica (API).**

A la cepa de *Idiomarina* B7H2 se le realizaron las pruebas bioquímicas para determinar el perfil metabólico y perfil enzimático que presenta, por medio de las pruebas API 20NE y API ZYM (Biomeriux, Francia).

#### **6.2.2.1 Prueba API 20NE.**

Las pruebas API 20NE permiten la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias.

1. Se sembró la cepa *Idiomarina* B7H2 en cajas con medio marino y se dejó incubando por 14 horas a 25°C, posteriormente se tomó una colonia aislada y se colocó en un tubo con 4 ml de solución salina al 0.85%. se le dio vortex para homogeneizar.
2. Se midió la densidad óptica (DO) hasta alcanzar una turbidez entre 0.08-0.13 de absorbancia, equivalente al 0.5 McFarland.
3. Se repartieron 5 ml de agua destilada estéril en la cámara de incubación y se procedió al llenado de la galería. Desde la cúpula NO<sub>3</sub> hasta PNPG, con la mezcla obtenida en el paso anterior.
4. Se abrió una ampolla de API AUX médium, se le agregaron 2 ml de la solución previa, se homogeneizaron y se llenaron las cúpulas de GLU hasta PAC.
5. Se dejó incubar por 24±2 horas a 29°C.
6. Pasado el tiempo se hizo la lectura de la galería y se realizaron las pruebas adicionales para su caracterización e interpretación, posteriormente se anotaron los resultados.

#### **6.2.2.2 Prueba API ZYM.**

La prueba API ZYM (BioMerieux) es utilizada para la determinación de las actividades enzimáticas que puede presentar las bacterias.

1. La cepa se sembró en cajas con medio marino y se incubó durante 14 horas a 25°C.
2. Se tomaron varias colonias aisladas y se colocaron en solución salina al 0.85%, se le dio vortex para homogeneizar .
3. Se midió la DO hasta alcanzar una absorbancia de 1 el equivalente a 2 McFarland. Se tomaron 65 µl de esta solución y se depositaron en cada una de las cúpulas que componen la galería.
4. Se repartieron 5 ml de agua destilada estéril en la cámara de incubación y se colocó la galería en ella.
5. Se dejó incubar por 4 horas a 29°C.
6. Se hizo la lectura de la galería adicionando una gota del reactivo API ZYM A y B en cada cúpula y se dejó incubar durante 5 minutos, se realizó la lectura e interpretación para anotar los resultados.

### **6.2.3 Análisis genómico.**

Se obtuvo el ADN genómico por medio de su extracción con el Kit DNA isolation for cells and tissues, ref. 11814770001, Roche-applied -scienc.com.

Procedimiento:

- 1) La cepa *Idiomarina* B7H2 fue crecida durante 18 horas a 25°C en 20 ml de medio marino al .5% de sales marinas.
- 2) Se tomaron 1.5 ml del cultivo y se colocaron en un tubo de 1.5 ml (triplicado).
- 3) Se centrifugaron a 14000 rpm 2 minutos (temperatura ambiente) para separar la biomasa, se retiró el sobrenadante y se le dio un vortex para desprenderla del tubo.
- 4) Se añadieron 30 µl de proteasa a los tubos.
- 5) Se adicionaron 450 µl de buffer de lisis y se colocaron 30 minutos a 55°C en el thermoblock.
- 6) Se colocaron de nuevo a temperatura ambiente, se añadieron 20 µl de RNAsa y se les dio vortex durante 1 minuto.
- 7) Se colocaron 30 minutos a 37°C en el thermoblock.

- 8) Se retiraron los tubos a temperatura ambiente, se colocaron 10 µl de RNAsa (10 µl/mg) y se les dio un vortex durante 1 minuto.
- 9) Los tubos fueron colocados nuevamente durante 30 minutos a 37°C en el thermoblock.
- 10) Los tubos se retiraron y fueron puestos nuevamente a temperatura ambiente, se les adicionaron 180 µl de solución para precipitar proteínas y se les dio vortex durante 1 minuto.
- 11) Se colocaron los tubos 50 minutos en hielo.
- 12) Pasado el tiempo se centrifugaron a 14000 rpm 20 minutos.
- 13) Añadir 473 µl de isopropanol y centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.
- 14) Secar en centrífuga con vacío para quitar los remanentes de etanol durante 15 minutos.

El ADN de *Idiomarina* B7H2 purificado fue enviado a la compañía de Macrogen, utilizando la plataforma de PacBio para la secuenciación de su genoma, una vez que se obtuvieron los datos, se hizo la anotación del genoma para determinar el tamaño e identificar los genes de interés, así como otros de importancia relacionados con enzimas o metabolitos. La identificación de genes involucrados con la producción de EPS se hizo mediante la comparación de genes homólogos que ya estén reportados en la literatura para otros organismos por medio de las bases de datos existentes como GenBank de NCBI por medio de un BLAST y otros programas como antiSMASH, UNIPROT, KEGG

#### **6.2.4 Tolerancia a la concentración de NaCl.**

Para determinar la concentración de NaCl que tolera la cepa *Idiomarina* B7H2 se realizó una cinética de crecimiento en 100 ml de medio marino adicionado con NaCl (25, 50, 75 y 100 g/l) a 25°C y 160 rpm durante 5 días por triplicado, partiendo de un inóculo de 0.05. Se midió cada 24 horas.



### **6.2.5 Determinación del rango de temperatura de crecimiento.**

Para determinar el rango de temperatura la cepa *Idiomarina* B7H2 fue crecida en 20 ml de medio marino a 25°C a 160 rpm durante 12 horas (overnight), posteriormente se sembró en placas de agar marino al 0.5% de sales marinas, se incubaron durante 24 horas a 5, 15, 25, 33, 41, 45 y 47°C para determinar el rango de crecimiento.

### **6.2.6 Determinación del rango de pH de crecimiento.**

Para determinar el rango de pH de la cepa *Idiomarina* B7H2 fue crecida en 20 ml (triplicado) de medio marino al 0.5% de sales a 25°C, 160 rpm durante 120 horas, se tomó muestra cada 24 horas partiendo de una DO de 0.05, se ajustó el pH a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

### **6.3 Determinación de la actividad biosurfactante.**

Se realizó un cultivo en medio marino, se dejó crecer 48 h a 25°C y 160 rpm, se realizaron las pruebas de CTAB y actividad hemolítica, las cuales se utilizan como prueba de screening para la determinación de biosurfactantes.

#### **6.3.1 CTAB:**

La placa de agar con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 0.02%, es un método para la detección de biosurfactantes aniónicos tipo glicolípidos y fue establecido en 1991 por Siegmund y Wagner.

1. A una placa de agar CTAB se le agregaron 20 µl de muestra (sobrenadante, sobrenadante/biomasa y biomasa).
2. Se incuban 48 h a 30°C, al pasar este tiempo se guardaron a 4°C para la determinación del color.

La prueba se considera positiva si el halo que se forma alrededor de las colonias es de color azul oscuro, ocurrida debido a la interacción de los componentes aniónico y catiónico.

### **6.3.2 Actividad Hemolítica:**

Para la determinación de la actividad hemolítica se utilizó medio marino, adicionado con el 5% de sangre.

1. A una placa de agar marino con sangre se le añadieron 20  $\mu$ l del cultivo.
2. Se incubaron por 48-72 h a 30°C.

Se considera positiva cuando ocurre una hemólisis beta al lizar completamente los eritrocitos (hemólisis total) y el halo que rodea a las colonias es transparente.

### **6.3.3 Tensión superficial e índice de emulsión.**

Se realizó una cinética de crecimiento durante 9 días por triplicado en 500 ml de medio marino y se creció a 5°C, 15°C y 25°C a 160 rpm, se partió de una DO de 0.05. Se tomaron 5 ml cada 24 horas, de los cuales se utilizó 1 ml para medir densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm y los 4 ml restantes se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto para eliminar biomasa y medir tensión superficial y emulsión.

#### **6.3.3.1 Tensión superficial.**

La tensión superficial se midió con un tensiómetro de superficie (Krüss modelo K20S). Se tomaron 4 ml de cultivo libre de células, las cuales se colocaron en un visel de vidrio y se tomó el agua como control para calibrar el equipo. Se midió la tensión superficial en dinas/cm.

#### **6.3.3.2 Índice de emulsión (IE24).**

La emulsión es la mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí, un bioemulsificante estabiliza esta reacción. Para determinar la emulsión:

1. Se tomaron 2 ml del sobrenadante previamente centrifugado para eliminar las células y se colocaron en un tubo de ensayo.
2. Se le agregaron 3 ml de queroseno y se agitó en el vortex durante dos minutos.
3. Se dejó estabilizar/incubar durante 24 horas.

El índice de emulsión se calculó dividiendo la altura de la zona emulsionada entre la altura del líquido total, y se multiplicó por 100 (Modificado de Satpute *et al.*, 2008).

#### **6.4 Determinación de la temperatura 5, 15 y 25°C sobre crecimiento y producción de EPS.**

Se realizó una cinética de crecimiento en 1.2 L de medio marino al 1% de glucosa y 0.5% de sales, por triplicado a 5, 15 y 25°C, se midió cada 24 horas, posteriormente se tomaron 10 ml en cada muestra para determinar el crecimiento, el índice de emulsión IE<sub>24</sub> y producción de EPS.

#### **6.5 Obtención del EPS.**

Se incubó la cepa *Idiomarina* B7H2 en 500 ml de medio marino al 0.5% de sales marinas, se creció durante 120 h a 5, 15 y 25°C, a 160 rpm partiendo de una DO de 0.05. La obtención del EPS se realizó por medio de la modificación del protocolo de Mata 2006.

1. Centrifugar 30 minutos a 4200 rpm 4°C para eliminar la biomasa, conservando el sobrenadante.
2. Al sobrenadante se le adicionaron 3 volúmenes de etanol frío al 96% y se dejaron 15 h a 4°C.
3. Centrifugar 20 minutos a 3500 rpm 4°C y conservar el pellet. Este contiene el EPS, el cual se diluyó en tubos cónicos con agua.
4. Posteriormente fueron transferidos a una membrana de celulosa y se dejaron en diálisis durante 24 horas a 4°C con agitación para la eliminación de sales.
5. Pasadas las 24 horas se liofilizó durante 48 horas para eliminar los remanentes de agua, el producto obtenido es el EPS.

## 6.6 Formación de Biofilm.

Para la determinación de la formación de biofilm se modificó el protocolo de Coffey y Anderson 2014, se utilizaron diferentes cepas del laboratorio de Biotecnología Ambiental (*E. coli* DH5 $\alpha$  como control, *Sphingomonas sp*, *Bacillus* 12Cl, *Enterobacter* 27CH y las cepas de *Idiomarina* A3H2 y B7H2), se probaron 2 medios de cultivo diferentes (medio marino al 0.5% de sales y el medio M9, ambos en anexos).

1. Las cepas se crecieron en medio marino a 25°C durante 72 horas (fase estacionaria)
2. De estos cultivos se tomaron 100  $\mu$ l, se añadieron a 20 ml de medio marino y se dejaron crecer a 25°C a 160 rpm durante 24 horas.
3. Pasadas las 24 horas se tomaron 10  $\mu$ l y se diluyeron en 1 ml (1:100).
4. Se tomaron 100  $\mu$ l y se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos.
5. Se dejaron incubar durante 120 horas a 25°C.
6. Pasado el tiempo las placas se invirtieron para retirar las células y fueron enjuagadas dos veces con agua destilada estéril, dejar secar.
7. Se añadieron 150  $\mu$ l de cristal violeta (0.1%) e incubar durante 10 minutos.
8. Invertir la placa para retirar los líquidos, enjuagar dos veces con agua destilada estéril y secar.
9. Si hubo formación de biofilm se formarán halos color violeta, dejar secar toda la noche.
10. Añadir 150  $\mu$ l de ácido acético al 30%, incubar durante 10 minutos, homogeneizar y transferir 125  $\mu$ l a una nueva placa.
11. Medir la DO a 550 nm.

## 6.7 Experimentos de degradación de hidrocarburos.

Para determinar si la cepa de *Idiomarina* B7H2 tiene la capacidad de degradar hidrocarburos, se realizó una cinética de crecimiento (triplicado), se pesaron 200  $\mu$ l de petróleo, los cuales se agregaron como fuente de carbono y se incubaron 30 días.

Se creció en un matraz de 20 ml con 10 ml de medio marino a 25°C y 160 rpm, se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se obtuvo la biomasa, se diluyó en 1ml de medio mínimo para determinar la DO a 650 nm.

1. Se colocaron 9 matraces (triplicado del control abiótico, el medio con la cepa para tiempo inicial y final).
2. Para el tiempo inicial y final se inició la cinética con 0.05 de DO. Para el tiempo inicial, una vez que se tenía la densidad óptica en 0.05.
3. Se procedió a añadir HCL, para inactivar la biomasa y se dejó 24 horas a 4°C, después se le añadió diclorometano y se centrifugó a 4°C durante 25 minutos, posteriormente se recuperó el petróleo pasándolo por una columna, y se recuperó en viales previamente pesados.
4. El control abiótico (sin biomasa) y el cultivo de la cepa, se incubaron durante 30 días a 25°C, posteriormente se realizó lo descrito en el paso 3.
5. Una vez que se extrae el petróleo de todas las muestras, se procedió a analizarlas en el cromatógrafo de gases.
6. Una vez obtenidos los resultados, se analizaron.

## VII. Resultados y Discusión.

### 7.1 Caracterización polifásica.

#### 7.1.1 Microbiológica.

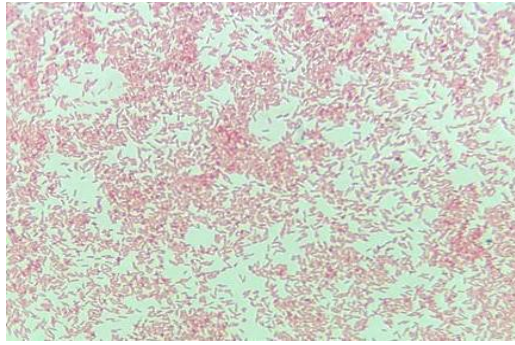
Las colonias de la cepa *Idiomarina* B7H2 presentan una forma circular de 2 mm de diámetro de color beige y una consistencia cremosa con una elevación moderada (Figura 11). Esta descripción concuerda con la reportada por Donachie y colaboradores en el 2003, siendo la única diferencia el tiempo de crecimiento de 24 horas. Las colonias cremosas (Figura 11) suelen ser indicio de producción de EPS (Sahana y Rekha., 2019; Trabelsi *et al.*, 2015; Mata *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Crecimiento en caja con medio marino 0.5% de sales marinas a las 48 horas 25°C de la cepa *Idiomarina* B7H2.

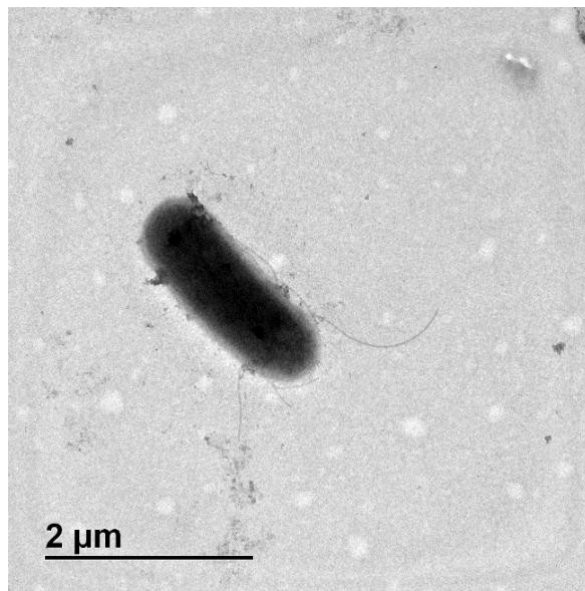
#### 7.1.1.1 Tinción de Gram y observación al microscopio.

La tinción de Gram nos demostró que la cepa *Idiomarina* B7H2 es una bacteria Gram negativa (Figura 12), lo cual coincide con todas las especies reportadas de este género (Zachariah y Das., 2017; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Jean *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2006; Donachie *et al.*, 2003).



**Figura 12.** Bacteria *Idiogramma* B7H2 Gram negativa vista en un microscopio óptico a 100X.

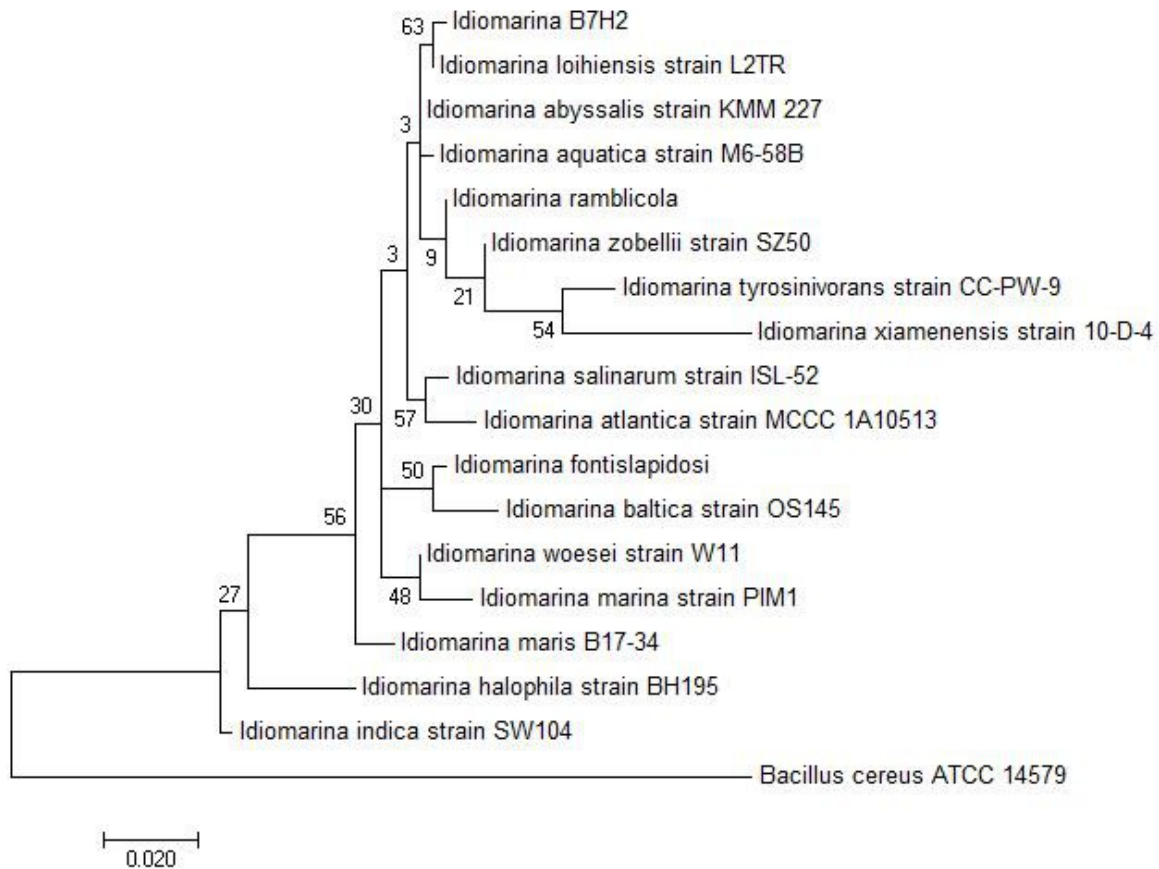
La observación en el microscopio electrónico determinó que las bacterias tienen forma de bacilos ligeramente curvados de 0.3-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.8-2.0  $\mu\text{m}$  de largo y presenta un flagelo polar largo (figura 13), el tamaño entre las especies varía ampliamente ya que se han reportado desde 0.3-0.9  $\mu\text{m}$  de ancho y de 0.7-4  $\mu\text{m}$  de largo (Hameed *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011; Ivanova *et al.*, 2004), son ligeramente curvadas (Hameed *et al.*, 2016), móviles que presentan un flagelo polar largo al igual que muchas de las especies ya reportadas (Hameed *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Donachie *et al.*, 2003).



**Figura 13.** Microfotografía de *Idiogramma* B7H2 a las 24 horas, crecido en medio marino al 0.5% de sales marinas.

### 7.1.1.2 Identificación del género.

La identificación del género se hizo por medio del análisis parcial de las regiones V3-V4 del gen 16S RNAr de aproximadamente 700 pb con las cuales se obtuvo una secuencia consenso (anexo 1), posteriormente se hizo un BLAST en el NCBI y se obtuvo una similitud de 99.56% con otras especies del género *Idiomarina*, obteniéndose el árbol filogenético (Figura 14) en donde se puede observar y corroborar que pertenece al género antes mencionado, siendo su pariente más cercano *Idiomarina loihiensis* quien presenta reporte de producir EPS (Huo *et al.*, 2004).



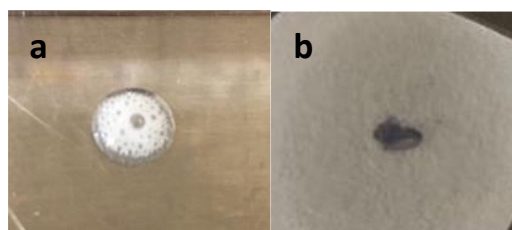
**Figura 14.** Árbol filogenético del género *Idiomarina*.



### 7.1.2 Caracterización bioquímica.

La caracterización bioquímica por medio de pruebas estandarizadas dio como resultado diferencias en algunos parámetros en comparación a los reportados para otras especies del género (tabla 8), fue positiva en catalasa, oxidasa, (figura 15a y 12b) al igual que en especies ya reportadas de *Idiomarina* (Zachariah y Das., 2017; Hameed *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Jean *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2006; Donachie *et al.*, 2003) reducción de nitratos, tiene la capacidad de asimilar gluconato potásico, ácido caprico, ácido málico, azúcares como D-glucosa, D-manitol, maltosa, los cuales pueden ser utilizados como precursores de la ruta metabólica de los EPS. Se obtuvieron resultados negativos en la asimilación de L-arabinosa, D-manosa y N-acetil glucosamina, no hidroliza urea, a diferencia de las ya reportadas (Anexo 4), se pudo observar que la variedad en los resultados demuestra la gran diversidad con la que cuenta el género, por lo tanto es complicado establecer características generales que deban compartir todos los miembros del género.

De igual manera se analizó otra cepa del género que se tiene en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, *Idiomarina* A3H2 aislada también del Golfo de México, encontrando diferencias notables entre ambas cepas, lo que nos hace suponer que podrían ser especies diferentes. En la Tabla 8 se recopila la información más significativa de la cepa *Idiomarina* B7H2 y se compara con otros miembros del género.



**Figura 15. a).** Pruebas bioquímicas de Catalasa positiva (+) **b)** oxidasa positiva (+) en *Idiomarina* B7H2.

**Tabla 9.** Comparación entre distintas especies del genero de *Idiomarina* **1)** *Idiomarina baltica*, **2)** *Idiomarina fostinlapidosi*, **3)** *Idiomarina A3H2* y **4)** *Idiomarina B7H2*.

	<i>Idiomarina baltica</i> <sup>1</sup>	<i>Idiomarina fostinlapidosi</i> <sup>2</sup>	<i>Idiomarina A3H2</i> <sup>3</sup>	<i>Idiomarina B7H2</i> <sup>3</sup>
Origen	Salina	Hábitat hipersalino	Golfo de México	Golfo de México
Tamaño celular (µm)	0.7-21.6x0.4-0.7	3-4x0.75	ND	1.8-2x0.3-0.6
Reducción de nitratos	-	-	+	+
Hidrolisis de Urea	+	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	+
Asimilación de:				
D-glucosa	ND	+	+	+
D-manosa	+	+	-	-
L-arabinosa	+	+	-	-
L-manitol	+	+	-	+
N-acetil-glucosamina	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+
Gluconato potásico	+	+	-	+
Ácido adípico	+	+	-	-
Ácido málico	-	+	-	+
Citrato trisódico	+	+	-	+
Ácido fenilacético	+	+	-	-
Actividad enzimática:				
Esterasa lipasa (C8)	+	-	+	+
Tripsina	+	+	-	+

<sup>1</sup> Brettar *et al.*, 2003.

<sup>2</sup> Martínez-Cánovas *et al.*, 2004.

<sup>3</sup> Laboratorio de biotecnología ambiental

### 7.1.3 Análisis genómico.

El genoma completo ensamblado de la cepa *Idiomarina* B7H2 fue determinado por medio del ensamblaje en la plataforma de RASS, es un cromosoma circular compuesto por 2, 976, 838 pb con un 46.8% en el contenido de G-C. El genoma contiene 2,775 secuencias que pueden ser candidatas a genes que codifiquen proteínas, se encontró un número de 68 RNAs (Tabla 9). El análisis por KEGG indica que la cepa de *Idiomarina* B7H2 posee genes involucrados en la síntesis de cofactores, vitaminas, pigmentos (203) esto estaría relacionado a que la cepa al cultivarse en medio líquido se observa color rosa (Anexo), tiene 8 genes para el metabolismo de compuestos aromáticos, se encontraron 161 genes involucrados con el metabolismo de los carbohidratos, lo cual se demostró por medio de las pruebas API en la utilización de algunos, entre otros de importancia como defensa (102), factores de virulencia y respuesta a estrés (126). En la Figura 16 se puede observar los resultados obtenidos del análisis. Al comparar el genoma de *Idiomarina* B7H2 con el de otras especies pertenecientes al género son similares (Tabla 10).

**Tabla 10.** Genomas de especies pertenecientes al género *Idiomarina*.

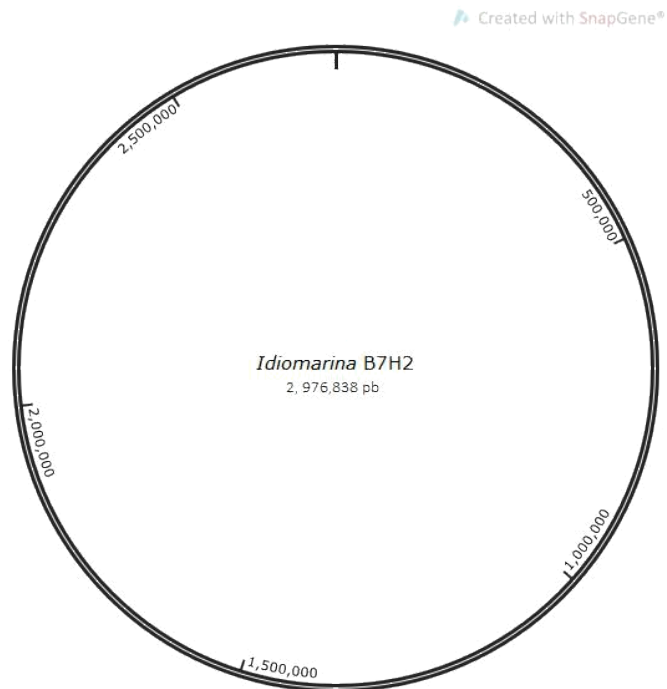
	<i>Idiomarina B7H2</i> <sup>1</sup>	<i>Idiomarina loihiensis</i> <sup>2</sup>	<i>Idiomarina sp A28L</i> <sup>3</sup>	<i>Idiomarina xiamenensis</i> <sup>4</sup>
<b>Tamaño del genoma</b>	2976838 pb	2839318 pb	2591567 pb	2899282 pb
<b>N. de genes</b>	2775	2722	2299	2673
<b>G+C</b>	46.8%	47.4%	45.5 %	49.48%

<sup>1</sup> En este estudio

<sup>2</sup>Hou *et al.*, 2004.

<sup>3</sup> Gupta *et al.*, 2011.

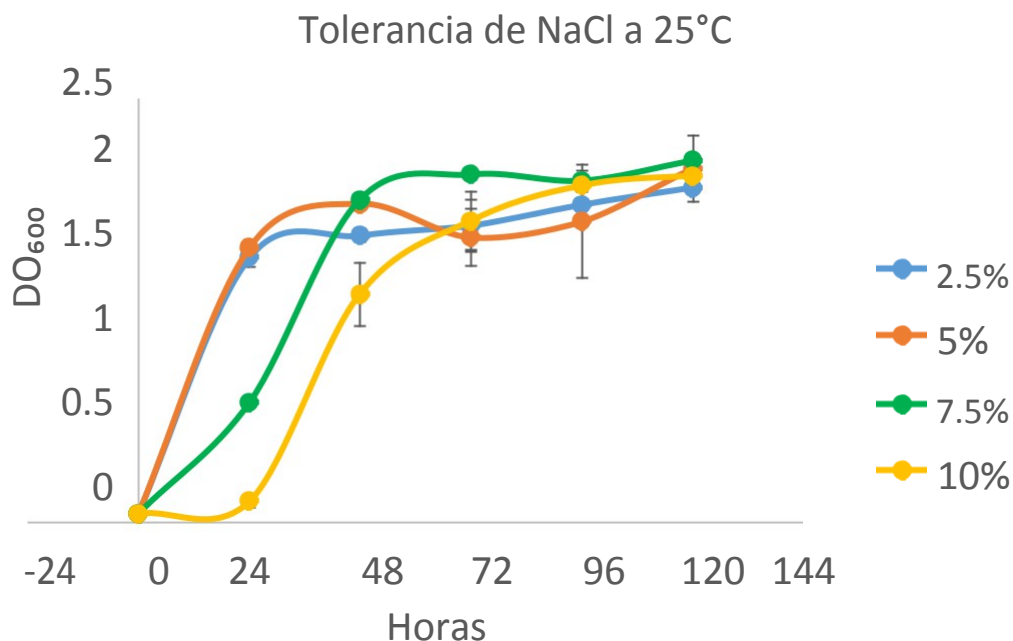
<sup>4</sup> Lal *et al.*, 2012



**Figura 16.** Mapa circular del genoma de la cepa *Idiomarina* B7H2

#### **7.1.4 Tolerancia a la concentración de NaCl.**

La cepa de *Idiomarina* B7H2 tiene la capacidad de crecer a diferentes concentraciones de NaCl. En la gráfica 1 se puede observar que crece desde una concentración del 2.5% hasta el 10%. A 2.5 y 5% el crecimiento es muy similar llegando a las 24 horas a la fase estacionaria y a 7.5% a las 48 horas, durante las primeras 24 horas al 10% se puede observar una fase de adaptación, alcanzando la fase estacionaria a las 72 horas. Distintos reportes indican que algunas especies del género pueden crecer en concentraciones desde 0% hasta 15% de NaCl, con una óptima de 7.5% (Hameed *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011; Donachie *et al.*, 2003), sin embargo pueden llegar a crecer hasta 20% (Huo *et al.*, 2004). La producción del EPS puede verse influenciada por cambios en la salinidad, al disminuir o incrementar la producción (Wang *et al.*, 2019). Esta condición de poder crecer en diferentes concentraciones de NaCl hace que se considere a los integrantes de este género como halófilas (Liu *et al.*, 2018)



**Gráfica 1.** Crecimiento de *Idiomarina* B7H2 en concentraciones 2.5, 5, 7.5 y 10% de NaCl a 25°C y 160 rpm

### 7.1.5 Determinación del rango de temperatura de crecimiento.

La cepa *Idiomarina* B7H2 creció a diferentes temperaturas, se observó que tiene la capacidad de crecer desde los 5°C hasta los 45°C (Tabla 11) por lo tanto se le puede considerar como un organismo mesofilo (Liu *et al.*, 2018), esto concuerda con lo ya reportado para otras especies del género, por ejemplo *Idiomarina tyrosinivorans* crece en un rango de 20-40°C (Hammed *et al.*, 2016), el cual difiere con el que se encontró en este estudio para *Idiomarina* B7H2, con un rango de 5-45°C. Sin embargo se pudo observar que la morfología de las colonias no es igual en las diferentes temperaturas (anexo 2).

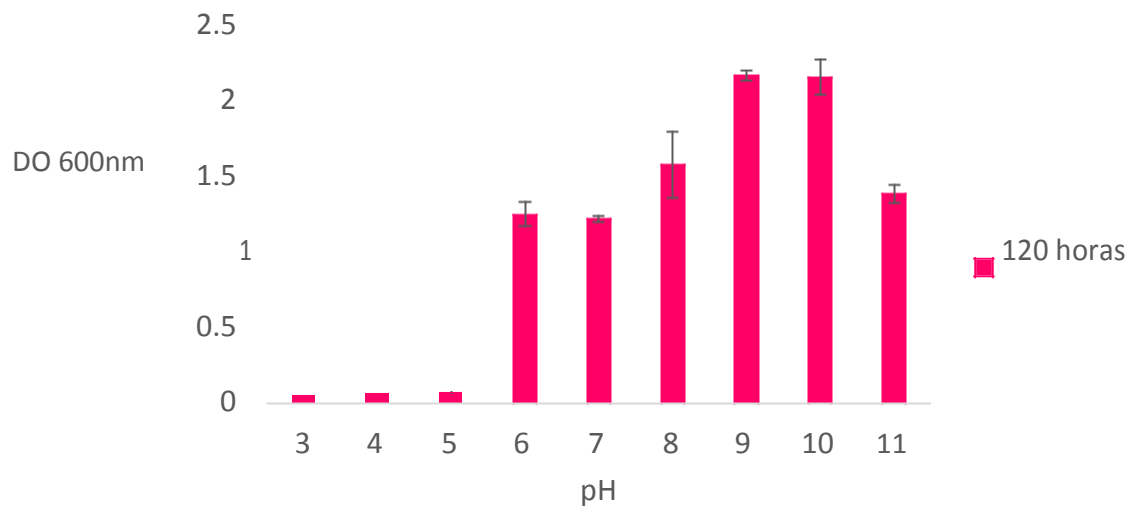
**Tabla 11.** Crecimiento de la cepa *Idiomarina* B7H2 a diferentes temperaturas durante 12 horas. (+) se observa crecimiento, (-) no se observa crecimiento.

Temperatura °C	Crecimiento
5	+
15	+
25	+

33	+
41	+
45	+
47	-

### 7.1.6 Determinación del rango de pH de crecimiento.

La cepa *Idiomarina* B7H2 se creció en diferente pH, (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) a 25°C, se observó que es capaz de crecer en todos los valores de pH ensayados, sin embargo a menor pH (3, 4, 5) la cepa creció poco, contrario a lo ocurrido a mayor pH fue incrementando en cuanto a crecimiento (6-10), sin embargo a un pH de 11 empieza a decrecer nuevamente (Gráfica 2). La cepa *Idiomarina* B7H2 presenta similitudes con otras cepas, *Idiomarina tyrosinivorans* (6-9) (Hammed *et al.*, 2016), *Idiomarina andamanensis* (6-10) (Zachariah y Das., 2017), ambas presentan un crecimiento óptimo de pH entre 6-9 de manera similar a la cepa de este estudio (Gráfica 2).

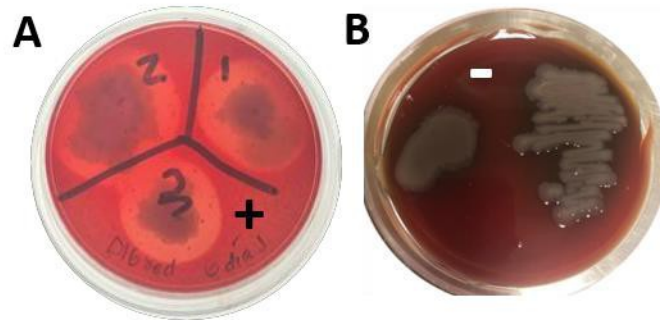


**Gráfica 2.** Crecimiento de la cepa *Idiomarina* B7H2 a diferente pH (3-11), a 25°C durante 120 horas a 160 rpm.

## 7.2 Determinación de la actividad biosurfactante.

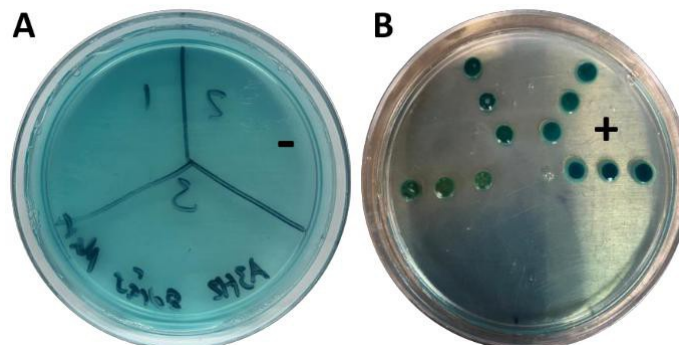
### 7.2.1 Actividad hemolítica y CTAB.

La prueba de actividad hemolítica dio negativa (figura 17), por lo tanto la cepa no tiene la capacidad de lisar eritrocitos.



**Figura 17.** Actividades hemolítica A) aislado del Golfo de México positivo (+) B) *Idiomarina* B7H2 negativa (-). Crecidas en agar sangre.

La cepa *Idiomarina* B7H2 dio positiva hacia la prueba de agar CTAB después de las 72 h a 25°C, estudios en bacterias halófilas o géneros extremófilos, demuestran que algunas de ellas tienen la capacidad de sintetizar ácido urónico el cual posee carga negativa (Wang *et al.*, 2019), lo cual podría estar relacionada a que la cepa nos diera positiva (Figura 18).



**Figura 18.** Agar CTAB A) Cepa *Idiomarina* A3H2 negativo (-) B) Cepa *Idiomarina* B7H2, después de 72 horas a 25°C. El color azul indica positivo.

### 7.2.2 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de Bs.

**Crecimiento:** se pudo observar que a 5°C se tiene un tiempo de duplicación más lento en comparación a 15°C y 25°C (tabla 12), sin embargo al día 6 alcanza un crecimiento muy similar a estos, en estudios de otras especies de *Idiomarina* consideran que aunque tiene un amplio rango de crecimiento, el ideal para su manipulación en el laboratorio es entre los 25 y 30°C (Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Donachie *et al.*, 2003) como se puede observar en la gráfica 3 coincide con esto.

**Tabla 12.** Tiempo de duplicación de *Idiomarina* B7H2, a las temperaturas de 5°, 15° y 25°C.

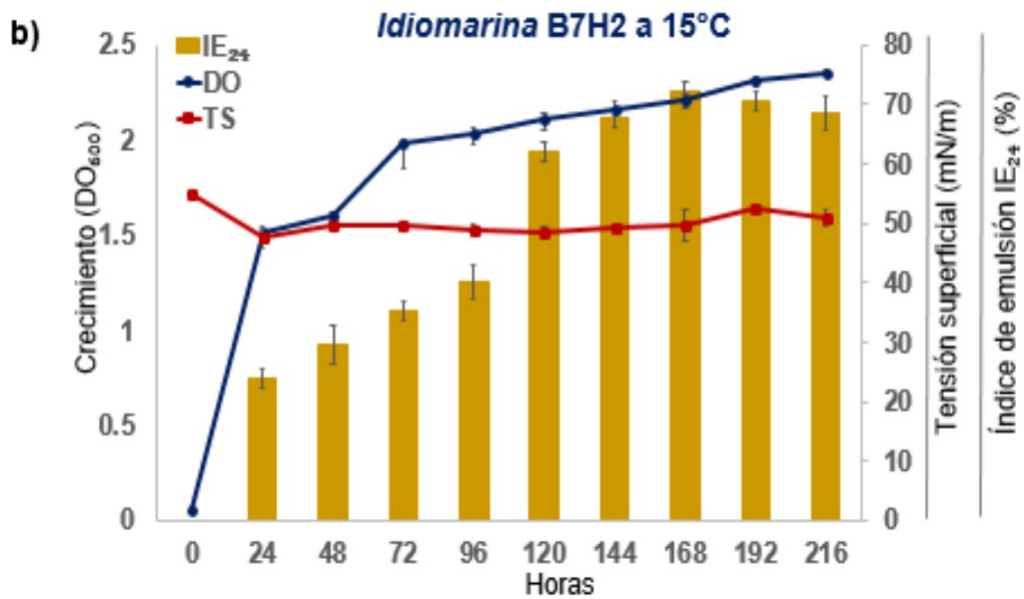
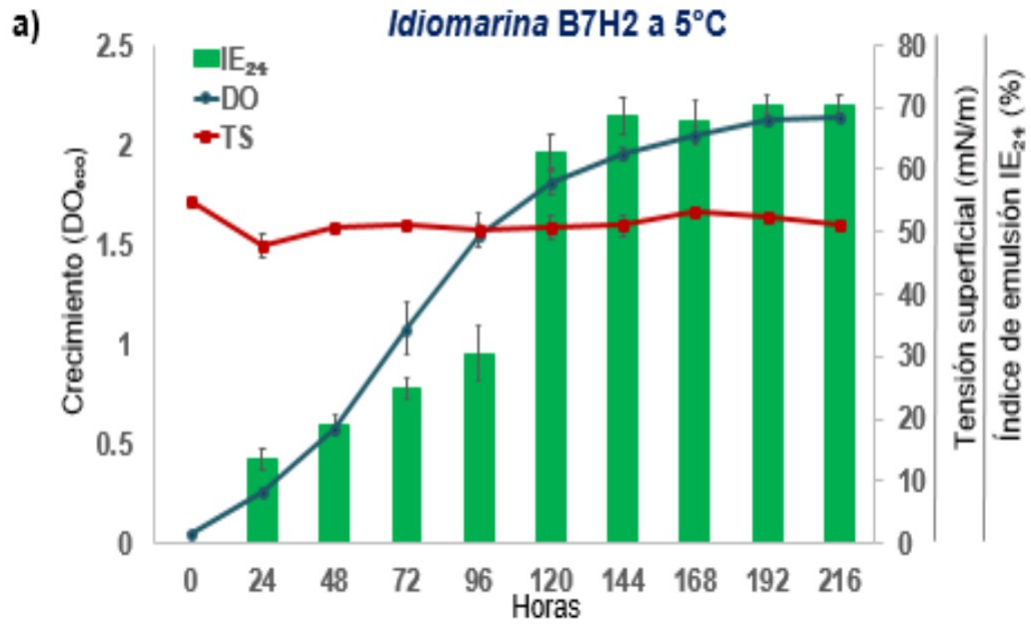
	5°C	15°C	25°C
<b>M</b>	0.0249 hrs <sup>-1</sup>	0.1423 hrs <sup>-1</sup>	0.1364 hrs <sup>-1</sup>
<b>Td</b>	27.86 hrs	4.8710 hrs	5.0817 hrs

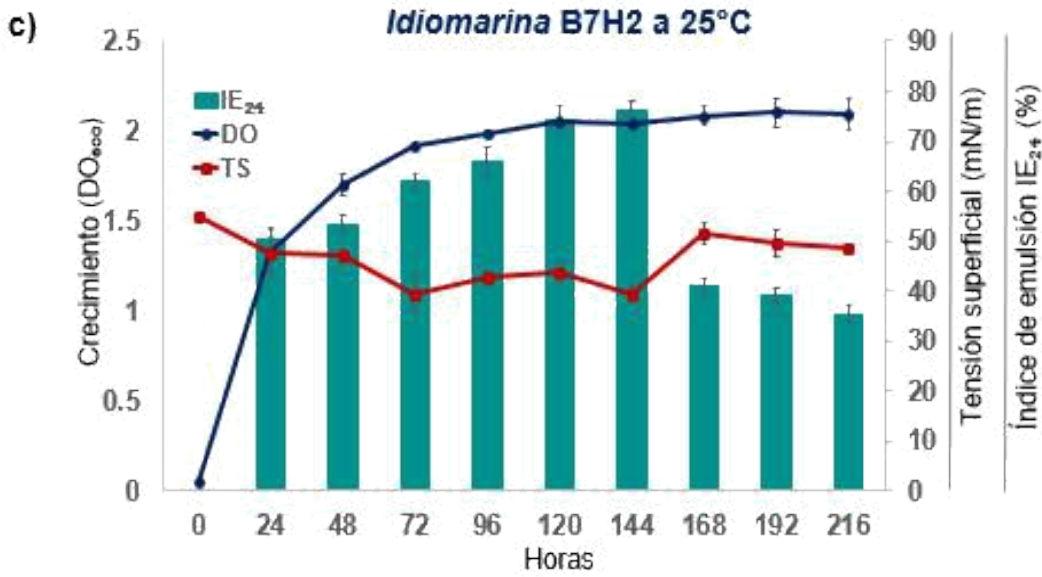
**Emulsión:** Se determinó que la cepa *Idiomarina* produce emulsión desde las 24 horas, (Gráfica 3). A 25°C se da la emulsión más alta y va aumentando hasta llegar al 76% (día 6), posteriormente disminuye hasta el 35%, esto debido a que conforme pasa el tiempo y su rápido crecimiento empieza a reutilizar los productos de su metabolismo. A 15°C la emulsión va aumentando conforme el paso de los días hasta llegar al punto máximo del 72% y mantenerse estable, a 5°C la emulsión va observándose de una manera muy similar a los 15°C en cuanto al aumento de la misma, hasta llegar a un máximo del 70% y mantenerse ahí. La presencia de la emulsión podría estar ligada al crecimiento de la bacteria, ya que presenta un comportamiento muy similar, a excepción de los 15°C. Estudios previos indican que es en la fase estacionaria donde la mayoría de las bacterias producen muchos de los EPS (Nichols *et al.*, 2005), sin embargo se puede observar que presentan emulsión desde la fase exponencial.

**Tensión superficial:** Se observa que a 5°C y 15°C la tensión no disminuye, y a 25°C disminuye, mientras que en el día 7 vuelve a aumentar lo cual podría estar dado por el crecimiento de la cepa, al consumir la fuente de carbono. En la literatura se puede encontrar que los bioemulsificadores (BE) no necesariamente



disminuyen la tensión superficial como lo hace un biosurfactante BS (Rosenberg y Ron., 1999), lo cual se comprueba con nuestra cepa.





**Gráfica 3.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de Bs de la cepa *Idiomarina* B7H2 a) 5°C b) 15°C c) 25°C.

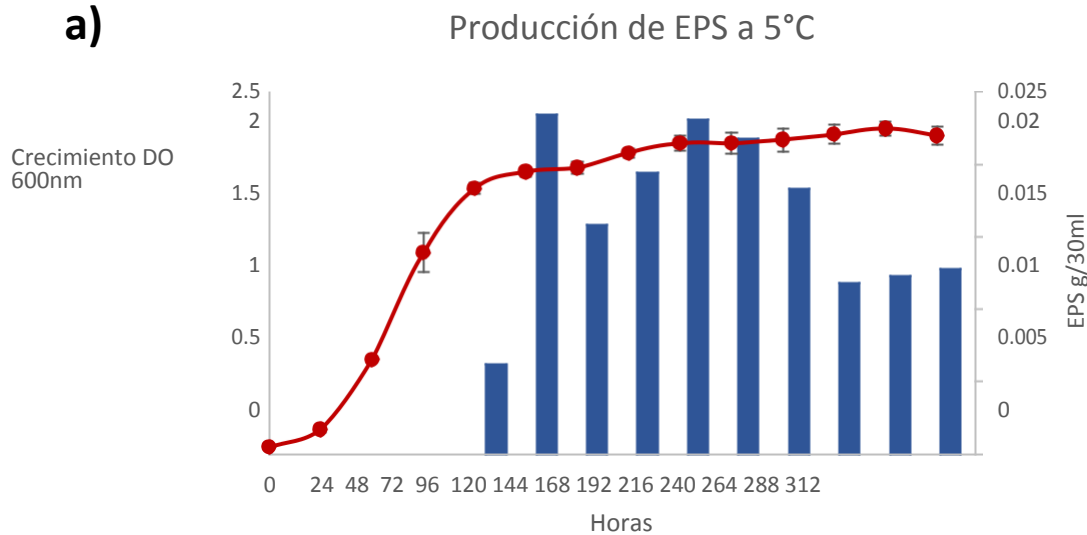
### 7.2.3 Efecto de las temperaturas 5, 15 y 25°C sobre la producción de EPS.

La temperatura ideal para el crecimiento de la cepa *Idiomarina* B7H2 es a los 25°C, el cual concuerda con los rangos óptimos de crecimiento, (Zhang *et al.*, 2012; Donachie *et al.*, 2003). Tiene un crecimiento más rápido en comparación de las otras temperaturas (5, 15°C), sin embargo se ha encontrado que la temperatura influye en la producción del EPS (Alvarado., 2015). La producción del EPS se da en la fase estacionaria del crecimiento (Ates., 2015; Schiano *et al.*, 2003), sin embargo, se ha demostrado que puede darse desde la fase exponencial (Alvarado., 2015). La temperatura podría estar fuertemente relacionada con el comportamiento del EPS.

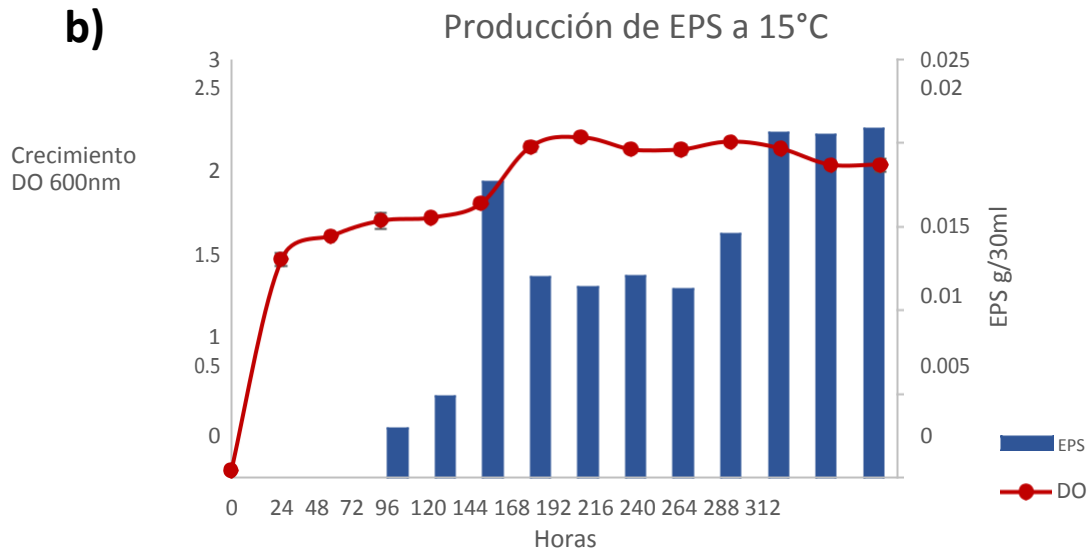
La cepa *Idiomarina* B7H2 crece de una forma muy rápida a 25°C, por lo cual se puede ver que a las 168 horas entra a la fase de muerte, contrario a lo que ocurre a 15, y 5°C en donde el crecimiento es más lento y la fase estacionaria tarda más horas. En la gráfica 4c se puede observar cómo a partir de las 24 horas a 25°C comienza la producción de EPS, lo cual coincide con el índice de emulsión (figura

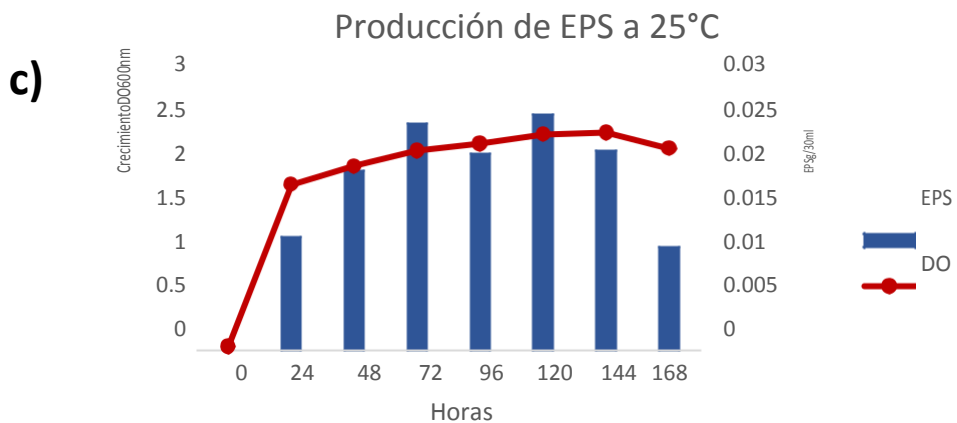
19c). Algunos autores afirman que la producción del EPS se ve favorecida por el crecimiento lento (Sutherland., 2001), como se observa a 5°C. A las 120 h en las diferentes temperaturas se puede notar que la producción del EPS es muy similar, con una producción de 0.02 g/30 ml aproximadamente, sin embargo, se puede ver que se comporta de diferentes maneras a lo largo del tiempo, existen reportes donde se sabe que al EPS pueden estar unidas proteínas las cuales también tienen la capacidad de emulsificar (Moriello *et al.*, 2003), pudiendo atribuirle a esto la variación en su comportamiento.

a)

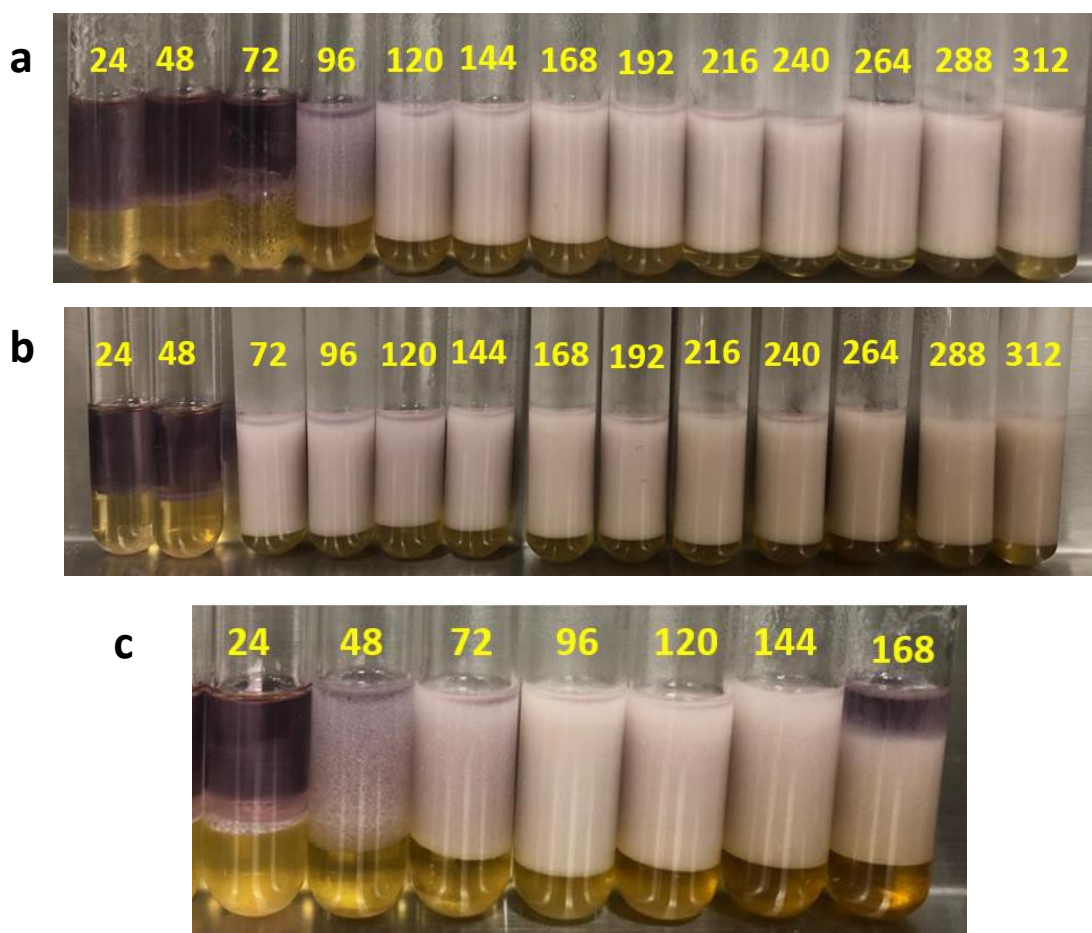


b)





**Gráfica 4.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de EPS de la cepa *Idiomarina B7H2* a) 5°C b) 15°C c) 25°C.

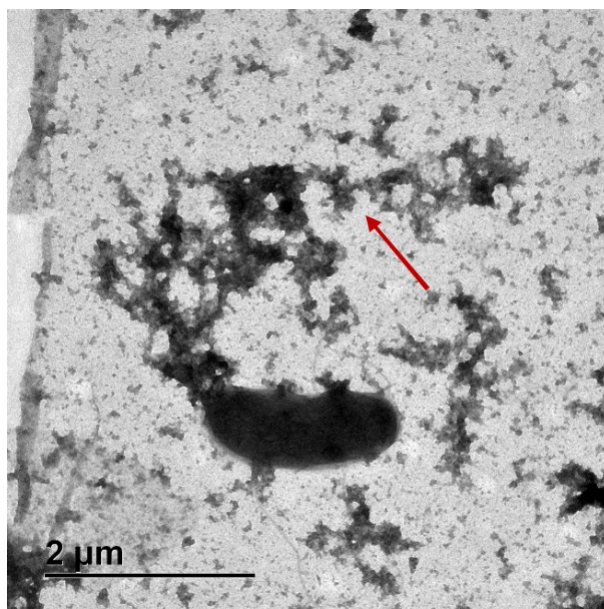


**Figura 19.** Emulsiones obtenidas durante las cinéticas de producción del EPS cada 24 horas, a) 5°C b) 15°C c) 25°C

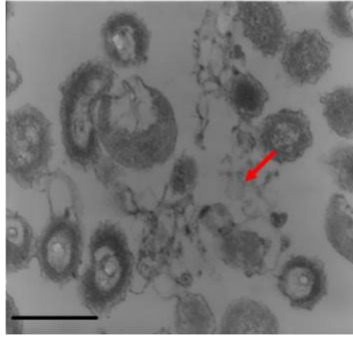
### 7.3 Obtención del exopolisacárido (EPS).

La síntesis del EPS se puede correlacionar con el hecho de que la cepa *Idiomarina B7H2* es Gram (-) con la presencia de los transportadores membranales descritos para este grupo bacteriano, los EPS utilizan la vía dependiente de Wzx/Wzy, del transportador tipo ABC y la de sintasa (Ates., 2015; Schmid *et al.*, 2015).

En la observación de la cepa al microscopio electrónico se pudo notar claramente una red unida a la membrana de la célula (Figura 20), estudios previos han demostrado que existen moléculas que se encuentran unidas de una manera débil a la membrana como los EPS (Sathiyarayanan *et al.*, 2017), por lo que se piensa que lo que se observó es un EPS, Mata en el 2006 observó al microscopio dos especies del género, *Idiomarina ramblicola* y *fostinlapidosi* (Figura 21), los cuales se asemejan a la encontrada en este estudio. Se ha demostrado que la mayoría de los EPS se sintetizan en la fase estacionaria y la bacteria los libera al medio (Wang *et al.*, 2019), como puede verse en las imágenes.



**Figura 20.** Microfotografía de *Idiomarina B7H2*, en medio marino líquido al 0.5% de sales marinas a 25°C y 72 horas de incubación. La flecha indica la ubicación del EPS.



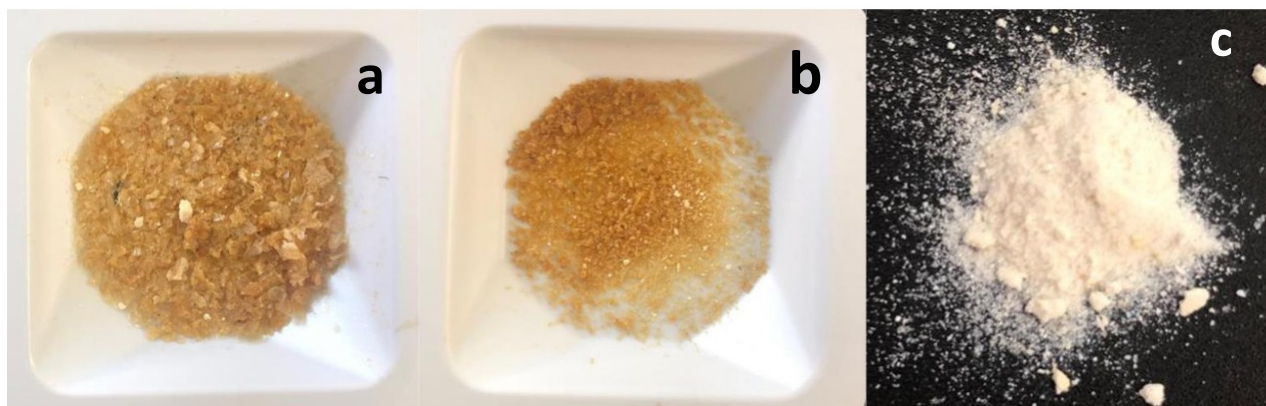
**Figura 21.** Imagen de microscopio electrónico de transmisión de *Idiomarina ramblicola* en medio MY líquido al 7.5% (p/v) de sales tras incubación a 120 horas. (Tomado de Mata., 2006)

Basados en los resultados de la cinética de producción, el EPS se incubó hasta las 120 h (5 días) a 5, 15 y 25°C, se observaron cambios conforme las diferentes temperaturas, en la tabla 13 se puede observar que a una menor temperatura (5°C), se presenta una mayor producción de exopolisacárido 0.6045 g/500 ml que a los 25°C 0.3721 g/500 ml, esto podría estar relacionado con la propiedad que presentan los EPS de proteger a la bacteria de los factores abióticos como la temperatura (Becker., 2015; Sutherland., 2001). Bacterias marinas como *Alteromonas* PRIM-28 del género de *Alteromonas*, produce 1.28 g/L de EPS a 32°C y 96 horas, (Sahana y Rekha., 2019).

Se observó que el EPS producido a las temperaturas de 5, 15 y 25°C posee una textura diferente (Figura 22), lo que nos podría estar indicando que presenta diferentes componentes, Alvarado en el 2015 encontró que el EPS producido por *Halomonas* no cambia si lo produce a diferentes temperaturas. La textura el EPS obtenido a 25°C concuerda con lo reportado en donde señalan que se obtiene un polvo blanco (Mata., 2006). Muchos de los géneros de bacterias marinas tienen la capacidad de producir EPS como *Alteromonas*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, los cuales están bien descritos que sintetizan estos (Sahana y Rekha., 2019).

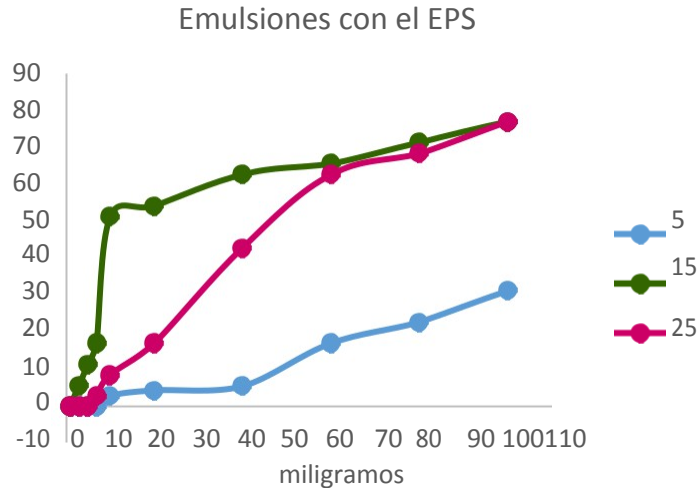
**Tabla 13.** Producción de EPS en Idiomarina B7H2 a las 120 horas, obtenido a las temperaturas de 5, 15 y 25°C en medio marino al 0.5% de sales marinas.

T°	EPS g/500ml
5°C	0.6045
15°C	0.3387
25°C	0.3721



**Figura 22.** EPS obtenido después de liofilizarlo. **a)** 5°C, **b)** 15°C y **c)** 25°C

Una vez obtenido el EPS se hizo una evaluación para determinar si aún presentaba la actividad emulsificante, se tomaron diferentes concentraciones del EPS; (1-100 mg) y se diluyó en 2 ml, se pudo observar que aún presenta la propiedad emulsificante y que conforme se incrementa la concentración, aumenta la emulsión, sin embargo, a 15 y 25°C se nota un aumento considerable alcanzando cerca del 80% (Gráfica 8), que es muy similar al porcentaje obtenido durante la cinética de producción (Gráfica 5).

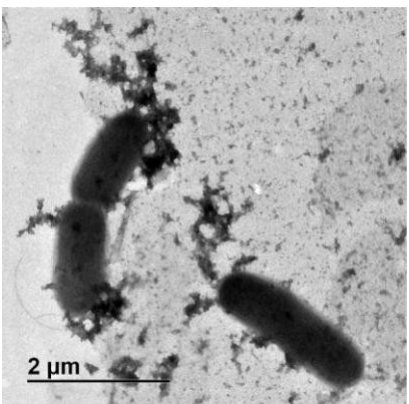


**Gráfica 5.** Emulsiones a 1, 3, 5, 7, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 miligramos del EPS obtenido a las temperaturas 5, 15 y 25°C.

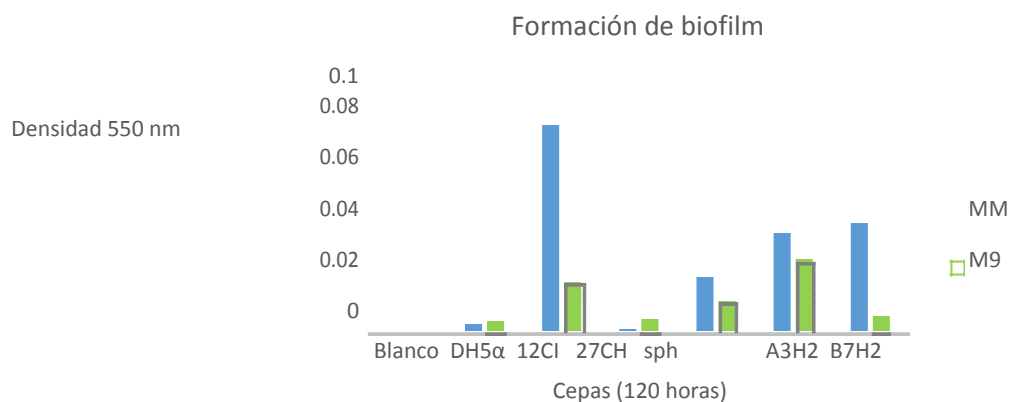
#### 7.4 Formación de biofilm.

La observación al microscopio electrónico dejó ver la unión de dos células y de igual forma, lo que se piensa es el EPS unido a la membrana (Figura 23), muchas bacterias sintetizan los EPS para la formación del biofilm (Ates., 2015; Poli *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2008), estos se ligan principalmente a su protección en los ambientes extremos como los halófilos, al cual pertenecen los miembros del género *Idiomarina* (Wang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018). Se observó que la cepa *Idiomarina* B7H2 tiene la capacidad de formarlos con diferentes medios de cultivos (Gráfica 6), sin embargo, en comparación con otras cepas aisladas del Golfo de México, no presenta una gran síntesis del mismo, como la cepa de *Bacillus* 12Cl, pero se puede observar que es semejante a la cepa *Idiomarina* A3H2, otras especies del género de *Idiomarina* ya han sido reportados para la formación de este como *Idiomarina loihiensis* (Huo *et al.*, 2004).

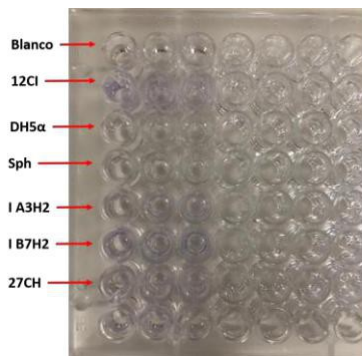




**Figura 23.** Microfotografía de *Idiomarina* B7H2 uniéndose entre sí por medio de la formación de biofilm y secretando EPS al medio.



**Gráfica 6.** Formación de biofilm en diferentes cepas aisladas del Golfo de México, utilizando medio marino al .5% de sales y el M9. Blanco; medio de cultivo MM al .5% de Sales y M9, *E. coli* DH5α, *Bacillus* 12Cl, *Enterobacteria* 27CH, *Sphingomonas*, e *Idiomarina* A3H2 y B7H2.

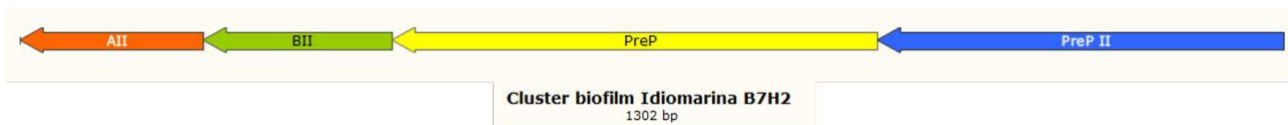


**Figura 24.** Placa de 96 pozos, incubada durante 120 horas con las diferentes cepas aisladas del Golfo de México, los halos de color morado indican una producción de EPS.

El análisis genómico indica que la cepa de *Idiomarina B7H2* cuenta con un clúster de 4 genes para la formación de biofilm (Tabla 14, Figura 25), en donde al compararlo con el de la cepa de *Idiomarina loihiensis* (17 genes), se puede observar que es más pequeño, sin embargo, presenta proteínas del tipo II y prepilin, las cuales se han demostrado en otros géneros que están involucradas para la formación de biofilm (Sandkvist., 2001).

**Tabla 14.** Genes de *Idiomarina B7H2*, involucrados en la producción de biofilm

Ubicación	Gen	Producto	Peso kDa	aa
Peg.715	AII	Type II secretion pathway related protein	7.1	62
Peg.716	BII	Type II secretion pathway related protein	7.3	64
Peg.717	PreP	Prepilin peptidase dependent protein B-like protein	18.2	166
Peg.718	PreP II	Hypothetical protein: Prepilin peptidase dependent protein A-like protein	14.7	138



**Figura 25.** Representación del clúster de genes involucrados en la producción de biofilm en la cepa *Idiomarina B7H2*

## 7.5 Degradación de hidrocarburos

La cepa *Idiomarina B7H2* tiene la capacidad de utilizar hidrocarburos (petróleo) como fuente de carbono (Figura 26b), en la literatura solo se ha demostrado que *Idiomarina xiamenensis* es capaz de poder utilizar n-alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos como fuente de carbono (Lai *et al.*, 2012), sin embargo se ha demostrado que otras especies pertenecientes a las gammaproteobacterias aisladas del Golfo de México pueden utilizar hidrocarburos como fuente de carbono (Bacosa *et al.*, 2018). La adaptación de las diferentes cepas a poder utilizar hidrocarburos parte en gran sentido de los altos niveles que se puede

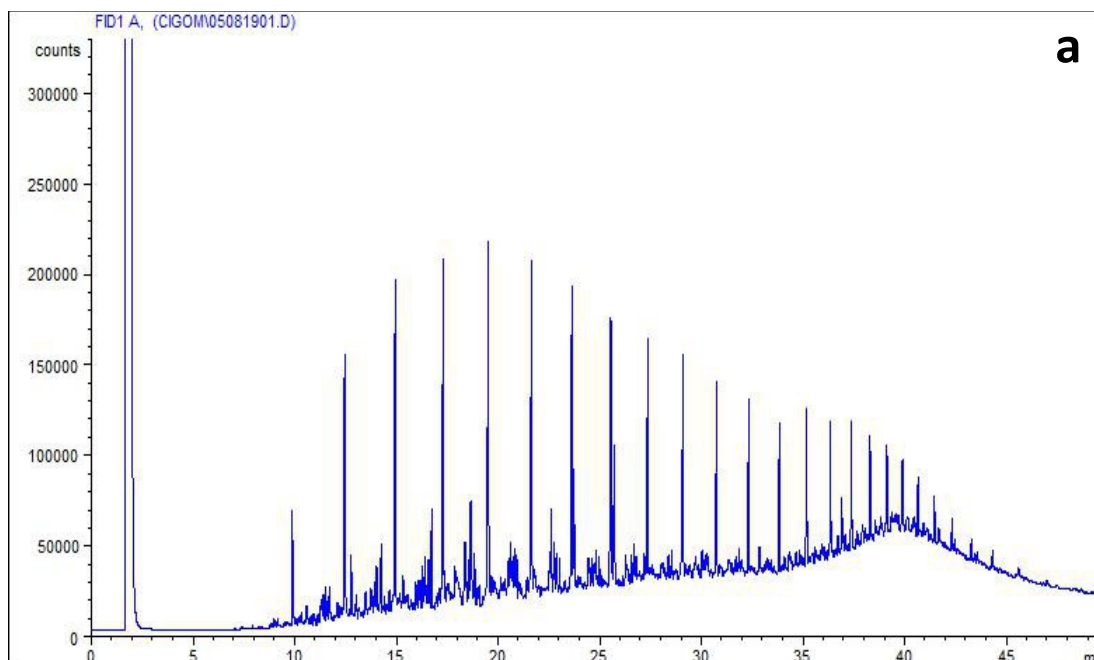
encontrar en el Golfo de México derivados muchas veces de la contaminación (Bacosa *et al.*, 2018).

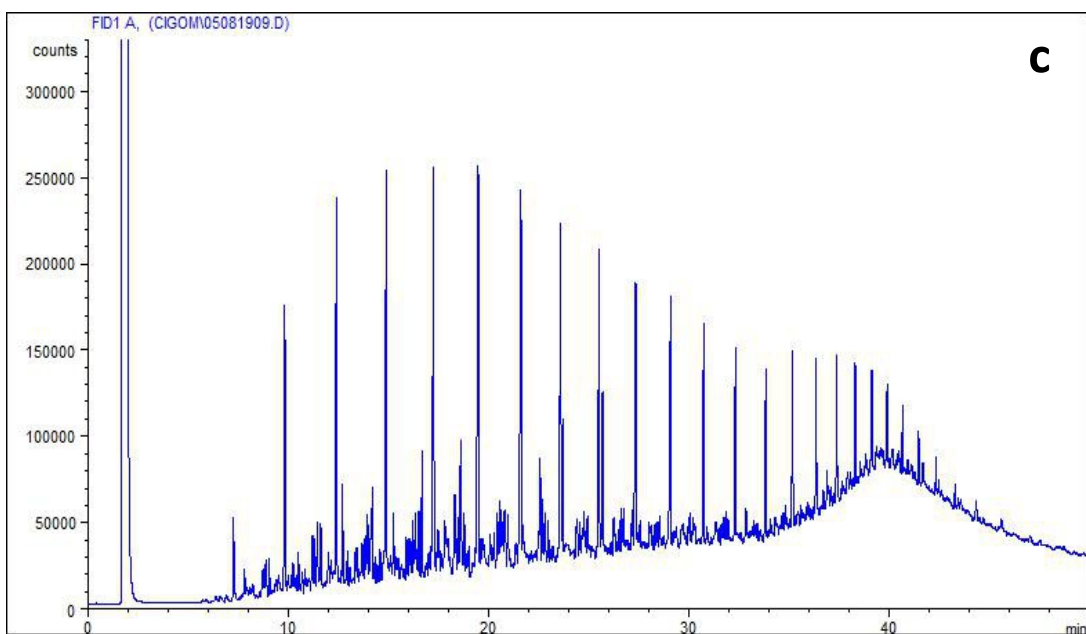
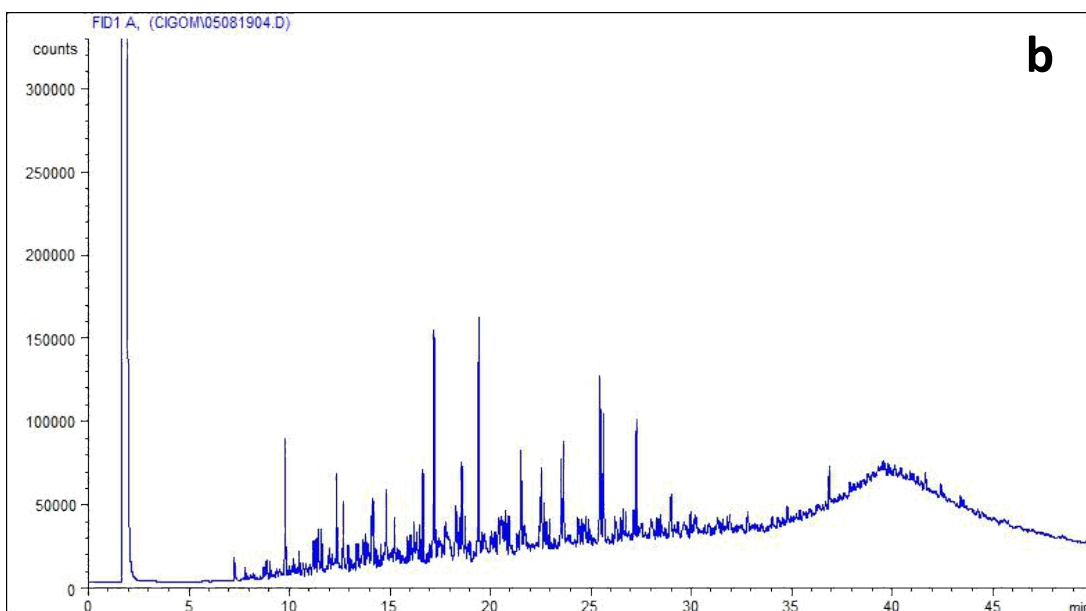
La degradación de hidrocarburos por parte de la cepa *Idiomarina* B7H2 (Tabla 15) podría estar relacionada con su capacidad de formar biofilm, debido a que la formación de estos facilita la disponibilidad de los hidrocarburos para que puedan ser utilizados (Sachdev y Cameotra., 2013; Das *et al.*, 2008)

**Tabla 15.** Datos de la degradación de los hidrocarburos por parte de la cepa *Idiomarina* B7H2 después de 30 días, en medio mínimo a 25°C.

HCT Iniciales [ppm]	HCT finales [ppm]
21182 ±1150	16569 ±1456.63

Degradación 21.7779%





**Figura 26.** Perfil cromatografico de la extracción de petróleo crudo. a) control inicial de la cepa *Idiogramina* B7H2. b) cepa *Idiogramina* B7H2 después de 30 días de incubación. C) Control abiótico de 30 días .

## 7.6 Identificación de genes de la cepa *Idiomarina* B7H2 involucrados en la producción de EPS.

Estudios previos del género de *Idiomarina* han demostrado que algunos miembros como la especie *Idiomarina loihiensis*, produce exopolisacáridos por medio de un clúster, que está ubicado en su genoma del gen 538 al 569, con un tamaño de 34863 pb sintetizando 32 genes, los cuales están involucrados en la biosíntesis del mismo (Figura 7) (Hou *et al.*, 2004).

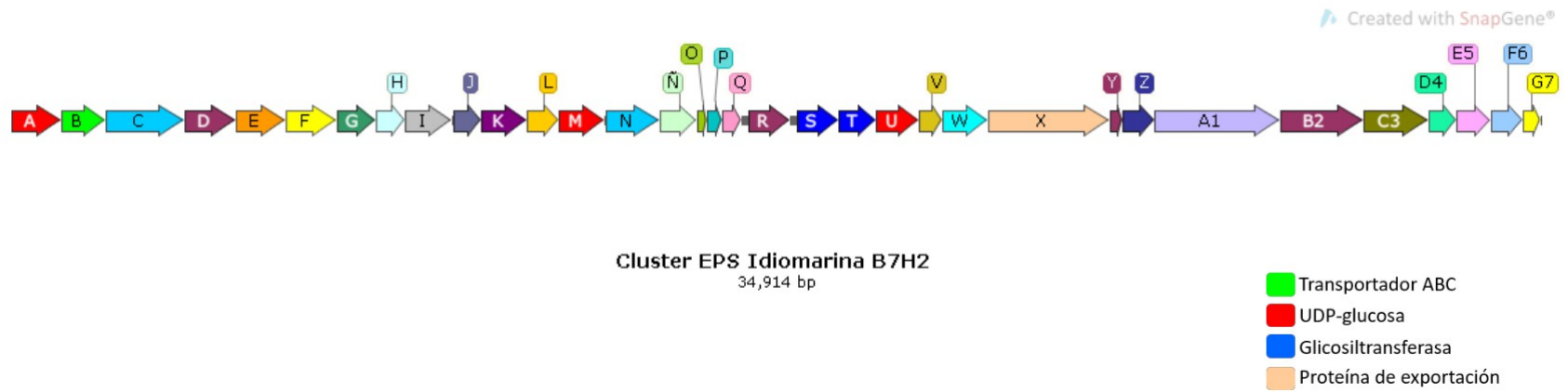
Otras especies también han demostrado la producción de EPS como *Idiomarina* sp Strain 5.13 donde se encontraron 6 genes involucrados en la misma (Sinha *et al.*, 2017). Sin embargo en otras especies se han encontrado también cluster de genes involucrados en la producción del EPS como *Acinetobacter lwoffii* RAG-1 quien produce Emulsan con 22 genes y un peso de 27 kbp (Nakar y Gutnick., 2001)

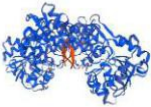




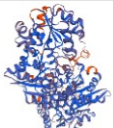
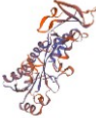
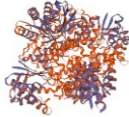
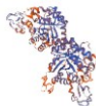
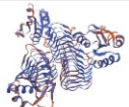
El análisis del genoma de la cepa *Idiomarina B7H2* nos dio el indicio de que presenta el clúster para la síntesis de EPS con una ubicación del gen 458 al 491, el cual está compuesto por 34 genes que estarían involucrados en la síntesis, polimerización, transportación y exportación de los mismos con una longitud de 39914 pb (Tabla 16, figura 27).


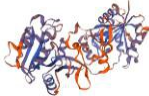









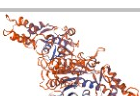


La comparación entre los clústers de ambas cepas de *Idiomarina*, arrojó una similitud en cuanto al tamaño, así como las proteínas que están involucradas en la producción del EPS.

La enzima UDP-glucose dehydrogenase (1.1.1.22) se encuentra presente en el cluster de la síntesis del EPS y es esencial para la síntesis del ácido hialurónico (AH), el cual es un mucopolisacárido (Salwowska *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2016), se ha reportado que organismos halófilos tienen la capacidad de sintetizarlo (Wang *et al.*, 2019), coincidiendo con la prueba CTAB que dio positiva y que es utilizada para determinar la presencia de este (Salwowska *et al.*, 2016), por lo tanto se podría decir que una parte del EPS que sintetiza la cepa *Idiomarina* B7H2 correspondería a un ácido hialurónico.




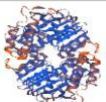
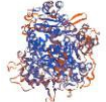




**Figura 27.** Representación del clúster de *Idiomarina B7H2*, donde se tienen los 34 genes involucrados en la biosíntesis del EPS.



Ubicación	Gen	Producto	pb	aa	Peso KDa	modelado
Peg.458	A	UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	1167	388	43.7	
Peg.459	B	Lipopolysaccharide biosynthesis	1002	333	37.7	
Peg.460	C	Phospholipid-lipopolysaccharide ABC transporter	1797	598	65.4	
Peg.461	D	UDP-N-acetylglucosamine 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.-)	1191	396	45.2	
Peg.462	E	Bacillosamine/Legionaminic acid biosynthesis aminotransferase PglE; 4-keto-6-deoxy-N-Acetyl-D-hexosaminy-(Lipid carrier) aminotransferase	1137	378	42.3	
Peg.463	F	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.14)	1164	387	42.6	
Peg.464	G	putative transformylase	888	295	33.4	
Peg.465	H	hypothetical protein	669	222	24.7	
Peg.466	I	N-acetylneuraminase synthase (EC 2.5.1.56)	1074	357	39	
Peg.467	J	4-amino-6-deoxy-N-Acetyl-D-hexosaminy-(Lipid carrier) acetyltrasferase	624	213	21.8	

Peg.468	K	D-glycero-D-manno-heptose 1-phosphate guanosyltransferase	1053	350	39.4	
Peg.469	L	N-Acetylneuraminatase cytidyltransferase (EC 2.7.7.43)	738	245	27.4	
Peg.470	M	UDP-glucose:glucosyl LPS a 1,2-glucosyltransferase	1038	345	40.2	
Peg.471	N	hypothetical protein	1239	412	48.2	
Peg.472	Ñ	hypothetical protein	855	284	33.2	
Peg.473	O	Mobile element protein	219	72	8.3	
Peg.474	P	Mobile element protein	360	119	13.5	
Peg.475	Q	Mobile element protein	444	147	17.4	
Peg.476	R	hypothetical protein	1101	366	41.9	
Peg.477	S	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	1113	370	40.4	
Peg.478	T	putative glycosyltransferase	849	282	31.9	
Peg.479	U	UDP-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)	972	323	35.3	
Peg.480	V	Lipid carrier : UDP-N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-)	549	182	20.3	
Peg.481	W	dTDP-glucose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.46)	1056	351	39	



Peg.482	X	Capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein WcbA; Capsular polysaccharide export system protein KpsC	2766	921	101.5	
Peg.483	Y	hypothetical protein	297	98	9.4	-
Peg.484	Z	YjbF outer membrane lipoprotein	720	239	27.1	
Peg.485	A1	YjbH outer membrane lipoprotein	2880	959	109.3	
Peg.486	B2	Putative epimerase/dehydratase	1905	634	69.7	
Peg.487	C3	Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)	1470	489	54.1	
Peg.488	D4	hypothetical protein	636	211	23.9	
Peg.489	E5	hypothetical protein	804	267	30.2	
Peg.490	F6	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase (EC 3.1.3.7)	735	244	27.1	
Peg.491	G7	predicted secreted protein	354	117	12.4	

**Tabla 16.** Genes implicados en la producción de EPS en la cepa de *Idiomarina B7H*

## **VIII. Conclusiones.**

La cepa *Idiomarina B7H2* comparte muchas de las características del género, es capaz de crecer en temperaturas desde los 4-45°C, tiene la capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono, así como una amplia gama de carbohidratos, produce EPS el cual ha demostrado tener actividad emulsionante y para su formación se identificó un clúster en el cual están implicados 34 genes, posee la capacidad de formar biofilm para el cual también se encontraron proteínas implicadas en su formación como las tipo II. De acuerdo a los datos obtenidos se ha predicho que el exopolisacárido que produce corresponde al ácido hialurónico.

Su genoma y el análisis polifásico nos indican que se podría tratar de una nueva especie aislada del Golfo de México con un cromosoma de 2976838 pb y un porcentaje de 46.8% de G-C, y un número de 2775 secuencias probables de genes con diversas funciones anotadas o hipotéticas, lo cual requiere de un estudio más fino para determinar su función.

## **IX Perspectivas.**

- Determinar la composición del EPS por medio de Resonancia magnética.
- Escalar la producción del EPS a nivel reactor.
- Determinar características fisicoquímicas del EPS obtenido y las aplicaciones que pudiera tener, como la actividad antimicrobiana.

## X. Bibliografía.

**Alvarado** M. A. (2015). Evaluación del exopolisacárido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noreste de México y sus potenciales aplicaciones industriales (Tesis maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Ates**, O. (2015). Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 200.

**Bacosa**, H. P., Erdner, D. L., Rosenheim, B. E., Shetty, P., Seitz, K. W., Baker, B. J., & Liu, Z. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. *The ISME Journal*, 12(10), 2532-2543.

**Banat**, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495-508.

**Bayat**, Z., Hassanshahian, M., & Hesni, M. A. (2015). Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 85-91.

**Becker**, A. (2015). Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Frontiers in Microbiology*, 6, 687.

**Brettar**, I., Christen, R., & Höfle, M. G. (2003). *Idiomarina baltica* sp. nov., a marine bacterium with a high optimum growth temperature isolated from surface water of the central Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 407-413.

**Casillo**, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. (2018). Exopolysaccharides from Marine and Marine Extremophilic Bacteria: Structures, Properties, Ecological Roles and Applications. *Marine Drugs*, 16(2), 69.

**Chen**, C., Han, S., Zhu, Z., Fu, G., Wang, R., Zhang, Q., Ye, Y., Ren, Y., Yan, C., Xu, L., & Wu, M. (2019). *Idiomarina mangrovi* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a mangrove *Avicennia marina* forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(6), 1662-1668.

**Chikkanna**, A., Ghosh, D., & Kishore, A. (2018). Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. *PeerJ*, 6, e4684.

**Chu**, X., Han, J., Guo, D., Fu, Z., Liu, W., & Tao, Y. (2016). Characterization of UDP-glucose dehydrogenase from *Pasteurella multocida* CVCC 408 and its application in hyaluronic acid biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 85, 64-70.

**Coffey**, B.M., Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods Mol Biol*;1149:631-641.

**Danielli**, L. J., Pippi, B., Duarte, J. A., Maciel, A. J., Lopes, W., Machado, M. M., Oliveira, L. F. S., Vainstein, M. H., Teixeira, M. L., Bordignon, S. A. L., Fuentefria, A. M., & Apel, M. A. (2018). Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(9), 1216-1227.

**Das**, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, 72(9), 1229-1234.

**Dell'Anno**, F., Sansone, C., Ianora, A., & Dell'Anno, A. (2018). Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 137, 196-205.

**Desai**, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(1), 47-64.

**Donachie**, S. P., Hou, S., Gregory, T. S., Malahoff, A., & Alam, M. (2003). *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic  $\alpha$ -Proteobacterium from the Lo'ihi submarine volcano, Hawai'i. *international journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1873-1879.

**Freitas**, F., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245, 1674-1683.

**Gu**, D., Jiao, Y., Wu, J., Liu, Z., & Chen, Q. (2017). Optimization of EPS Production and Characterization by a Halophilic Bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with Response Surface Methodology. *Molecules*, 22(5), 814.

**Guezennec**, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 204-208.

**Gupta**, H. K., Singh, A., & Sharma, R. (2011). Genome Sequence of *Idiomarina* sp. Strain A28L, Isolated from Pangong Lake, India. *Journal of Bacteriology*, 193(20), 5875-5876.

**Hameed**, A., Lin, S.-Y., Lai, W.-A., Shahina, M., Liu, Y.-C., Hsu, Y.-H., & Young, C.-C. (2016). *Idiomarina tyrosinivorans* sp. nov., isolated from estuarine surface water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5384-5391.

**Hao**, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Yu, Z., Ren, S., Oda, M., Konno, T., Wang, S., Li, X., Ji, Z.-S., & Zhao, G. (2011). Complete Sequencing and Pan-Genomic Analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Reveal Its Genetic Basis for Industrial Yogurt Production. *PLoS ONE*, 6(1), e15964.

**Harding**, N. E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J. M., & Ielpi, L. (1993). Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. *Journal of General Microbiology*, 139(3), 447-457.

**Hou**, S., Saw, J. H., Lee, K. S., Freitas, T. A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S. P., Pikina, A., Galperin, M. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Omelchenko, M. V., Sorokin, A., Wolf, Y. I., Li, Q. X., Keum, Y. S., Campbell, S., Denery, J., Aizawa, S.-I., ... Alam, M. (2004). Genome sequence of the deep-sea - proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(52), 18036-18041.

**Hussain**, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.

**Islam**, S. T., & Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(11), 697-716.

**Ivanova**, E. P., Flavier, S., & Christen, R. (2004). Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov., *Colwelliaceae* fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1773-1788.

**Jean**, W. D., Leu, T.-Y., Lee, C.-Y., Chu, T.-J., Lin, S. Y., & Shieh, W. Y. (2009). *Pseudidiomarina marina* sp. nov. and *Pseudidiomarina tainanensis* sp. nov. and reclassification of *Idiomarina homiensis* and *Idiomarina salinarum* as *Pseudidiomarina homiensis* comb. nov. and *Pseudidiomarina salinarum* comb. nov., respectively. *international journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(1), 53-59.

**Lai**, Q., Wang, L., Wang, W., & Shao, Z. (2012). Genome Sequence of *Idiomarina xiamenensis* Type Strain 10-D-4. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6938.

**Liu**, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2018). Genome-Based Analysis Reveals the Taxonomy and Diversity of the Family *Idiomarinaceae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2453.

**Makkar**, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5.

**Mao**, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 285, 419-435.

**Martínez-Cánovas**, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Páez, R., & Quesada, E. (2004). *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1793-1797.

**Mata** Gómez, J. A. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada.

**Mata**, J. A., Bjar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M. C., Quesada, E., & Llamas, I. (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 521-528.

**Muhammadi**, & Ahmed, N. (2007). Genetics of Bacterial Alginate: Alginate Genes Distribution, Organization and Biosynthesis in Bacteria. *Current Genomics*, 8(3), 191-202.

**Mukherjee**, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509-515.

**Nakar**, D., & Gutnick, D. L. (2001). Analysis of the wee gene cluster responsible for the biosynthesis of the polymeric bioemulsifier from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1 The GenBank/EMBL accession number for the sequence analysis of the eight fragments determined in this work is AJ243431. *Microbiology*, 147(7), 1937-1946.

**Nichols**, C. M., Bowman, J. P., & Guezennec, J. (2005). Effects of Incubation Temperature on Growth and Production of Exopolysaccharides by an Antarctic Sea Ice Bacterium Grown in Batch Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3519-3523.

**Nicolaus**, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.

**Poli**, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Marine Drugs*, 8(6), 1779-1802.

**Rosenberg**, E., & Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(2), 154-162.

**Rubinovitz C**, Gutnick L., and Rosenberg E. (1982). Emulsan Production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the Presence of Chloramphenicol. *J bacteriol* 152(1):126-132.

**Sachdev**, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1005-1016.

- Sahana**, T. G., & Rekha, P. D. (2019). A bioactive exopolysaccharide from marine bacteria *Alteromonas* sp. PRIM-28 and its role in cell proliferation and wound healing in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 10-18.
- Salwowska**, N. M., Bebenek, K. A., Żądło, D. A., & Wcisło-Dziadecka, D. L. (2016). Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(4), 520-526.
- Sandkvist**, M. (2001). Type II Secretion and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 69(6), 3523-3535.
- Santos**, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.
- Sathiyarayanan**, G., Dineshkumar, K., & Yang, Y.-H. (2017). Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 731-752.
- Satpute**, S. K., Banat, I. M., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4), 436-450.
- Schiano** M. V., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A., & Nicolaus, B. (2003). Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(2), 95-101.
- Schmid**, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 496.
- Sinha**, R. K., Krishnan, K. P., & Kurian, P. J. (2017). Draft Genome Sequence of *Idiomarina* sp. Strain 5.13, a Highly Stress-Resistant Bacterium Isolated from the Southwest Indian Ridge. *Genome Announcements*, 5(10), 1-2.
- Song**, B., Zhu, W., Song, R., Yan, F., & Wang, Y. (2019). Exopolysaccharide from *Bacillus vallismortis* WF4 as an emulsifier for antifungal and antipruritic peppermint oil emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 436-444.
- Sran**, K. S., Sundharam, S. S., Krishnamurthi, S., & Roy Choudhury, A. (2019). Production, characterization and bio-emulsifying activity of a novel thermostable exopolysaccharide produced by a marine strain of *Rhodobacter johrii* CDR-SL 7Cii. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 240-249.
- Suresh Kumar**, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103-117.
- Sutherland**, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.

- Trabelsi**, I., Slima, S. B., Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 541-546.
- Tripathi**, L., Irorere, V. U., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource. *Biotechnology Letters*, 40(11-12), 1441-1457.
- Vicente**, J., Pereira, L. J. B., Bastos, L. P. H., de Carvalho, M. G., & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Effect of xanthan gum or pectin addition on Sacha Inchi oil-in-water emulsions stabilized by ovalbumin or tween 80: Droplet size distribution, rheological behavior and stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 339-345.
- Wang**, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*, 205, 8-26.
- Wang**, L., Lai, Q., Fu, Y., Chen, H., Wang, W., Wang, J., Sun, F., & Shao, Z. (2011). *Idiomarina xiamenensis* sp. nov., isolated from surface seawater, and proposal to transfer *Pseudidiomarina aestuarii* to the genus *Idiomarina* as *Idiomarina aestuarii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 969-973.
- White**, D. A., Hird, L. C., & Ali, S. T. (2013). Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 744-755.
- Xia**, W.-J., Dong, H.-P., Yu, L., & Yu, D.-F. (2011). Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 392(1), 124-130.
- Yoon**, K.-H., & Cho, J.-Y. (2006). Transcriptional analysis of the gum gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. *Biotechnology Letters*, 29(1), 95-103.
- Zachariah**, S., & Das, S. K. (2017). *Idiomarina andamanensis* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from Andaman Sea water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(12), 1581-1592.
- Zhang**, Y.-J., Zhang, X.-Y., Zhao, H.-L., Zhou, M.-Y., Li, H.-J., Gao, Z.-M., Chen, X.-L., Dang, H.-Y., & Zhang, Y.-Z. (2012). *Idiomarina maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(2), 370-375.
- Zia**, K. M., Tabasum, S., Khan, M. F., Akram, N., Akhter, N., Noreen, A., & Zuber, M. (2018). Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1068-1087.



## XI. Anexos



### Anexo 1. Determinación del género.

Secuencia consenso de *Idiomarina* B7H2, la cual se utilizó para la elaboración del árbol filogenético.

```
CCCTAGATGTCAGTGTTCGTGTCATTAAGACGTGAGTAACGCAGCTAAC
GCACTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAC
GCGAAGAACCTTACCATCCCTTGACATCCAGTGAATTTTTTCAGAGATGAATTA
GTGCCTTCGGGAACACTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
TGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTTGC
CAGCACGTAAAGGTGGGAACCTCTGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGG
AAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGCGCATACAAAGGGCAGCAAGCCAGCGATGGTTAGCGAATC
TCATAAAGTGCGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAAGTG
GTTAGTTTAAACCTTCGGGAGAACGATCACCACGGTGTGGTTCATGACTGGGG
TGAAGTCTAAAAGGGGGGAACCAAAAAAGGTTTGAAAAATTGGCTCAAGGAAA
ACCAAACCAGGGTACCCATCCCACGTTGTACCCTTGAAACCTCCGGTCCCTTT
ACCCGCGAAAAACAGCCACTGTTAAAGGGCCTAACGCTGGAAGAAGGACCCC
CCGAATTAACCAGGGCACTTTCGACATCTCTTCTGCAATTAGCGTTGAGCCGC
CGGTGGGATCGGTCCCGGGTGTGGCCAATTATATGTGGGTGAGTAAGTCCC
CCCAACCAAAAACCTCAGCCTGCCACCGCCCGAATTACCCAGAAAAACACAC
CGCGGGGCCTGCACCCCCTAAGTAAAAAGGGCCCGGGCGTCGGGAACCGC
CGCCAAAATTTTTTTTCCAGCGGAGGGTACTCCTTTCCCGGGGGGCCCCCAAC
CCAAAAAAGTTCTAGGGGGGGTCTTGGGGCTTTTTAAAGAAGACCCCCCCC
TTCACCGTCCTGGGCGACCGGCCAGCTCCAAAGGGGGTAATCAGGTTATAC
CAGTCCGCGTCTCCATGCGGTCACTTAGTGCGTTAGCTGCGTACTCACGTC
TTAATGACACGAACAACACTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTA
TCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGTACCTCAGCGTCAGTCTCTGACCA
GGTGGCCGCCTTCGCCACCGGTAT
```

## Anexo 2. Rangos de temperatura de crecimiento.

Crecimiento de la cepa *Idiomarina* B7H2 en medio marino con 0.5% de sales marinas en solido a diferentes temperaturas.

<b>A</b> 5°C		<b>B</b> 15°C	
<b>C</b> 25°C		<b>D</b> 33°C	
<b>E</b> 41°C		<b>F</b> 45°C	

### Anexo 3. Medios de cultivo

Composición de medios de cultivo utilizados en este trabajo.

#### 1) Medio marino al 0.5% de sales (g/l)

Caldo de soya tripticaseina	30 g/l
Dextrosa	10 g/l
Extracto de carne	1.2 g/l
Sal marina	5 g/l
Sulfato de amonio	1.2 g/l
Cloruro de Calcio	1.2 g/l

#### 2) Medio M9 g/l (Coffey y Anderson 2014) (Formación de biofilm)

Fosfato disodico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	64 g/l
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	15 g/l
Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ )	5 g/l
Cloruro de Amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	2
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	1 M
$\text{CaCl}_2$ 1M	100 ml
Solución glucosa al 20%	20 ml

#### 3) Medio Mínimo (Sarieta 2014) g/l (Degradación de hidrocarburos)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	3.5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.7 g/l
Extracto de levadura	0.5 g/l
$\text{NaCl}$	10 g/l
Fuente de carbono (sacarosa o hidrocarburo)	10 g/l
$\text{NaNO}_3$	0.1 g/l
$\text{CaCl}_2$	0.04 g/l

### Anexo 4. Caracterización bioquímica

Imágenes de los resultados de las baterías de las galerías API.

#### Prueba API 20NE de la cepa *Idiomarina* B7H2



#### Prueba API ZYM de la cepa *Idiomarina* B7H2



**Pruebas de oxidasa, donde morado es (+) y amarillo (-)**

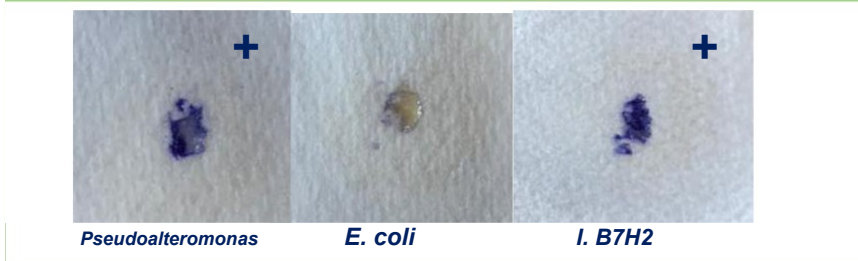


Tabla de las diferentes enzimas, se utilizó la galería API ZYM para su determinación, utilizando *pseudomonas* 27853 como control.

Enzima	<i>Pseudomonas</i> 27853	<i>Idiomarina</i> B7H2	<i>Idiomarina</i> A3H2
Control	-	-	-
Fosfatasa alcalina	+	+	-
Esterasa (C4)	+	+	+
Esterasas lipasa (C8)	+	+	+
Lipasa (C 14)	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	-
Valina arilamidasa	-	+	-
Cistina arilamidasa	-	-	-
Tripsina	-	+	-
$\alpha$ -quimotripsina	-	-	-
Fosfatasa acida	-	-	+
Naftol-AS-BI- fosfosfohidrolasa	+	+	+
$\alpha$ -galactosidasa	-	-	-
$\beta$ -galactosidasa	-	-	-
$\beta$ -glucoronidasa	-	-	-
$\alpha$ -glucosidasa	-	-	-
$\beta$ -glucosidasa	-	-	-
N-acetil- $\beta$ - glucosaminidasa	-	-	-
$\alpha$ -mannosidasa	-	-	-
$\alpha$ -fucosidasa	-	-	-

Tabla de los diferentes sustratos que utiliza la cepa *Idiomarina* B7H2, se utilizó la galería API 20NE para su determinación y *Pseudomonas* 27853 como control.

TEST	<i>Idiomarina</i> B7H2	<i>Idiomarina</i> A3H2	<i>Pseudomonas</i> 27853
Nitrato potásico	-	+	+
L-triptofano	-	+	-
D-Glucosa	-	-	-
L-arginina	-	+	+
Urea	-	+	+
Esculina	-	-	-
Gelatina	-	+	+
4-nitrofenil-βD-galactopiranososa	-	+	-
D-Glucosa	+	+	+
L-arabinosa	-	-	-
D-manosa	-	-	-
D-manitol	+	-	+
N-acetil-glucosamina	-	-	+
D-maltosa	+	+	-
Gluconato potásico	+	-	+
Ácido cáprico	+	-	+
Ácido adípico	-	-	+
Ácido málico	+	-	+
Citrato trisodico	+	-	+
Ácido fenilacético	-	-	-
Oxidasa	+	-	+

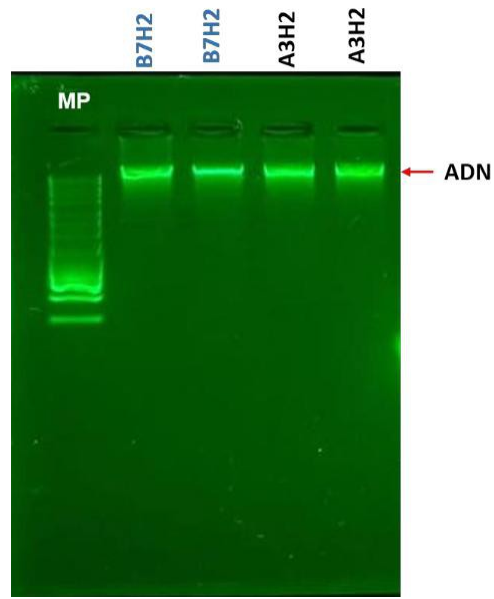
Imagen del crecimiento de la cepa *Idiomarina* B7H2 en medio líquido, observándose una coloración rosa.



## Anexo 5. Caracterización genómica

Se obtuvo el DNA genómico para mandar a secuenciar a la compañía de Macrogen.

Gel de agarosa al 1%, ADN obtenido por medio de su extracción por Kit (identificación de género)



Gel de agarosa al 1%, DNA obtenido por medio de su extracción por Kit. (Secuenciación del genoma)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 04 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co tutor, CeIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQel-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Tesis: **Caracterización de la cepa *Idiomarina* B7H2 e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.**

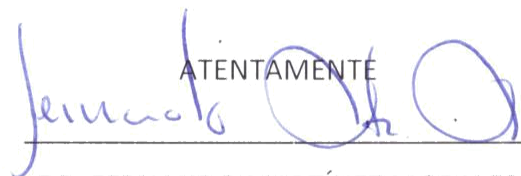
Alumno que lo presenta a revisión: **Elian Itzel Narvaez Bahena**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

#### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE  


DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 04 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co tutor, CeIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQeI-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Tesis: **Caracterización de la cepa *IDIOMARINA B7H2* e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Elían Itzel Narvaez Bahena**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2020-08-07 16:06:33 | Firmante

Xffe9I/vPXbkSPDMzcYmDXXQes+aCVHGwYUnDtEADbJXVlh5TOo7SIOx1CT8KUwSOeS+hUZ0DOtCAJG9kcjJWX3mHE9Y9UF6lhxYEsSVNIKsFYsXjQgnStQAonS8SxoGCQ  
XnOY0JXGE7HKrTug997T6kxvnx79WEuzPix6O7adbpfXNNorBNHS5nL+wYhZj0I4I0vy/APIIAvo4KWczwkFFo7S46KS8Zx4VMIKVo/H5GFo/gHwiEJAitpYHCGc9DrRR8z6yNf9Lc  
XjEqldOg5bDzX2JJRsiVH/IWTLuoLnWU4JaCCPJsvq5/N7JPi8jrXM0BL04yvT6fUMz35sz+Ew==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qYHZjx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SZhDkzQObp4efYpGvSvGdVpVVDSLdtJ7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 04 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co tutor, CeIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQeI-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Tesis: **Caracterización de la cepa *IDIOMARINA B7H2* e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Elían Itzel Narvaez Bahena**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

CONSTANZA MACHIN RAMIREZ | Fecha:2020-08-11 13:27:56 | Firmante

BOOrZjQDziRsESWTjsNOPzBAUveAZt3rGXR8sSFRC9mKK1PLBNESL1EjzKiRQ9GIFnyeW4+kuJFK22W/uG1ns+O2//VR81r39tXeUDaLqI/CwxvBjBz2x8qrf5rSfN5Ka0VoyOMe8PK5V83MRCaJD136D1FciQOYj5qlQhpS8e1pq8lw5ljXGgmej9VSGl+ro+hZ1HwgdP/BcNzeVuwkvFWP3Yu+vM5hos9NDob2HKhkKLFU78Q3BMdwPIrYippas6/fim2dBBVi+PUcd1acYzCuky7ai0SD5b+76brXBweezRVDPNcRbsfalP90byhjGuFWPfwxJDbMQhdOoSxbg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jTFbC0](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qeZXYLmPlbbLOWzQ5KWEVfHsFiBUwb0>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 04 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co tutor, CeIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQeI-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Tesis: **Caracterización de la cepa *IDIOMARINA B7H2* e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Elían Itzel Narvaez Bahena**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2020-08-07 18:44:43 | Firmante**

qyoyC2TZpssK348j9vNfFWcspo4TSNWrlCL84+c6fDh13nF3IVEzDhLXj0IQTxbk2onS2kri6tR5kcsOi5oQC9mupY/oQ/BZ9JzrJY+rNtjzDrmGOTJ5jPfStv7TviraKGj4GMlrcnXGKL  
oXe2Dbv1XzFiMv+bGaj0Y1IVhdF5S5odXxCF74fxYEC4spJZpKoZpNFLfA80lb+C+PPbpf9RO5mbAs4kH29TneSHfYihUr+tjftBVE7k2PYwYIHt2VPtmOPXhwtVsNN3Pa8lkWKU8  
LAVe/3LjC14yCbg07OTEYtNxt/IB+SuBOCj1YPLRRNRLdXwTMq9j0nvDda1rHQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gLVWa4](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MghlqhFJupCWb81AzzCdINL36vLfiwXZ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 04 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal, CeIB-UAEM)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co tutor, CeIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQeI-UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CeIB-UAEM)

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella (IBT-UNAM)

Tesis: **Caracterización de la cepa *Idiomarina* B7H2 e identificación de genes asociados con la producción de exopolisacáridos con actividad emulsificante.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Elían Itzel Narvaez Bahena**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA