

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD TENSOACTIVA DE CEPAS
DE *Bacillus* sp. DE ORIGEN MARINO CRECIDAS EN MEDIOS
HIDROFÓBICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ITA. Alejandra Victoria Baca Gómez

Director de tesis: Dra. María del Refugio Trejo
Hernández

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2021

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección 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.

AGRADECMIENTOS

La presente tesis de maestría, es un esfuerzo en el cual participaron varias personas leyendo, corrigiendo, opinando, y dando ánimo.

Agradezco enormemente a la Dra. María del Refugio Trejo Hernández directora de la presente tesis por haber confiado en mí, por el apoyo que ha mostrado durante estos dos años, especialmente durante el desarrollo de este trabajo, sin sus consejos, conocimientos y ánimos, esta tesis no hubiera sido posible.

Al Dr. Fernando por el interés que ha puesto en este trabajo, por sus consejos, ánimos y por su gran aporte en el desarrollo de esta tesis.

A mi comité tutorial; Dra. Irene Perea, Dr. Brandt Bertrand, Dr. Raunel Tinoco, por aportarme sus conocimientos, por su buena disposición a contestar mis dudas y apoyarme al desarrollo de este trabajo.

Gracias también a mis queridos amigos, porque siempre encontré apoyo y ayuda cuando lo necesité y por permitirme entrar en sus vidas fuera y dentro de laboratorio. Agradezco en primer lugar a uno de los pilares del laboratorio, Nashbly, por tu apoyo en todos los aspectos desde el inicio de la maestría dentro y fuera del laboratorio. A mi amiga Verónica, por su amistad, preocupación y apoyo. A Daniel por escucharme y ayudarme con sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos; Ángeles, Nydia, Victoria, Claudia y Cynthia, por su amistad, por ayudarme y escucharme y ser un gran apoyo para mí.

Muchas gracias a mi familia que siempre me dieron todos los ánimos durante esta aventura llamada maestría y que siempre estuvieron de forma incondicional.

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Dr. Fernando Martínez Morales

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Dr. Brandt Bertrand

M. en B. José Raunel Tinoco Valencia

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	9
I. RESUMEN.....	10
II. INTRODUCCIÓN.....	11
III. ANTECEDENTES.....	13
3.1 Biosurfactantes	13
3.1.2 Clasificación de los Bs	14
3.1.3 Ventajas de los Bs sobre los surfactantes químicos.....	15
3.2 Aplicación de los Bs	16
3.2.1 Biorremediación y Recuperación de petróleo.....	16
IV. BACTERIAS DE ORIGEN MARINO	19
4.2 Biosíntesis de Lipopéptidos por el género <i>Bacillus</i>	22
V. JUSTIFICACIÓN	26
VI. HIPÓTESIS.....	27
VII. OBJETIVOS	28
VIII. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	29
IX. METODOLOGÍA	30
9.1 Cepas bacterianas.....	30
9.1.2 Medios y condiciones de cultivo	30
9.1.3 Conservación de las cepas	30
9.2 Pruebas bioquímicas (Caracterización polifásica).....	31
9.3 Medios de producción de Bs	32
9.4 Cinéticas de crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción.....	33
9.5 Evaluación de la producción de Bs	33
9.6 Extracción y purificación de los Bs	33
9.7 Estabilidad del Bs	34
X. TÉCNICAS ANÁLITICAS.....	34
10.1 Evaluación de la actividad Bs	34
10.2 Índice de emulsión	34
10.3 Actividad hemolítica.....	34
10.4 Tensión Superficial	35

10.5 Cuantificación del Bs	35
XI. CUANTIFICACIÓN DE HCs	36
11.1 Extracción de hidrocarburos	36
XII. RESULTADOS	37
12.1 Caracterización Polifásica	37
12.1.2 Pruebas microbiológicas y microscópicas	37
12.1.3 Pruebas Bioquímicas	38
12.1.4 Actividad Hemolítica	40
12.2 Crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción	41
12.3 Cinéticas para la producción del Bs con fuentes hidrofóbicas como fuente de carbono (queroseno, hexadecano y aceite de coco)	43
12.3.1 Cinética con queroseno como fuente de carbono	43
12.3.2 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de <i>Bacillus</i> 12-IC-I Y 12-IA-III crecidas en medio con queroseno	44
12.4 Cinética con hexadecano como fuente de carbono	47
12.4.1 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de <i>Bacillus</i> 12-IC-I Y <i>Bacillus</i> 12-IA-III crecidas en medio con queroseno	48
12.5 Cinética con aceite de coco como fuente de carbono	49
12.5.1 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de <i>Bacillus</i> 12-IC-I Y 12-IA-III crecidas en medio con aceite de coco	50
12.6 Cinética de producción de Surfactina por la cepa de <i>Bacillus</i> 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono	51
XIII. BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR LAS CEPAS DE <i>Bacillus</i> 12-IC-I Y <i>Bacillus</i> 12-IA-III	54
XIV. DISCUSIONES	56
14.1 Caracterización polifásica, pruebas microbiológicas	56
14.2 Pruebas bioquímicas	56
14.3 Actividad hemolítica	58
14.4 Crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción	59
14.5 Cinéticas para la producción de Bs con fuentes hidrofóbicas como fuente de carbono (queroseno, hexadecano y aceite de coco) y perfiles cromatográficos de los extractos purificados	60
14.6 Cinética de producción de Surfactina por la cepa de <i>Bacillus</i> 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono	65
14.7 Biodegradación de hidrocarburos por las cepas de <i>Bacillus</i> 12-IC-I y <i>Bacillus</i> 12-IA-III	66
XV. CONCLUSIONES	69

XVI. PERSPECTIVAS	70
XVII. REFERENCIAS	71
XVIII. ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de un Bs, cabeza polar y la cola hidrofóbica (A) y formación de una micela (B).....	13
Figura 2 Biosíntesis de lipopéptidos, fracción hidrofílica.	23
Figura 3 Biosíntesis de lipopéptidos, fracción hidrofóbica.	23
Figura 4 Biosíntesis de lipopéptidos.....	24
Figura 5 Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs empleando.....	25
Figura 6 Morfología colonial bacteriana e identificación microscópica de la tinción de Gram de las cepas de Bacillus 12-IC-I (A y B) y Bacillus 12-IA-III (C y D).....	37
Figura 7 Actividad hemolítica de las cepas de Bacillus 12-IA-II y Bacillus 12-IC-I.	40
Figura 8 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IA-III en queroseno como fuente de carbono.....	43
Figura 9 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono.....	43
Figura 10 Perfil cromatográfico del estándar de la surfactina SIGMA.	45
Figura 11 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IC-I obtenido en medio marino con queroseno.	45
Figura 12 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IA-III obtenido en medio marino con queroseno.....	45
Figura 13 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IC-I en hexadecano como fuente de carbono.....	47
Figura 14 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IA-III en hexadecano como fuente de carbono.....	47
Figura 15 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IC-I obtenido en medio marino con hexadecano.....	48
Figura 16 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IA-III obtenido en medio marino con hexadecano.	48
Figura 17 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IA-III en aceite de coco como fuente de carbono.....	49
Figura 18 Cinética de crecimiento de la cepa Bacillus 12-IC-I en aceite de coco como fuente de carbono.....	49
Figura 19 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IA-III obtenido en medio marino con aceite de coco.....	50
Figura 20 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis y el extracto semi purificado (línea azul) producido por Bacillus 12-IC-I obtenido en medio marino con aceite de coco.	50
Figura 21 Perfiles de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por B. subtilis, iturinas SIGMA 1mg/mL (línea azul) y el extracto semi purificado (línea verde) producido por Bacillus 12-IC-I a las 20 y 24 h.	52

Figura 22 Perfiles de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por <i>B. subtilis</i> , iturinas SIGMA 1mg/mL (línea azul) y el extracto semi purificado (línea verde) producido por <i>Bacillus</i> 12-IC-I	52
Figura 23 Evolución del crecimiento la cepa de <i>Bacillus</i> -12-IC - I. (DO) y de la producción de surfactinas. (TS, concentración de surfactina) durante 24 horas.....	53
Figura 24 Biodegradación de petróleo crudo (API-16-20) utilizando la cepa de <i>Bacillus</i> 12-IC-I. 5000 ppm, 160 rpm 20 C°, en medio mínimo Czapeck A) Control abiótico y B) extracto remanente después de 30 días de incubación.	54
Figura 25 Biodegradación de petróleo crudo (API-16-20) utilizando la cepa de <i>Bacillus</i> 12-IA-III. 5000 ppm, 160 rpm 20 C°, en medio mínimo Czapeck A) Control abiótico y B) extracto remanente después de 30 días de incubación.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principal clasificación de los Bs y microorganismos productores.....	14
Tabla 2 Aplicaciones industriales de los Bs.....	18
Tabla 3 Aplicación industrial de varios biosurfactantes / bioemulsificantes marinos.....	20
Tabla 4 Secuencia peptídica y cadenas de ácidos grasos de las diferentes variantes de cada familia de lipopéptidos de Bacillus spp.	22
Tabla 5 Sustratos incluidos en cada uno de los 50 pozos de la galería API 50 CH.	31
Tabla 6 Análisis de HPLC. Condiciones de gradiente.	35
Tabla 7 Comparación de la utilización de sustratos entre las cepas marinas y el control Bacillus subtilis presentadas en el test bioquímico API 50 CHB.	38
Tabla 8 Comparación de la utilización de sustratos entre las cepas marinas presentadas en el test bioquímico API 50 CHB.	39
Tabla 9 Resultados obtenidos de la reducción de la tensión superficial para la cepa Bacillus 12-IC-I crecida en diferentes medio de cultivo.....	41
Tabla 10 Resultados obtenidos de la reducción de la tensión superficial para la cepa Bacillus 12-IA-III crecida en diferentes medio de cultivo.....	42
Tabla 11 Resultados obtenidos del crecimiento bacteriano de las cepas Bacillus 12-IA-II y Bacillus12-IC-I y la producción de Bs (reducción TS) en MMR con queroseno.	44
Tabla 12 Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs para las cepas Bacillus 12-IA-II y Bacillus12-IC-I en MMR con hexadecano.....	48
Tabla 13 Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs para las cepas Bacillus 12-IA-II y Bacillus12-IC-I en MMR con aceite de coco.....	50
Tabla 14 Producción de surfactina por las cepas de Bacillus 12-IC-I y Bacillus 12-IA-III en diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas.	51
Tabla 15 Galerías API 50 CHB (metabolismo de hidratos de carbono) para las cepas de Bacillus 12-IC-I y 12-IA-III.	75
Tabla 16 Resultados de la identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante del sistema API 50 CHB.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

NaCl	Cloruro de Sodio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amonio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
ANM	Agar nutritivo marino
MNM	Medio nutritivo marino
MMR	Medio marino reducido
MMM	Medio marino mínimo
API	Sistemas miniaturizados
Bs	Biosurfactantes
DO	Densidad óptica
TS	Tensión superficial
IE ₂₄	Índice de Emulsión (24 horas)
CG	Cromatografía de Gases
CMC	Concentración micelar crítica
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
μL	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto

I. RESUMEN

Los biosurfactantes (Bs) son compuestos anfifílicos los cuales pueden ser sintetizados por microorganismos. La característica más importante de los Bs es su aceptabilidad ambiental, con respecto a los tensioactivos sintéticos, ya que los dos principales inconvenientes de los tensioactivos químicos son su obtención a partir de combustibles fósiles y los problemas relacionados con la biodegradación, por otro lado los Bs tienen efectividad a temperaturas extremas, pH y salinidad y son biodegradables. En los últimos tiempos, los Bs han ganado atención ya que son utilizados como aditivos en los procesos de biorremediación.

El objetivo de este proyecto de investigación fue caracterizar los Bs producidos por cepas bacterianas del género *Bacillus sp.* aisladas de muestras obtenidas del Golfo de México, así como evaluar su capacidad de biodegradación de hidrocarburos. La selección de bacterias productoras de Bs se realizó mediante la capacidad de producir hemólisis y la disminución de la Tensión Superficial (TS). Las bacterias seleccionadas *Bacillus* 12-IA-III y *Bacillus* 12-IC-I se caracterizaron e identificaron morfológica y bioquímicamente. La producción de Bs se realizó empleando el medio Marino Nutritivo, enriquecido con diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas (queroseno, hexadecano y aceite de coco). La actividad de los Bs producidos se determinó mediante la medición de la TS.

Los Bs que presentaron una mayor actividad tensoactiva logrando reducir la tensión de 60nM/m a 27.0nM/m fueron purificados. El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) permitió confirmar la presencia en los extractos purificados de lipopéptidos del tipo de surfactinas comparando con los estándares comerciales. De acuerdo con el perfil cromatográfico se observaron diferencias en los sobrenadantes obtenidos en relación a la fuente de carbono hidrofóbica utilizada. En el caso de la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, el queroseno y hexadecano estimularon la producción del Bs. Mientras que con la cepa *Bacillus* 12-IA-III únicamente con el queroseno como fuente de carbono se produjeron surfactinas. Los perfiles cromatográficos obtenidos muestran la presencia de isómeros de surfactinas de C-13, C-14 y C-15 confirmados con la co-elución de los estándares en ambas cepas cuando la fuente de carbono fue el queroseno.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la liberación de compuestos químicos al ambiente como consecuencia de las diferentes actividades industriales ha ido en aumento. Debido a sus características físicas y químicas y la toxicidad que pueden presentar, estos compuestos llegan a ser perjudiciales en los ecosistemas y la salud humana. Algunos de los compuestos de mayor importancia por su compleja estructura química y al aumento en su uso en la producción de una gran cantidad de productos industriales son los hidrocarburos, los cuales son moléculas recalcitrantes y bioacumulables, ocasionando efectos nocivos debido a su toxicidad.

Debido a los problemas de contaminación ambiental por hidrocarburos, ha surgido la necesidad de buscar alternativas para lograr su remoción del ambiente. Existen microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, que son conocidos por su capacidad para degradar hidrocarburos. Sin embargo, algunos de estos contaminantes no suelen estar disponibles para la degradación microbiana. En este caso cuando la fuente de carbono es un sustrato insoluble como los hidrocarburos, los microorganismos facilitan su difusión al interior celular mediante la síntesis de moléculas activas de superficie como los Bs. La adición de estos aditivos o su síntesis permite incrementar la solubilidad del contaminante y por ende su biodegradación. Esto representa una alternativa para la mejora en los procesos de biorremediación. Por lo que estos microorganismos son de interés debido a su alta versatilidad metabólica para crecer en diferentes tipos de hidrocarburos.

Por su estructura anfipática los Bs son moléculas de amplio espectro de aplicación industrial. Los Bs pueden mejorar la eficacia de la biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos, en comparación con sus equivalentes químicos, estos tienen propiedades únicas tales como alta actividad tensoactiva y emulsificante, menor toxicidad y biodegradabilidad (Ben Ayed *et al.*, 2015; De *et al.*, 2015). Además de ejercer un fuerte impacto positivo en los principales problemas globales, la producción de Bs tiene una importancia considerable para la implementación de procesos industriales sostenibles así como el uso de recursos renovables para su producción (D. K. Santos *et al.*, 2016).

Las bacterias son microorganismos que pueden vivir en diferentes ambientes incluido el marino. Son capaces de consumir una gran variedad de compuestos, siendo un punto de gran importancia, ya que toleran y usan ciertos contaminantes como fuente de carbono y energía, lo cual posibilita la su eliminación de ecosistemas afectados por actividades humanas o naturales (Ron *et al.*, 2002).

De esta manera, se puede pensar en la posibilidad de llevar a cabo el saneamiento, por acción bacteriana a gran escala de áreas contaminadas con compuestos orgánicos persistentes tales como hidrocarburos de petróleo.

La importancia del estudio de los Bs y los microorganismos productores de estos radica en que puedan ser candidatos para remplazar a los surfactantes químicos y ser utilizados en la biorremediación de ambientes contaminados terrestres y marinos. El presente proyecto, se enfocó en estudiar la producción de Bs por cepas de *Bacillus* provenientes de muestras de agua tomadas del Golfo de México en sustratos hidrofóbicos. Con el interés de contar con surfactantes de origen biológico que contribuyan a disminuir la concentración de compuestos como el petróleo y sus derivados de ambientes contaminados, además de las numerosas aplicaciones industriales para los que puedan ser utilizados.

III. ANTECEDENTES

3.1 Biosurfactantes

Los surfactantes biológicos (biosurfactantes Bs) son moléculas anfifílicas, son producidos principalmente por bacterias y hongos (W. Wang *et al.*, 2014). Presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes. Son compuestos biodegradables, de baja toxicidad y con propiedades equivalentes a los surfactantes sintéticos. Su principal papel fisiológico es el de incrementar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos con el fin de permitir su utilización como fuente de carbono y energía. Tienen la propiedad de reducir la tensión interfacial y superficial de medio en el que se encuentran (Lotfabad *et al.*, 2009). De acuerdo con su naturaleza química pueden ser tensoactivos o emulsificantes. Son agentes emulsificantes que son capaces de formar emulsiones con compuestos hidrofóbicos muy estables, lo que les permite su aplicación en las industrias de procesamiento de alimentos y en diversos campos de la biomedicina. Por otra parte debido a su capacidad tensoativa se utilizan en la recuperación de petróleo crudo (Cameotra *et al.*, 2004).

Los Bs cuentan con un grupo hidrofóbico (apolar) unido covalentemente a una región hidrófila (polar). Esta característica les permite reducir la tensión superficial y la tensión interfacial y formar microemulsiones donde el compuesto hidrofóbico puede solubilizarse en agua o bien, el agua puede solubilizarse dentro del compuesto hidrofóbico. La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración de Bs a la cual se forman los ensamblajes moleculares organizados, conocidos como micelas (Figura 1) (Camesano *et al.*, 2000).

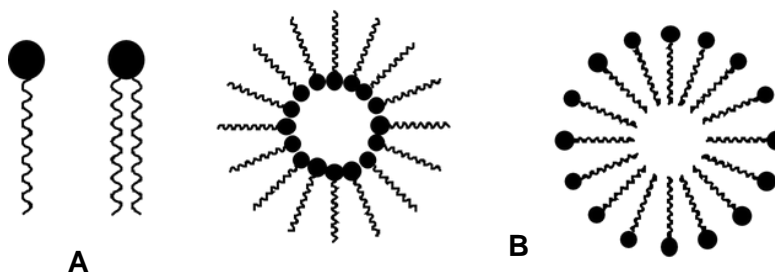


Figura 1 Representación de un Bs, cabeza polar y la cola hidrofóbica (A) y formación de una micela (B)

3.1.2 Clasificación de los Bs

Los Bs se clasifican considerando su composición química y su origen microbiano. En general, su estructura incluye un grupo hidrofílico consistente de aminoácidos o péptidos (aniónicos o catiónicos, mono-, di-, o polisacáridos) y un grupo hidrofóbico consistente de un ácido graso saturado o insaturado. Dependiendo de su grupo polar, se pueden clasificar en seis grupos diferentes: glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos y tensioactivos poliméricos, en la tabla 1 se muestra la principal clasificación de los Bs y los microorganismos específicos que los producen (I. M. Banat *et al.*, 2000).

Tabla 1 Principal clasificación de los Bs y microorganismos productores

Biosurfactante	Microorganismo productor	Referencia
BAJO PESO MOLECULAR		
GLÍCOLÍPIDOS		
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Chong <i>et al.</i> , 2017; Inoue <i>et al.</i> , 1982; White <i>et al.</i> , 2013)
Trealosalípidos	<i>Rhodococcus sp.</i>	
Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>	
LIPOPÉPTIDOS		
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	(Clements <i>et al.</i> , 2019; Dang <i>et al.</i> , 2019; Gu <i>et al.</i> , 2017; M. Wang <i>et al.</i> , 2020).
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Iturina	<i>Bacillus sp.</i>	
Bacilomicina	<i>Bacillus sp.</i>	
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	
ÁCIDOS GRASOS	<i>Talaromyces trachyspermus</i>	(Morales-Oyervides <i>et al.</i> , 2020)
FOSFOLÍPIDOS	<i>Acinetobacter sp.</i>	(Karanth <i>et al.</i> , 1999)
ALTO PESO MOLECULAR		
POLIMÉRICOS		
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(Adetunji <i>et al.</i> , 2019; Mujumdar <i>et al.</i> , 2019)
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	
Lipomanan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	

El primer grupo se trata de Bs de bajo peso molecular los cuales pueden reducir la tensión superficial e interfacial eficientemente, mientras que el segundo grupo pertenece a los de alto peso molecular; son polímeros polifílicos y anfifílicos que usualmente son más efectivos estabilizando emulsiones de aceite en agua pero no reducen la tensión superficial (Ibrahim M. Banat *et al.*, 2010).

3.1.3 Ventajas de los Bs sobre los surfactantes químicos

Los surfactantes son moléculas utilizadas en actividades de la vida cotidiana, se encuentran en la mayoría de los sectores de la industria. Su fabricación a gran escala se ha llevado a cabo principalmente mediante procesos químicos, algunas de las especies químicas involucradas en su producción se consideran peligrosas, ya que estos compuestos son principalmente derivados del petróleo; obteniendo así cadenas de hidrocarburos hidrófobos (con una longitud entre C₈ y C₁₈) y los grupos sulfato o sulfonato polar confieren propiedades tensioactivas y permiten el uso comercial de estas sustancias como tensioactivos aniónicos (Könnecker *et al.*, 2011), por ende son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos (Ibrahim M. Banat *et al.*, 2021; Scott *et al.*, 2000).

Por lo tanto, los Bs han sido aceptados como alternativas ecológicas. Se ha demostrado que estas biomoléculas tienen las mismas funcionalidades que los análogos sintéticos. La mayoría de los estudios indican que los Bs no son tóxicos para los microorganismos y, por lo tanto, es poco probable que inhiban la biodegradación de compuestos hidrofóbicos (Makkar *et al.*, 2003), por otra parte estudios realizados muestran que la presencia de tensoactivos sintéticos inhibe el proceso de biodegradación ya que estos son tóxicos para los microorganismos (Stelmack *et al.*, 1999). Los tensoactivos presentes en el ambiente pueden acumularse en organismos vivos (bioacumulación), lo que puede tener un efecto negativo sobre los elementos bióticos de los ecosistemas, por ejemplo la alteración del equilibrio endocrino (Olkowska *et al.*, 2014).

Los Bs tienen varias ventajas sobre los tensioactivos químicos, tales como menor toxicidad, mayor biodegradabilidad, mejor compatibilidad medioambiental, mayor formación de espuma, mayor selectividad y gravedad específica a temperaturas, pH y salinidad extremos y la capacidad de sintetizarse a partir de materias primas renovables (Gautam *et al.*, 2006).

Por el contrario, los surfactantes a base de petróleo como se mencionó anteriormente son tóxicos, recalcitrantes a la biodegradación y derivados solo de materias primas sintéticas, lo que a menudo hace que su producción sea costosa y difícil de lograr y da como resultado la producción de subproductos de desechos tóxicos (Makkar & Rockne, 2003).

3.2 Aplicación de los Bs

Los surfactantes y emulsificantes químicos son componentes indispensables de la vida diaria y son utilizados en la mayoría de las industrias. Estos compuestos son recalcitrantes como consecuencia de su toxicidad y baja biodegradabilidad. Es por ello que se han buscado compuestos de origen biológico con propiedades iguales o superiores evitando con ello daños al ambiente. Actualmente, la principal aplicación de los Bs se ha llevado a cabo en la biorremediación de ambientes contaminados por hidrocarburos, así como en la industria del petróleo y el aceite, en particular la mejora de la recuperación microbiana de petróleo (MEOR por sus siglas en inglés) (Raffa *et al.*, 2016). Los Bs representan actualmente el 10% de la producción mundial de materiales biotensioactivos (aproximadamente 10 millones de toneladas por año) y se suministran al petróleo, alimentos (producción de emulsionantes alimentarios), farmacéuticos (formulación de humectantes, cremas y medicamentos), médicos (producción de agentes antimicrobianos) e industrias agrícolas (producción de fertilizantes), así como ingeniería civil (tratamiento de residuos y aguas residuales) y otras industrias ((Hasani Zadeh *et al.*, 2017). En la Tabla 2 se presentan algunas de las aplicaciones más relevantes.

El interés de aplicación de este proyecto se centra en la biorremediación de ambientes marinos contaminados debido a la presencia de altas concentraciones de hidrocarburos, así como en la recuperación mejorada de petróleo, por lo que a continuación se detallan de forma más específicas estas aplicaciones.

3.2.1 Biorremediación y Recuperación de petróleo

La contaminación del agua debido al petróleo causa impactos negativos en los ecosistemas marinos, las criaturas marinas han sido las más vulnerables a derrames de petróleo, desde plancton microscópico hasta ballenas, y por lo tanto, la biodegradación microbiana de los hidrocarburos es un tema de gran importancia en la actualidad. La demanda mundial de petróleo crudo en 2010 fue de 86.95 millones de barriles por día, para el año 2015 aumentó a 98.3 millones de barriles por día y se proyecta que será de 118 millones de barriles por día en el año 2030 (N. Das *et al.*, 2011).

La biorremediación del petróleo crudo depende de varios factores, como la naturaleza física del petróleo (ligero o pesado), naturaleza química del petróleo (composición de hidrocarburos de petróleo), factor abiótico de sitios contaminados (temperatura, pH, contenido de agua y oxígeno, etc.), disponibilidad de nutrientes, tipo de especies microbianas y su capacidad de degradación (Gentry *et al.*, 2004). La bioaumentación y bioestimulación son dos técnicas principales que se utilizan para la biorremediación con éxito de sitios contaminados con petróleo crudo o hidrocarburos derivados. La bioaumentación es la adición de poblaciones nativas de microorganismos altamente concentradas y especializadas (cepas individuales o consorcios) al sitio contaminado con compuestos tóxicos recalcitrantes.

La recuperación química de petróleo mejorada (MEOR) por sus siglas en inglés) es un área de gran interés, debido a que los recursos petroleros se vuelven más escasos, existe la necesidad de incrementar la eficiencia de extracción de petróleo y aceites pesados. Los Bs representan una alternativa muy atractiva a estas técnicas, ya que pueden proporcionar simultáneamente un aumento de la viscosidad del agua y una disminución de la tensión interfacial, ambas actividades determinantes para la eficiencia del proceso (Raffa *et al.*, 2016)(Niu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Tabla 2 Aplicaciones industriales de los Bs

Campo de Aplicación	Función	Referencia
Petróleo: Recuperación mejorada (MEOR)	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora del drenaje de petróleo en pozos. • Liberación de crudo atrapado en los capilares de las rocas. • Humidificación de superficies sólidas. • Reducción de la tensión superficial. • Desestabilización de emulsiones oleosas. • Solubilización de aceites. • Reducción de la viscosidad. • Agentes humectantes. 	(Sen, 2008). (Silva <i>et al</i> , 2018)
Industria Farmacéutica: Agente terapéutico	<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano, antifúngico y antivírico. 	(Banat & Cameotra, 2000) (Sekhon, 2013).
Medio ambiente: Biorremediación y lavado de suelos	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsión de hidrocarburos (biodisponibilidad) • Reducción de la tensión superficial. • Secuestro de metales. • Dispersión. • Detergente. 	(Ławniczak <i>et al.</i> , 2013) (Cameotra <i>et al.</i> , 2003).
Agricultura: Control biológico.	<ul style="list-style-type: none"> • Acción directa o facilitando la acción de otros microorganismos. • Adyuvante en pesticidas y herbicidas. 	(Sachdev <i>et al.</i> , 2013).
Industria cosmética: Productos de belleza y cuidado personal	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsionantes, espumantes, solubilizantes, humectantes, agentes antimicrobianos. 	(Vecino <i>et al.</i> , 2017)
Industria Alimenticia	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsionante, solubilizante, deemulsificador, humectante, espumante, desespumante, lubricante. 	(Nitschke <i>et al.</i> , 2007)

IV. BACTERIAS DE ORIGEN MARINO

El ambiente marino es un hábitat en donde se desarrollan diversos organismos entre los cuales se encuentran un elevado número de especies bacterianas, las cuales producen una gran cantidad de metabolitos secundarios. La capacidad de producir estas moléculas les permite adaptarse a las distintas condiciones de este ambiente, como lo son los niveles de presión, temperatura, salinidad, alcalinidad o acidez del agua, disponibilidad limitada de nutrientes y asimilación de compuestos como contaminantes (Overmann *et al.*, 2016; Poli *et al.*, 2017).

Desde un punto de vista biotecnológico, las estructuras químicas producidas bajo estas condiciones pueden ser aprovechadas en diferentes procesos industriales. Debido a la variación constante de las condiciones ambientales, los microorganismos presentes en ese entorno están adaptados a las condiciones adversas, y por lo tanto, poseen características fisiológicas que les permiten sobrevivir en estas condiciones (Poursat *et al.*, 2019). Por lo tanto, las bacterias aisladas de los ambientes marinos han demostrado presentar un mayor potencial en la biorremediación de metales pesados, hidrocarburos y otros compuestos recalcitrantes y xenobióticos (P. Das *et al.*, 2008).

Los Bs sintetizados por bacterias de origen marino han recibido especial atención debido a su diversidad de estructuras químicas, estabilidad en condiciones extremas y su potencial de producción a gran escala. Géneros de bacterias de origen marino reportadas como productoras de Bs, tales como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*, los cuales han sido utilizados en numerosas aplicaciones industriales y de bioremediación, de ahí radica el interés en el aislamiento y estudio de bacterias de origen marino. En la Tabla 3, se presentan algunos ejemplos de Bs producidos por microorganismos marinos. En los últimos años este tipo de biomoléculas ha sido de interés particularmente por el uso que pueden tener en la biorremediación de ambientes marinos contaminados con petróleo crudo (Maneerat, 2005).

Tabla 3 Aplicación industrial de varios biosurfactantes / bioemulsificantes marinos

Tipo de Biosurfactante/ Emulsificante	Organismo productor	Aplicaciones
Polisacárido extracelular-lípido	<i>Alcaligenes sp. PHY 9L-86</i>	Degradación del tetradecano.
Polisacárido extracelular	<i>Pseudomonas putida ML2</i>	Degradación de hidrocarburos alifáticos y poliaromáticos
Polisacárido extracelular	<i>Planococcus maitriensis Anita I</i>	Buena propiedad de emulsificación y potencial de dispersión de aceite.
Polisacárido extracelular	<i>Antarctobacter sp.</i>	Emulsificación de aceites alimenticios y como adsorbente de metales.
Polisacárido extracelular	<i>Halomonas sp. TG39, Halomonas sp. TG 67</i>	Emulsificación de aceites alimenticios y en estabilización de emulsiones.
Glicolipopéptido	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Emulsificación y degradación de hidrocarburos.
Glicolipopéptido	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Emulsificación de hidrocarburos aromáticos y perfluorocarburos.
Glicolipopéptido	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Emulsionante termoestable, que estabiliza emulsiones de aceite en agua con varios hidrocarburos aromáticos.
Glicolipopéptido	<i>Halomonas sp. ANT-3b</i>	Biorremediación de los derrames de petróleo en ambientes marinos.
Glicolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa A41</i>	Recuperación mejorada de petróleo (MEOR Por sus siglas en inglés).
Glicolípidos	<i>Bacterial strain MM1</i>	Eliminación de la contaminación por hidrocarburos en ambientes marinos.
Lipopéptido	<i>Bacillus circulans</i>	Solubilización y utilización de hidrocarburos poliaromáticos.
Lipopéptido (Surfactina)	<i>Bacillus subtilis</i>	Solubilización de hidrocarburos, (MEOR Por sus siglas en inglés).
Lipopéptido (Liquenisina)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Solubilización de hidrocarburos, (MEOR por sus siglas en inglés).

4.1 Género *Bacillus* spp.

Los Bs son producidos por varios microorganismos que incluyen a especies del género *Bacillus*. En un intento de buscar un inhibidor de la fibrina en la formación de coágulos, se aisló por primera vez un péptido-lípido cristalino producido por *B. subtilis*, que se descubrió que no solo era un potente inhibidor de la coagulación sanguínea, sino también un potente agente de superficie. En concentraciones tan bajas como 0,005% en agua destilada, se encontró que este compuesto tensoactivo reducía la TS del agua de 72 mN/m a 27 mN/m, y se demostró que tiene una actividad en la superficie mucho mejor que, un surfactante sintético, el lauril sulfato de sodio. Este surfactante microbiano bioactivo fue denominado surfactina (Arima *et al.*, 1968). La surfactina es un Bs versátil producido por diversas cepas del género *Bacillus*. Las aplicaciones en las áreas de la salud, industria y medio ambiente hacen que la surfactina sea una biomolécula versátil, con potenciales de aplicación comercial. El descubrimiento de la surfactina y el estudio de sus cepas productoras han abierto nuevas vías en la investigación biotecnológica para encontrar, estudiar y diseñar moléculas bioactivas con propiedades versátiles y aplicaciones novedosas de amplio espectro. En la búsqueda de mejores candidatos microbianos para la recuperación de hidrocarburos, varias cepas bacterianas, en su mayoría de especies de *Bacillus* han sido evaluadas exitosamente (Varadavenkatesan *et al.*, 2013).

Los lipopéptidos son producidos por especies de *Bacillus* como metabolitos secundarios, presentan en su estructura un grupo hidrofílico (amino ácidos o péptidos; di o polisacáridos; aniones o cationes) y un grupo hidrofóbico (saturado o ácido graso insaturado). Se han encontrado más especies de *Bacillus* que producen lipopéptidos como *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus liqueniformis* (Chen *et al.*, 2017).

4.2 Biosíntesis de Lipopéptidos por el género *Bacillus*

Las cepas de *Bacillus* son productoras de péptidos bioactivos con una gran aplicación potencial en el campo de la biotecnología. Los lipopéptidos producidos por *Bacillus* incluyen la surfactina, iturina, fengicina, liquenisina y bacilomicina (Tabla 4).

Tabla 4 Secuencia peptídica y cadenas de ácidos grasos de las diferentes variantes de cada familia de lipopéptidos de *Bacillus* spp.

Nombre	Secuencia peptídica	Cadena de ácido graso
Surfactina	L-Glu-L-XS2-D-Leu-L-XS4-L-Asp-D-Leu-L-XS7	iC14, nC14 iC15, aC15
Iturina A	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC14, iC15, aC15
Iturina AL	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC16, iC16
Iturina C	L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC14, iC15, aC15
Fengicina	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	aC15, iC16, nC16
Bacilomicina	Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu	nC14, iC15, aC15
Liquenisina	L-XL1-L-XL2-D-Leu-L-XL4-L-Asp-D-Leu-L-XL7	iC13, aC13, nC14 iC15, aC15

*n saturadas

*i iso-saturadas

*a insaturadas

Adaptado de (Ariza et al., 2012).

Para que los microorganismos crezcan y produzcan la fracción hidrofílica de los Bs, generalmente se utilizan sustratos solubles en agua como los carbohidratos, mientras que los sustratos hidrófobos como las grasas y los aceites se usan para formar la porción hidrófoba de estos. (Desai *et al.*, 1997). El flujo de carbono estará regulado tanto por la vía lipogénica (generación de lípidos) como por el desarrollo de restos hidrofílicos a través de la vía glucolítica. Un sustrato soluble en agua como la glucosa se transforma en el intermedio; glucosa-6-fosfato (G6P) a través de la vía glucolítica y este intermediario es uno de los principales precursores de carbohidratos que se encuentran en la parte hidrofílica del Bs. Se utiliza una serie de enzimas para catalizar G6P en la ruta, para sintetizar diversas formas de restos hidrófilos, por ejemplo la biosíntesis de los aminoácidos que formaran la parte hidrofílica del lipopéptido (Figura 2) (Nurfarahin, et al., 2018).

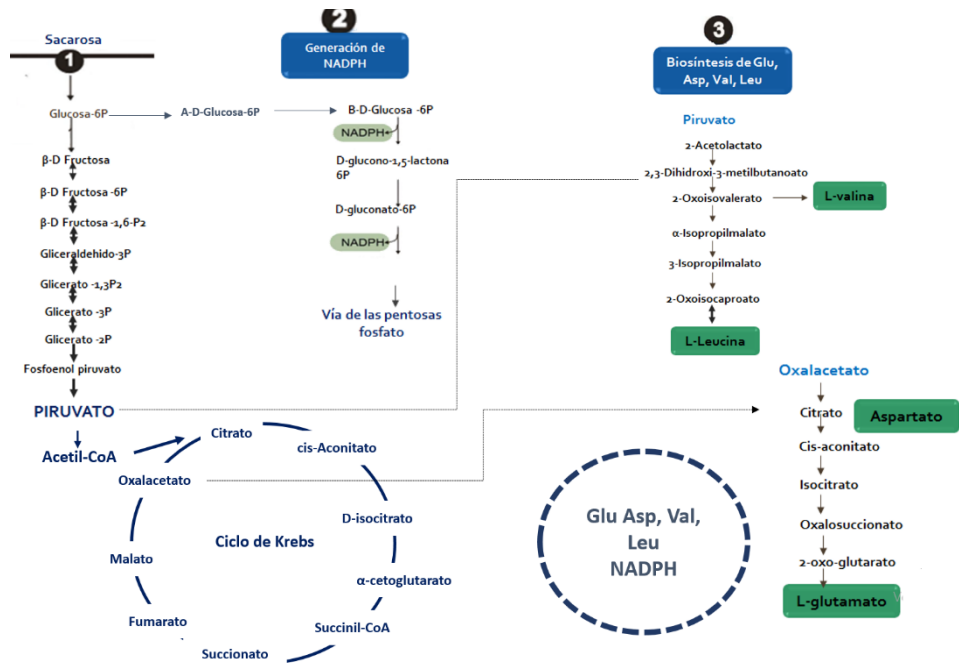


Figura 2 Biosíntesis de lipopéptidos, fracción hidrofílica.
Adaptado de (Nurfarahin, *et al.*, 2018)

Para la formación del resto hidrofóbico (lípidio), la glucosa se oxida a piruvato que luego se transforma en acetil-CoA que sintetiza a malonil-CoA cuando se combina con oxaloacetato. El oxaloacetato se convertirá en ácido graso (precursores) para la producción de lípidos (Figura 3).

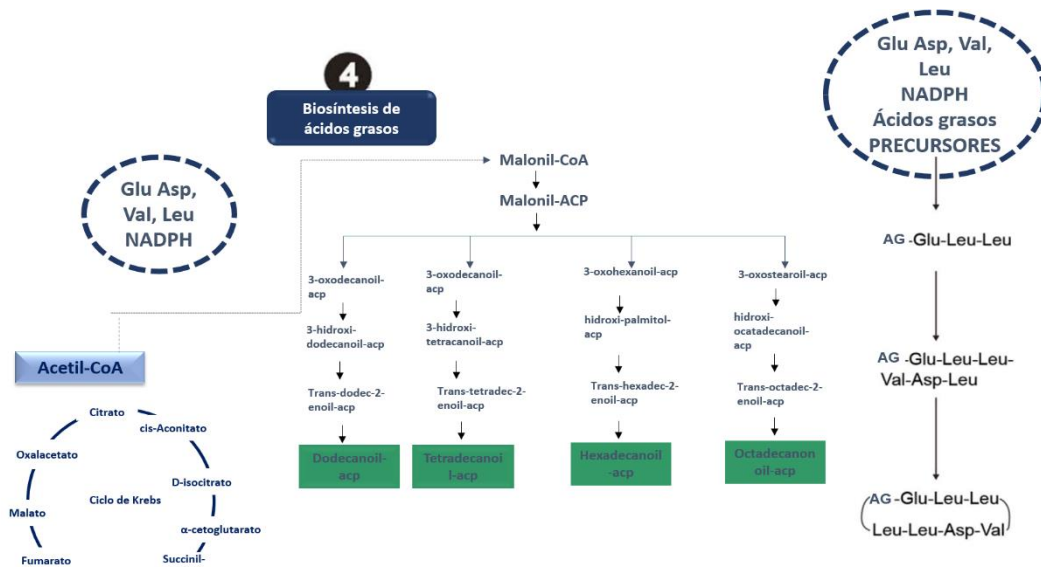


Figura 3 Biosíntesis de lipopéptidos, fracción hidrofóbica.
Adaptado de (Nurfarahin *et al.*, 2018)

La biosíntesis de los lipopéptidos se lleva a cabo por sintetetas de péptidos no ribosomales que se encargan de fijar los aminoácidos, los activan en forma de tíoésteres y los enlazan entre sí para formar la cadena peptídica. Estas enzimas son modulares, cada módulo reconoce a un amino ácido en específico, a su vez cada módulo está constituido por varios dominios que catalizan cada una de las reacciones sucesivas necesarias. Así la secuencia del péptido se ve determinada por el orden en que están dispuestos los módulos. Los aminoácidos se mantienen unidos a cada módulo por un grupo tiol (Figura 4).

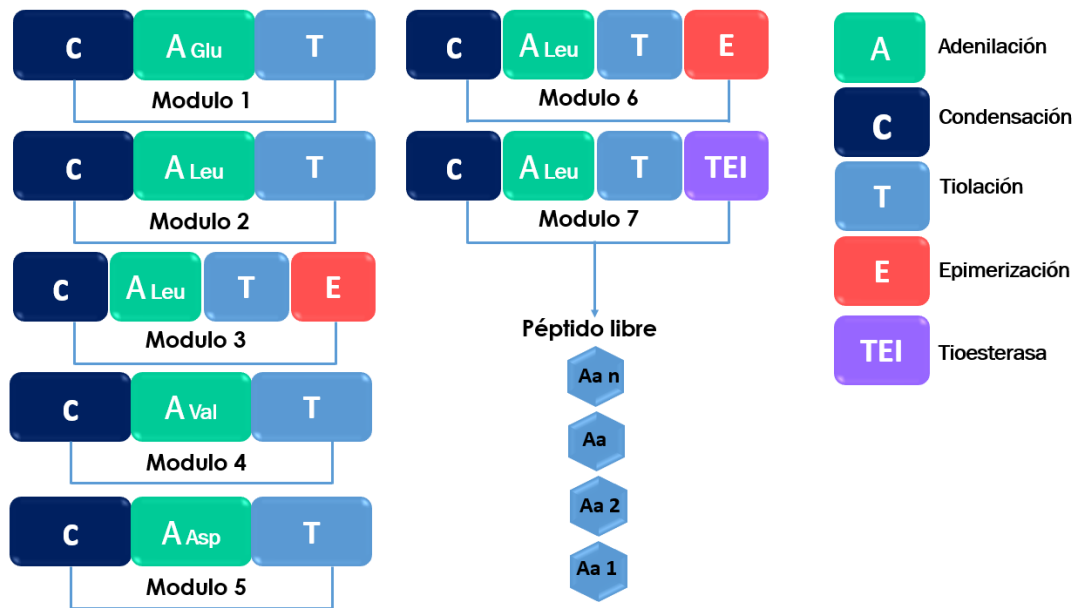


Figura 4 Biosíntesis de lipopéptidos.
Adaptado de (Zhi, *et al.*, 2017)

Cada módulo consiste de un dominio A, T y C, (Adenilación, Tiolación y Condesación,) con dominios adicionales, como el dominio de epimerización (E) o el de metilación. El de condensación (C), que cataliza el enlace peptídico; el dominio de adenilación (A), que selecciona y activa el próximo aminoácido; y el dominio acarreador de péptidos (T) y uno o dos dominios thioesterasa (TE) al final del complejo enzimático, responsables de expulsar el péptido ya sintetizado y en algunos casos llevan a cabo la ciclación del péptido de esta forma se va alongando la cadena peptídica hasta construir la molécula completa del lipopéptido (Figura 8), el enlace del lipopéptido involucra tres pasos: iniciación, elongación y terminación. (Zhi *et al.*, 2017), (Roongsawang *et al.*, 2010).

Cuando se utiliza un hidrocarburo como fuente de carbono, el mecanismo microbiano se dirige principalmente a la vía lipolítica y a la gluconeogénesis (la formación de glucosa a través de diferentes precursores de hexosa), lo que permite su uso para la producción de ácidos grasos o azúcares. La vía de la gluconeogénesis se activa para la producción de azúcares. Esta vía consiste en la oxidación de ácidos grasos a través de la β -oxidación a acetil-CoA (o propionil-CoA en el caso de ácidos grasos de cadena impar) (Figura5) (D. K. F. Santos *et al.*, 2016).

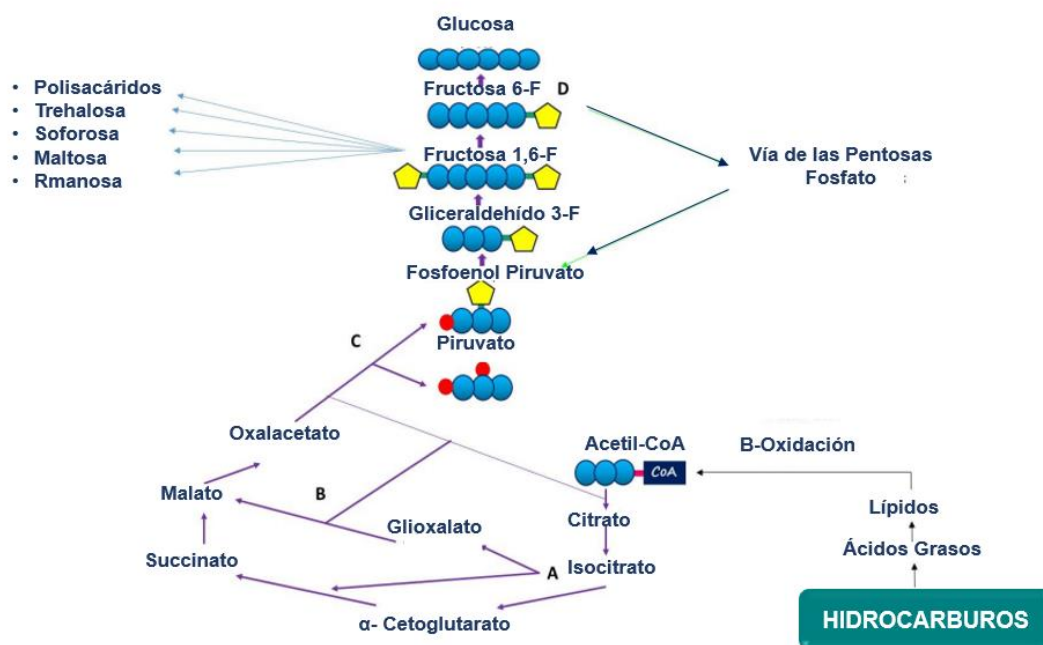


Figura 5 Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs empleando. Adaptado de (Santos, *et al.*, 2016)

V. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por hidrocarburos es un problema medioambiental de creciente importancia. Las bacterias marinas aisladas de ambientes extremos generalmente se encuentran adaptadas para crecer y prosperar en entornos que contienen petróleo y sus derivados, además juegan un papel importante para llevar a cabo técnicas de biodegradación de estos compuestos en los ambientes marinos.

Existen bacterias que son capaces de producir Bs como mecanismo para aumentar la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos como los hidrocarburos. *Bacillus sp.* es uno de géneros bacterianos reportados con mayor producción de Bs capaces de propiciar la degradación de hidrocarburos facilitando su dispersión y biodisponibilidad. Para ello es necesario estudiar a estas bacterias mediante cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos de interés utilizando distintos factores como las fuentes de carbono. Se ha reportado que el uso de fuentes de carbono hidrofóbicas optimizan la producción de Bs.

Este proyecto está enfocado en la producción de Bs del género *Bacillus* de origen marino. Al ser de origen marino pueden provenir de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos, por lo tanto estar adaptados a las condiciones de estos sitios contaminados y tener potencial aplicación en diferentes áreas como la biorremediación de hidrocarburos y la extracción mejorada de petróleo (MEOR), se busca que los Bs obtenidos tengan potencial para su aplicación en estas áreas de estudio.

VI. HIPÓTESIS

Cepas de *Bacillus* spp de origen marino son capaces de secretar agentes de origen tensoactivo los cuales difieren en su actividad bajo la presencia de distintos sustratos hidrofóbicos.

VII. OBJETIVOS

General

- Producir y caracterizar tensoactivos de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III de origen marino en presencia de sustratos hidrofóbicos (queroseno, hexadecano y aceite de coco).

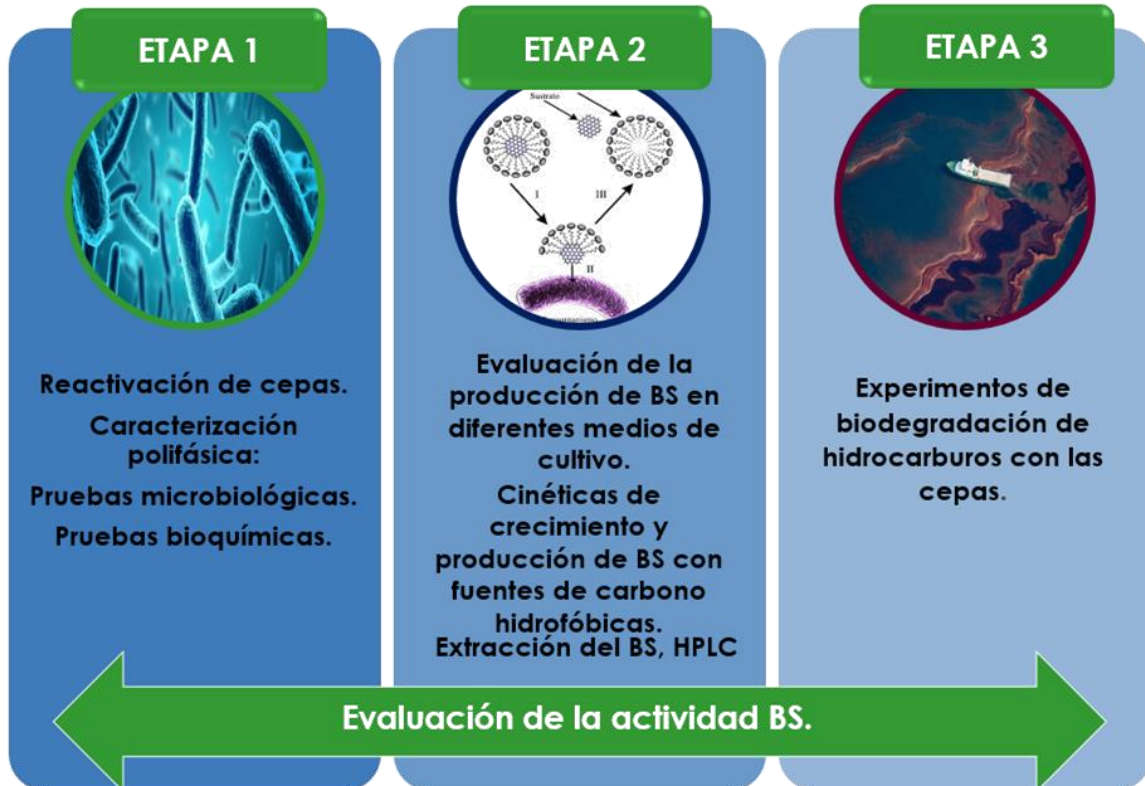
Específicos

- Caracterizar las cepas del género *Bacillus* aisladas de ambientes marinos para seleccionar cepas posibles productoras de biosurfactantes.
- Producir Bs de las cepas de *Bacillus* seleccionadas en medio con sustrato hidrofóbico.
- Caracterizar las propiedades tensoactivas de los Bs producidos.
- Evaluar la biodegradación de hidrocarburos con las cepas de *Bacillus* seleccionadas.

VIII. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

El estudio que se llevará a cabo contribuirá al conocimiento de la producción de BS por cepas de *Bacillus*, así como de la aplicación de éstos en la biotecnología ambiental.

Para ello se propone la siguiente estrategia experimental:



IX. METODOLOGÍA

9.1 Cepas bacterianas

Las cepas de *Bacillus* utilizadas en este estudio hacen parte de la colección **CICESE-UAEM. Plataforma CIGOM** (<https://cruceros.cigom.org/menu/>). Las cepas fueron aisladas de consorcios obtenidos a partir de muestras de la columna de agua tomadas en el Golfo de México. Estas muestras pertenecen a las muestras de Máxima Fluorescencia (MF) en el sitio C14 de la zona de Coatzacoalcos, Veracruz, obtenidas por M. en B. Daniel Morales Guzmán durante la campaña oceanográfica (MMF-01), las características de la zona de muestreo fueron profundidad 82 m, temperatura 17.5°C y salinidad 36.2 g/L. El aislamiento de las cepas de *Bacillus* fue realizado por el Dr. Brandt Bertrand así como la identificación molecular por MACROGENE basada en el ADNr 16S de éstas cepas *Bacillus* 12-1C-I y *Bacillus* 12-1A-III.

9.1.2 Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas fue el agar nutritivo marino (ANM), que contiene (g/L): peptona de Caseína 12; Peptona de soya 3; NaCl 5; K₂HPO₄ 2.5; extracto de carne 0.6; sal de mar 20; (NH₄)₂SO₄ 1.2; CaCl₂ 0.6. El medio de cultivo fue esterilizado con calor húmedo a condiciones de 120 C°, 15 lib, durante 15 min. Posteriormente, se prepararon cajas Petri con 20mL del medio de cultivo.

9.1.3 Conservación de las cepas

Se sembraron las cepas de *Bacillus* 12-1C.I y *Bacillus* 12-1A-III por duplicado. Las cepas se incubaron a 18° C durante 48h. Este procedimiento se realizó cuatro veces más realizando las nuevas siembras con colonias aisladas de las cajas anteriores. Se observó la morfología de colonia tomando en cuenta su tamaño, forma, coloración, aspecto y consistencia. Y su morfología microscópica realizando la técnica de Tinción de Gram. Estas tinciones se observaron con microscopio óptico utilizando el objetivo de 100x. Una vez confirmada la viabilidad, pureza e identificación microscópica por tinción de Gram, la cepa fue conservada a -70°C en un medio con glicerol al 40%.

9.2 Pruebas bioquímicas (Caracterización polifásica)

Si bien los resultados de la identificación molecular 16s correspondieron al género de *Bacillus*. Se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar la especie. Para ello se utilizaron las pruebas bioquímicas API (API® bioMérieux) siguiendo la metodología recomendada, que permite evaluar el patrón de fermentación de hidratos de carbono (API 50 CH). Cada test API 50 CH consta de una galería con cincuenta pozos que contienen una zona anaerobia (la porción en forma de tubo) para el estudio de fermentación, y una zona aerobia (la porción en forma de cúpula) para el estudio de oxidación o asimilación (Tabla 5). Cada galería estuvo constituida por 5 filas conteniendo cada una 10 tubos numerados. Se preparó una cámara de incubación (tapa o fondo) en la que se repartieron 10 mL de agua destilada en los recipientes del fondo para crear una atmósfera húmeda. Se colocó cada una de las filas del 0- 19, 20- 29, 30-39, 40-49 en el fondo de la cámara de incubación. Para la preparación del inóculo se abrió una ampolla de medio API 50CHL y se inocularon 2 colonias de la cepa. Se homogenizó y la suspensión se utilizó de inmediato, inoculando los 50 pozos sin rebasar el límite.

Tabla 5 Sustratos incluidos en cada uno de los 50 pozos de la galería API 50 CH.

Tira 0-9	Tira 10-19	Tira 20-29	Tira 30-39	Tira 40-49
0. control +	10. Galactosa	20. Metil-D-manosido	30. Melobiosa	40. D-turanosa
1. Glicerol	11. Glucosa	21. Metil-D-glucósido	31. Sucrosa	41. D-lixosa
2. Eritritol	12. Fructosa	22. N-acetilglucosamina	32. Trehalosa	42. D-tagatosa
3. D-arabinosa	13. Manosa	23. Amigdalina	33. Inulina	43. D-fucosa
4. L-arabinosa	14. Sorbosa	24. Arbutina	34. Melezitosa	44. L-fucosa
5. Ribosa	15. Ramnosa	25. Esculina	35. Rafinosa	45. D-arabitol
6. D-Xilosa	16. Dulcitol	26. Salicina	36. Almidón	46. L-arabitol
7. L-Xilosa	17. Inositol	27. Celobiosa	37. Glucógeno	47. Gluconato
8. Adonitol	18. Manitol	28. Maltosa	38. Xilitol	48. 2-ceto-glutanato
9. β- metil-D-Xiloside	19. Sorbitol	29. Lactosa	39. Gentiobiosa	49. 5-ceto glutanato

9.3 Medios de producción de Bs

Para la producción de Bs se prepararon seis medios diferentes adicionando como fuente de carbono; queroseno (marca Pochteca) 4100ppm, hexadecano (marca Sigma-Aldrich) 3850ppm y aceite de coco (marca comercial San Lucas) 400ppm.

Medio 1 MMM (g/L)*	Medio 2 MMN (g/L)**	Medio 3 MMR 50% (g/L)***	MM1 (g/L)****	MM2 (g/L)*****	MM3 (g/L)*****
Extracto de levadura- 12	Caldo de soya tripticaseína.- 30	Caldo de soya tripticaseína.- 12	KH_2PO_4 - 3	$(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$ - 4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4
Sal de mar- 10	Extracto de Carne- 1.2	Extracto de Carne- 0.6	Na_2HPO_4 - 6.7	KH_2PO_4 - 5.3	K_2HPO_4 - 5.3
Fuente de carbono hidrofóbica.	Sal de mar- 10	Sal de mar- 10	NH_4Cl - 3	Na_2HPO_4 - 6.7	KH_2PO_4 - 6.4
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.6	MgSO_4 - 0.12	CaCl_2 - 0.04	MgSO_4 - 0.39
	CaCl_2 - 1.2	CaCl_2 - 0.6	CaCl_2 - 0.001	MgSO_4 - 0.12	CaCl_2 - 0.04
	Fuente de carbono hidrofóbica.	Fuente de carbono hidrofóbica.	Elementos traza.	FeSO_4 - 0.03	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.03
			Fuente de carbono hidrofóbica.	Fuente de carbono hidrofóbica.	Fuente de carbono hidrofóbica.

*Medio marino mínimo

**Medio marino nutritivo

***Medio marino reducido 50%

****Medio mínimo 1

***** Medio mínimo 2

*****Medio mínimo 3

9.4 Cinéticas de crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción

1mL de concentrado de células de cada cepa proveniente de los gliceroles a -70C fueron activados en medio MMN en matraces Erlenmeyer de 500mL con 100mL del medio y se incubaron a 18°C durante 12h a 200rpm.

Los precultivos fueron centrifugados y el pellet fue resuspendido en MMN estéril a volumen 2mL. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500mL con 200 mL de medio y ajustando a 0.05 D.O como inóculo, las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos fueron incubados con agitación a 200 rpm a 18°C. Se tomaron muestras cada 24 h para realizar pruebas de TS y emulsión. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (prueba Tukey) utilizando el software SAS versión 9.00 con α igual a 0.05.

9.5 Evaluación de la producción de Bs

Las cepas de *Bacillus* fueron incubadas en 200mL de MMN 50% (evaluado como el mejor medio de producción) en matraces de 500mL después del periodo de incubación (24h). Los medios de cultivo se centrifugaron a 10,000rpm durante 10 min. Se realizaron las pruebas para evaluar la producción de Bs con el sobrenadante obtenido, mediante diferentes técnicas analíticas.

9.6 Extracción y purificación de los Bs

El Bs se extrajo a partir del medio de cultivo de las cepas productoras de *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III, el cual se centrifugó a 11000rpm durante 20 min. El sobrenadante libre de células se filtró con vacío. El sobrenadante libre de células filtrado se ajustó a pH 2 agregando HCl (1M) y se mantuvo a 4°C durante la noche para precipitar los lipopéptidos. La solución que incluía el precipitado se centrifugó en tubos falcon de 50mL estériles durante 30min a 7000 rpm y 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en agua mili Q. Finalmente se neutralizó utilizando NaOH (1M).

9.7 Estabilidad del Bs

Los estudios de estabilidad se realizaron de acuerdo con Obayoriet (Obayori *et al.*, 2009). Se utilizó el sobrenadante del cultivo de la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, que por su análisis por HPLC contiene los Bs de tipo lipopérido. Para estudiar la estabilidad al calor, las muestras fueron calentadas a 20, 40, 60, 80 y 90 grados Celsius durante 30 minutos en un thermoblock. Adicionalmente, las muestras también se esterilizaron en autoclave (121 °C, 20 min). El efecto del pH se estudió ajustando el pH de las muestras a 3, 5, 7, 9, y 10 usando 1 N HCl / NaOH. La estabilidad se evaluó realizando la medición de la tensión superficial.

X. TECNICAS ANÁLITICAS

10.1 Evaluación de la actividad Bs

Para evaluar la producción de Bs se utilizaron los siguientes métodos: índice de emulsificación, actividad hemolítica y TS.

10.2 Índice de emulsión

El índice de emulsificación fue adaptado de la técnica descrita por Cooper y Goldenberg (Cooper *et al.*, 1987). Se mezclan 3mL de queroseno y 2mL del sobrenadante en un tubo de ensayo. Posteriormente se agita en vórtex a la máxima velocidad por 2 minutos y se deja reposar 24h. El índice de emulsión estable se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (mm) dividido por la altura total de la columna líquida (mm), a partir de la siguiente formula:

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura de la zona emulsionada}}{\text{Altura del líquido total (zona del aceite+zona emulsionada)}} \times 100$$

10.3 Actividad hemolítica

Las colonias aisladas se incubaron en agar marino que contenía 5% (v/v) de sangre y se incubaron a 30 ° C durante 24 h. La actividad hemolítica del cultivo bacteriano se detectó por la zona de halo transparente alrededor de las colonias.

10.4 Tensión Superficial

Las cepas productoras de agentes tensoactivos se pueden evidenciar mediante la disminución de la TS del medio de cultivo en el que se encuentran. El análisis de tensión superficial se llevó a cabo mediante el método de la placa utilizando el tensiómetro Kruss-K20. Se utilizó una placa de platino muy precisa suspendida verticalmente a una balanza de precisión en donde el lado inferior de la placa se pone en contacto horizontalmente con la superficie del líquido para que se moje. Como blanco y para verificar el buen funcionamiento del tensiómetro, se midió la TS del agua reportada en 72.8mN/m. Cada medición se realizó por triplicado utilizando los sobrenadantes libres de células y los respectivos controles a temperatura ambiente.

10.5 Cuantificación del Bs

Para cuantificación de Bs producido por las cepas de *Bacillus*, el sobrenadante o los extractos concentrados previa extracción con solventes (descrito previamente) fue realizado por Cromatografía Líquida de alta Eficiencia (HPLC- Waters 996 Photodiode Array Detector, con inyector Mod. 7725i). Para el análisis de surfactinas e iturinas la corrida en gradiente (Tabla x) fue realizada con el sistema de solventes C₂H₃N:0.1%TFA H₂O:0.1%TFA con un flujo de 1 ml/min. La inyección de la muestra fue de 50 µL y el tiempo de corrida fue de 30 minutos a una temperatura de 30°C. Se utilizó un detector de arreglo de diodos. La concentración de surfactina control SIGMA producida por *Bacillus subtilis*, fue de 50µg/mL, la concentración de los extractos de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III fue medida mediante el área bajo la curva en comparación con la curva del estándar.

Tabla 6 Análisis de HPLC. Condiciones de gradiente.

Tiempo (min)	A %H ₂ O	B % C ₂ H ₃ N
0	63	37
10	63	37
11	20	80
21	20	80
22	63	37
30	63	37

XI. CUANTIFICACIÓN DE HCs

Para realizar los experimentos de biodegradación de hidrocarburos se prepararon matraces Erlenmeyer de 50mL con 18 mL de medio mínimo Czapeck que contiene (g/L): NaNO_3 4, K_2HPO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, KCl 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, Sal de mar 25, adicionado con 1000 ppm de petróleo API-16-20, como única fuente de carbono. Se preparó un preinóculo (como se describe en el apartado cinéticas de crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción) utilizando 2 mL de concentrado de células lavadas provenientes de gliceroles a -70°C .

Después de 24h de incubación, las células fueron lavadas para eliminar el medio de cultivo. Se inocularon las cepas a una D.O de 0.05 a una longitud de onda de 600nm en los matraces anteriormente mencionados.

Los experimentos de biodegradación fueron realizados por triplicado con sus respectivos controles abióticos a 20°C a 200rpm durante 30 días. Después de los 30 días de incubación se realizó la extracción de los hidrocarburos remanentes en las condiciones que se describen a continuación.

11.1 Extracción de hidrocarburos

La extracción de hidrocarburos se llevó a cabo adicionando 20 μL de HCl 1M a cada matraz del ensayo de remoción, los cuales fueron incubados durante 12 h a 4°C . Posteriormente el cultivo fue transferido a tubos de teflón, recuperando el petróleo de los matraces adicionando diclorometano, para separar la fase orgánica de la fase acuosa, los tubos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 10 min. La fase orgánica fue recuperada y transferida a matraces bola, en donde se evaporo el diclorometano en un rotavapor a sequedad, el petróleo que quedó en los matraces fue resuspendido en 1.5 mL de diclorometano y colocado en viales, para la cuantificación de hidrocarburos se llevó a cabo su análisis posterior en Cromatografía de Gases (CG). El análisis de cromatografía de gases se realizó en equipo Hewlett Packard, modelo HP5890 equipado con detector de ionización de flama a una temperatura de 150°C .

XII. RESULTADOS

12.1 Caracterización Polifásica

La caracterización polifásica es utilizada en estudios taxonómicos de un grupo de organismos, utilizando un conjunto de técnicas designadas para proporcionar datos genotípicos y fenotípicos. Como un primer paso para identificar microorganismos es importante realizar un enfoque polifásico, utilizando métodos tradicionales de microbiología, pruebas enzimáticas y pruebas metabólicas (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

12.1.2 Pruebas microbiológicas y microscópicas

Las cepas de *Bacillus spp.* 12-IC-I y 12-IA-III fueron crecidas en medio nutritivo marino y se observaron sus características morfológicas en medio sólido. Se tomaron colonias aisladas para realizar la técnica de tinción Gram

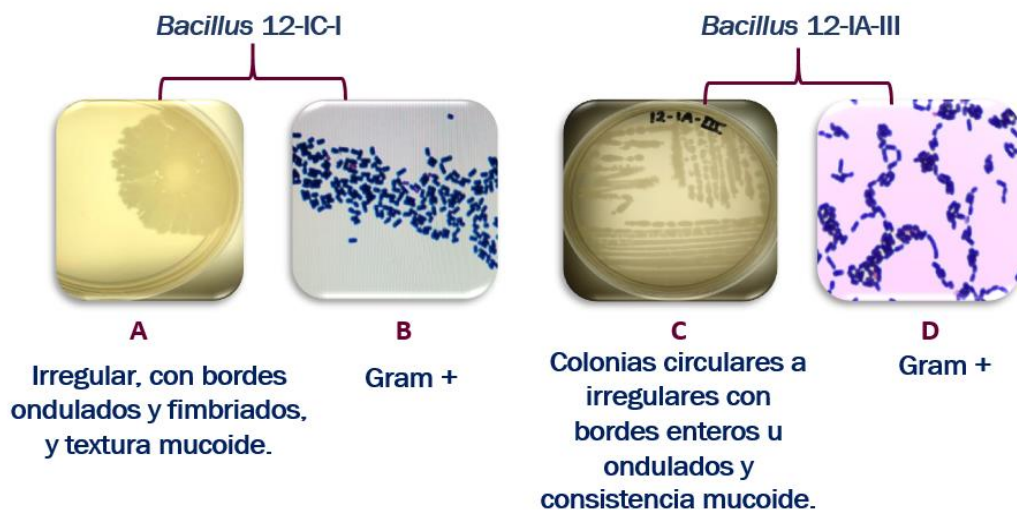


Figura 6 Morfología colonial bacteriana e identificación microscópica de la tinción de Gram de las cepas de *Bacillus 12-IC-I* (A y B) y *Bacillus 12-IA-III* (C y D)

12.1.3 Pruebas Bioquímicas

Se empleó el sistema API 50 CHB concebido para caracterizar el metabolismo de los carbohidratos de *Bacillus* e identificar a las bacterias pertenecientes a este grupo.

Tomando como referencia las pruebas bioquímicas que se describen en el manual de clasificación de Bergey para diferentes especies del género *Bacillus* (Bergey *et al* 2011).

Se realizó una comparación con los resultados del perfil bioquímico aportados por los test API 50 CHB para la cepa de *Bacillus subtilis* de origen terrestre y las cepas aisladas de origen marino *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III, esta comparación se presenta en anexos.

Tabla 7 Comparación de la utilización de sustratos entre las cepas marinas y el control *Bacillus subtilis* presentadas en el test bioquímico API 50 CHB.

Carbohidrato	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> 12-IC-I	<i>Bacillus</i> 12-IA-III
Glicerol	+	-	+
Ribosa	-	+	-
D-xilosa	-	+	+
Dulcitol	-	-	+
Manitol	-	+	+
Sorbitol	+	+	-
Salicin	+	-	+
Maltosa	+	-	+
Melobiosa	-	-	+
Trehalosa	+	-	-
Rafinosa	-	-	+
Starch	+	-	-
Glucogéno	+	-	-
Gentibiosa	+	-	-
D-turanosa	+	-	-

La tabla 7 muestra una comparación de los resultados del perfil bioquímico aportados por los test API 50 CHB para las cepas aisladas *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III de origen marino y el control de *Bacillus subtilis* de origen terrestre, las cepas marinas presentan diferencias en distintos carbohidratos del test de las galerías API 50 CHB con respecto al control.

Tabla 8 Comparación de la utilización de sustratos entre las cepas marinas presentadas en el test bioquímico API 50 CHB.

Carbohidrato	<i>Bacillus</i> 12-IC-I	<i>Bacillus</i> 12-IA-III
Ribosa	+	-
L-xilosa	-	+
Dulcitol	-	+
Inositol	-	+
Sorbitol	+	-
Metil-D-glucosida	-	+
N-acetil-glucosamida	-	+
Salicin	-	+
Maltosa	-	+
Melobiosa	-	+
Trehalosa	+	-
Rafinosa	-	+

Por otro lado también se pueden observar diferencias en los resultados del consumo de los carbohidratos utilizados por las dos cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III de origen marino las cuales se presentan en la tabla 8.

12.1.4 Actividad Hemolítica

Cada cepa se sembró en una placa de agar sangre y se incubó a 37 °C durante 24 h. Las placas fueron revisadas visualmente para la detección de halos de hemólisis alrededor de las colonias.

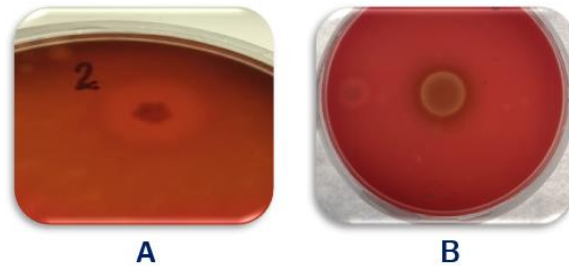


Figura 7 Actividad hemolítica de las cepas de *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus* 12-IC-I.

En este estudio ambas cepas presentaron actividad hemolítica. En el caso de la cepa *Bacillus* 12-IA-III el tipo de hemólisis que se presenta es de tipo beta: en este caso la hemólisis es total y el halo que rodea a las colonias es totalmente transparente. En el caso de la cepa *Bacillus* 12-IC-I se presenta hemólisis de tipo alfa: es una hemólisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verdoso (Figura 7). El ensayo de la actividad hemolítica nos permite contar con un resultado preliminar sobre la producción de Bs, como se observó las cepas de *Bacillus* fueron capaces de producir actividad hemolítica lo que pudo indicar la posibilidad de las producción de Bs, por las dos bacterias.

12.2 Crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción

Con el propósito de encontrar el medio de cultivo con la mayor productividad, se probaron seis medios distintos para ambas cepas, variando las concentraciones de sus componentes. Para lo cual se tomaron muestras a los 24, 48 y 72 h.

Tabla 9 Resultados obtenidos de la reducción de la tensión superficial para la cepa *Bacillus* 12-IC-I crecida en diferentes medio de cultivo

MEDIO	Tensión Superficial (mN/m) Inicial	Tensión Superficial sobrenadante (mN/m)			% de la reducción de la TS		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
Medio mínimo 1	60	42.9 C	46.7 C	46.9 C	51.81	40.3	40.30
Medio mínimo 2	61	59.7 A	56.8 A	59.9 A	1.0	9.6	0.3
Medio mínimo 3	60	58.2 B	51.8 B	49.8 B	5.45	24.8	30.9
Medio Marino Nutritivo	59	29.5D	27.2 E	58.9 A	92.4	99.3	3.33
Medio Marino Reducido	60	28 E	27 EK	40.8 D	96.9	100	58.1
Medio Marino Mínimo	60	29.8 DE	30.5 D	60 A	91.5	89.3	0.0

*Las letras mayúsculas diferentes indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos, la letra mayor de acuerdo al orden del abecedario indica el mejor tratamiento. P= 0.05

El análisis de varianza para la cepa *Bacillus* 12-IC-I señala que los seis medios ejercen distintos efectos sobre la reducción de la tensión superficial y por lo tanto sobre la producción de Bs. De acuerdo a los resultados expresados en la tabla 9 de las pruebas de producción para la cepa *Bacillus* 12-IC-I durante las primeras 48h, el medio donde hubo una mayor producción tomando en cuenta la reducción de la tensión superficial con un 100%, fue el medio marino reducido que corresponde al MNM 50%

Tabla 10 Resultados obtenidos de la reducción de la tensión superficial para la cepa *Bacillus* 12-IA-III crecida en diferentes medio de cultivo

MEDIO	Tensión Superficial (mN/m) Inicial	Tensión Superficial sobrenadante (mN/m)			% de la reducción de la TS		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
Medio mínimo 1	60	59 BA	56.7 B	55 C	3.03	10.0	15.15
Medio mínimo 2	61	53.5 C	51.2 B	54 CD	19.6	26.6	18.18
Medio mínimo 3	60	59.8 A	54.4 C	60 A	0.6	16.9	0.0
Medio Marino Nutritivo	59	30 D	28.8 E	54.8 BCD	90.9	94.5	15.75
Medio Marino Reducido	60	29.8 D	28 EK	52.5 D	91.5	96.9	23.63
Medio Marino Mínimo	60	30 D	30.6 D	56 B	90.9	89.0	12.12

*Las letras mayúsculas diferentes indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos, la letra mayor de acuerdo al orden del abecedario indica el mejor tratamiento. P= 0.05

Las pruebas de producción para la cepa de *Bacillus* 12-IA-III durante las primeras 48h, arrojan como resultado tanto como para el medio marino nutritivo como para el medio marino reducido una reducción de la tensión superficial donde no existen diferencias significativas, se decidió utilizar el medio marino reducido debido a que las concentraciones de los reactivos son menores en comparación al medio marino nutritivo.

El análisis de varianza para la cepa *Bacillus* 12-IA-III señala que el medio marino nutritivo y medio marino reducido ejercen el mismo efecto sobre la reducción de la tensión superficial y por lo tanto sobre la producción de Bs.

Cabe destacar que el análisis estadístico se realizó para cada uno de los tiempos 24, 48 y 72 h y además se realizó un análisis de todos los datos en conjunto, para ambos análisis el mejor medio valorado para ambas cepas fue el medio marino reducido.

12.3 Cinéticas para la producción del Bs con fuentes hidrofóbicas como fuente de carbono (queroseno, hexadecano y aceite de coco)

12.3.1 Cinética con queroseno como fuente de carbono

A continuación se muestran los resultados de la producción de Bs tomando en cuenta la reducción de la tensión superficial en cultivo en medio marino reducido adicionado con queroseno para las cepas *Bacillus* 12-IA-III y *Bacillus* 12-IC-I.

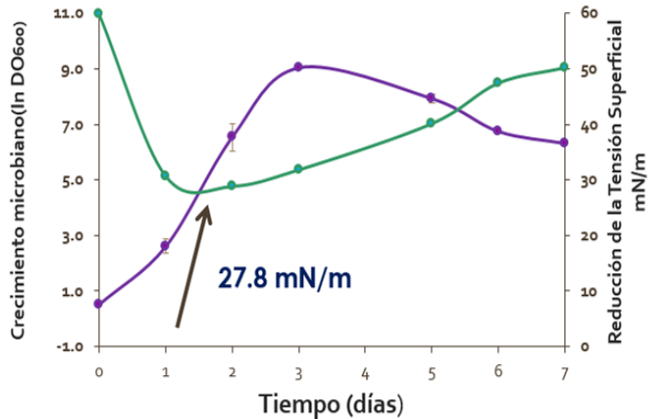


Figura 9 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en queroseno (4000) como fuente de carbono. DO (línea morada) y TS (línea verde).

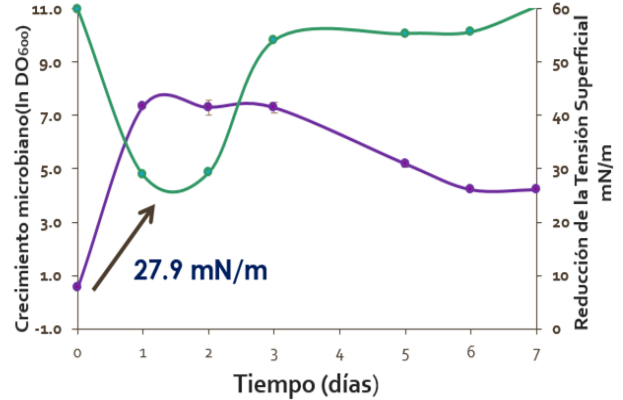


Figura 8 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IA-III en queroseno como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en queroseno (4000) como fuente de carbono. DO (línea morada) y TS (línea verde).

En la figura 8 se presenta el crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus* 12-IC-I alcanzando 9.031 DO indicado en color morado, en color verde se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 27.8mN/m durante las primeras 48 h, por lo que se consideró éste como el máximo en la producción del Bs para ésta cepa. En el crecimiento bacteriano de la de cepa *Bacillus* 12-IA-III se presenta en la figura 9.

El máximo crecimiento se obtiene a las 24 h con una DO de 7.33, en color verde se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 27.9mN/m durante las primeras 24 h.

En la tabla 11 se resumen los datos de crecimiento correlacionado con la reducción de la tensión superficial como respuesta en el aumento de la producción de Bs.

El valor mínimo registrado fue de 27.9mN/m durante las primeras 24 h para la cepa 12-IA-III con una reducción de la TS de 94.24 %, por otro lado la cepa *Bacillus* 12-IC-I presentó un mayor porcentaje de reducción (94.54%) a las 48 h con un valor de 27.8 mN/m.

Tabla 11 Resultados obtenidos del crecimiento bacteriano de las cepas *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus*12-IC-I y la producción de Bs (reducción TS) en MMR con queroseno.

Cepa	Tiempo Horas	Crecimiento bacteriano (DO)	Tensión superficial mN/m
<i>Bacillus</i> 12-IA-III	24	7.33	27.9
<i>Bacillus</i> 12-IC-I	24 -48	9.031	27.8

*Tensión superficial del medio 60 mN/m

El valor mínimo registrado fue de 27.9mN/m durante las primeras 24 h para la cepa 12-IA-III con una reducción de la TS de 94.24 %, por otro lado la cepa *Bacillus* 12-IC-I presentó un mayor porcentaje de reducción (94.54%) a las 24 h con un valor de 27.8 mN/m.

12.3.2 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I Y 12-IA-III crecidas en medio con queroseno

Como se mencionó anteriormente el género *Bacillus* es capaz de producir distintos tipos de lipopéptidos, en los que se encuentran las iturinas, bacilomicinas y surfactinas. Para poder identificar si en los extractos obtenidos de las cepas *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III la producción fue únicamente de surfactinas, se propuso un nuevo análisis cromatográfico cambiando las condiciones, este nuevo análisis permite la separación de lipopéptidos, bacilomicinas y surfactinas, se pueden observar las bacilomicinas en un rango de tiempo de retención del minuto 1 al 14, mientras que las surfactinas se pueden observar en un rango de tiempo de retención del minuto 14 al 30.

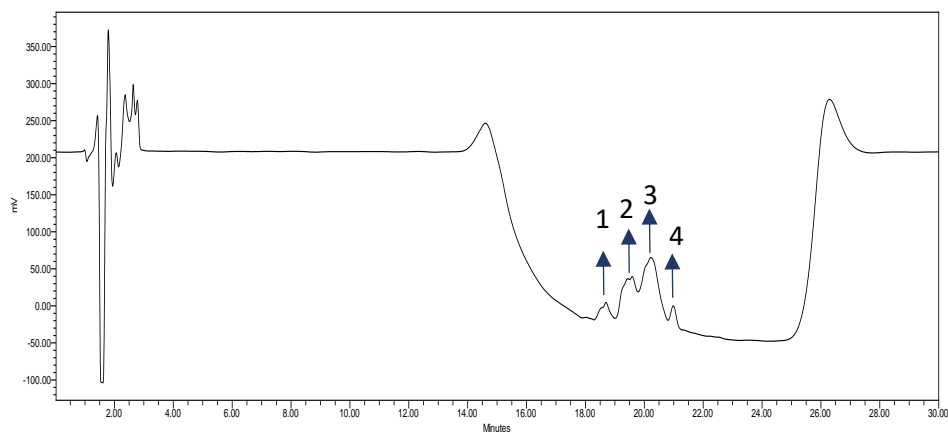


Figura 10 Perfil cromatográfico del estándar de la surfactina SIGMA.
 Producida por *Bacillus subtilis*, concentración 50 μ g/mL, fracción 1-surfactina C13,
 fracción 2-surfactina, fracción 3-surfactina C14, fracción 4 surfactina C-15.

En la Figura 10 se muestra el cromatograma de HPLC del estándar de surfactina Sigma (pureza 98%, 50 μ g/mL) el cual se utilizó como referencia para la cuantificación de los Bs obtenidos de los extractos de las cepas de *Bacillus* 12-IA-III y *Bacillus* 12-IC-I.

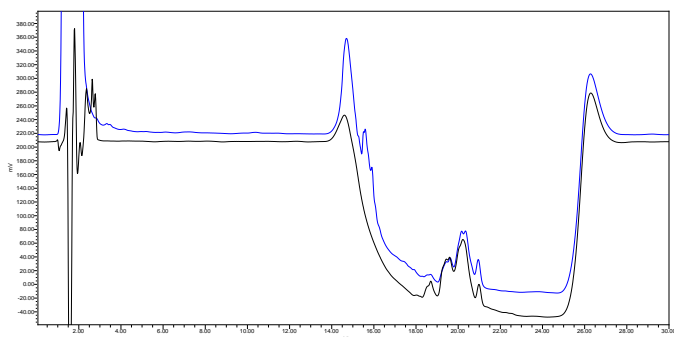


Figura 11 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 μ g/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IC-I obtenido en medio marino con queroseno.

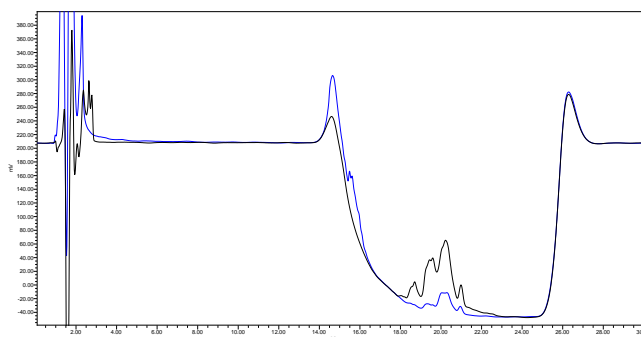


Figura 12 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 μ g/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IA-III obtenido en medio marino con queroseno.

Como se puede observar para la surfactinas puras se presentan 4 picos. Para analizar el cromatograma del producto semi purificado de la cepa de *Bacillus* 12-IC-I se realizó una comparación con el perfil cromatográfico del estándar de surfactina el cual presenta cuatro picos principales.

El extracto presenta un perfil cromatográfico con cuatro picos similares a los arrojados por el perfil de la surfactina, con tiempos de retención similares, además se descarta la presencia de baciolomicinas (Figura11). El extracto de la cepa de *Bacillus* 12-IA-III se comparó con el perfil cromatográfico del estándar de surfactina. El extracto presenta un perfil cromatográfico en donde se observan cuatro picos principales (Figura 12) las cuales presentan similitud a las fracciones presentes en el perfil de la surfactina, con tiempos de retención similares, descartando de igual manera a la cepa *Bacillus* 12-IA-III la presencia de baciolomicinas, ambas crecidas en medio marino con queroseno. Los ensambles de los perfiles cromatográficos pertenecientes al estándar de la surfactina en comparación con los extractos de las cepas *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III , en donde se pude ver la similitud entre las fracciones así como de los tiempos de retención, la concentración obtenida de surfactina fue de 35.6 µg/mL y 11.1 µg/mL respectivamente.

12.4 Cinética con hexadecano como fuente de carbono

Las siguientes graficas muestran los resultados de la producción de Bs tomando en cuenta la reducción de la tensión superficial en medio marino reducido adicionado con hexadecano como fuente de carbono para las cepas *Bacillus* 12-IA-III y 12-IC-I.

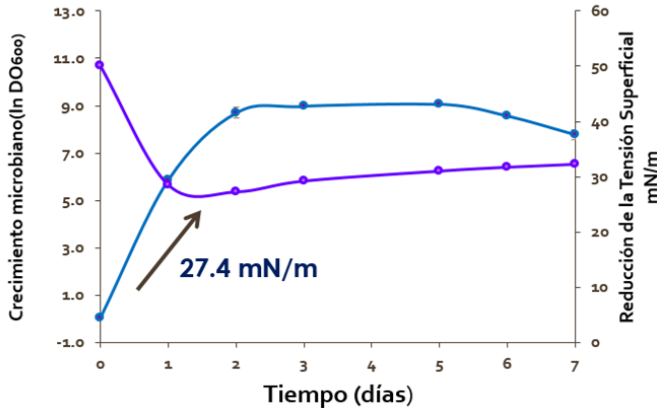


Figura 13 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IC-I en hexadecano como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en hexadecano (4000) como fuente de carbono. DO (línea azul) y TS (línea morada).

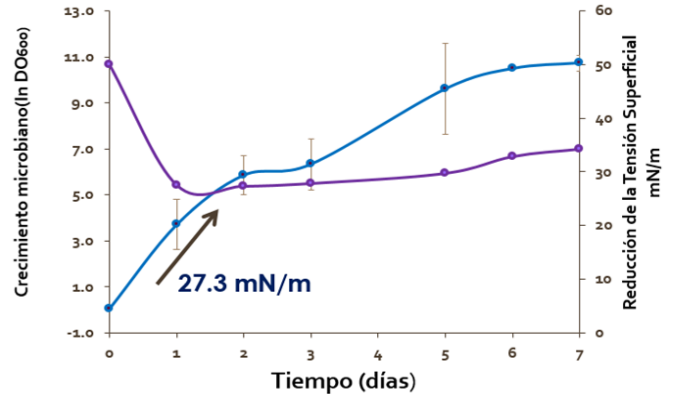


Figura 14 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IA-III en hexadecano como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en hexadecano (4000) como fuente de carbono. DO (línea azul) y TS (línea morada).

En la figura 13 se muestra el crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus* 12-IC-I alcanzando 9.04 DO indicado en color azul, en color naranja se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 27.4mN/m durante las primeras 48 h, por lo que se consideró éste como el máximo en la producción del Bs para ésta cepa. En el crecimiento bacteriano de la de cepa *Bacillus* 12-IA-III se presenta en la figura 14. El máximo crecimiento se obtiene con una DO de 10.50, en color naranja se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 27.3mN/m durante las primeras 48 h. En la tabla 12 se resumen los datos de crecimiento correlacionado con la reducción de la tensión superficial como respuesta en el aumento de la producción de Bs.

Tabla 12 Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs para las cepas *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus*12-IC-I en MMR con hexadecano.

Cepa	Tiempo Horas	Crecimiento bacteriano (DO)	Tensión superficial mN/m
<i>Bacillus</i> 12-IA-III	48	5.85	27.3
<i>Bacillus</i> 12-IC-I	48	8.70	27.3

*Tensión superficial del medio 60 mN/m

12.4.1 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I Y *Bacillus* 12-IA-III crecidas en medio con queroseno

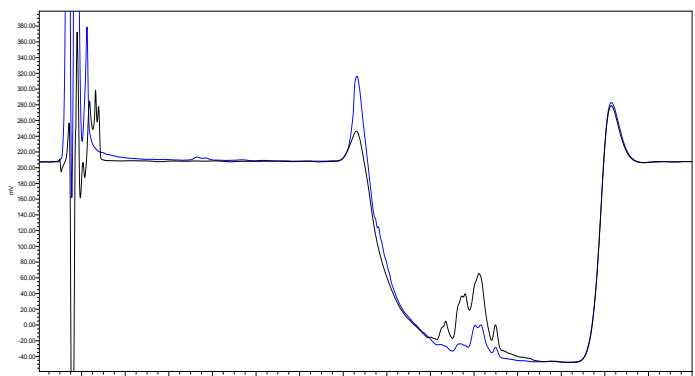


Figura 15 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IC-I obtenido en medio marino con hexadecano.

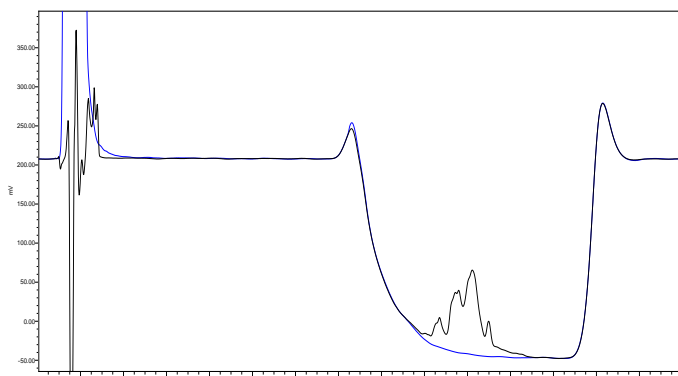


Figura 16 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IA-III obtenido en medio marino con hexadecano.

En la figura 15 se muestra el perfil cromatográfico del extracto de la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, el cual presenta cuatro picos principales, las cuales coinciden con el perfil del estándar de la surfactina y también se puede descartar la presencia de bacilomicinas en presencia del hexadecano adicionado al medio de cultivo como fuente de carbono, el ensamble de los perfiles cromatográficos permite ver la similitud entre las fracciones así como de los tiempos de retención, la concentración obtenida del extracto fue de 15.2 µg/mL, para esta cepa.

Mientras que el perfil cromatográfico del extracto de la cepa de *Bacillus* 12-IA-III (Figura 16), se observa que no existe la presencia de ninguna de las fracciones, lo que puede indicar que la fuente de carbono utilizada así como las condiciones del cultivo no fueron las óptimas para la producción del lipopéptido para esta cepa, sin embargo en la cinética de crecimiento se presenta una disminución de la tensión superficial, el realizar el análisis por HPLC de este extracto nos permite saber que el tipo de Bs que se está produciendo por la cepa de *Bacillus* 12-IA-III no fue posible de visualizar mediante las técnicas de extracción que se utilizaron.

12.5 Cinética con aceite de coco como fuente de carbono

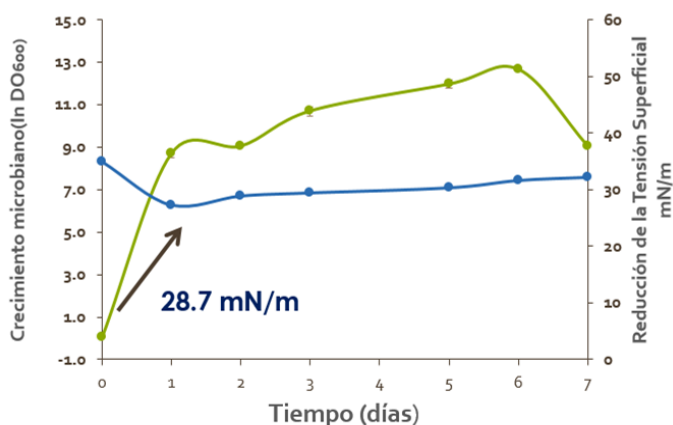


Figura 18 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IC-I en aceite de coco como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en aceite de coco como fuente de carbono. DO (línea verde) y TS (línea azul).

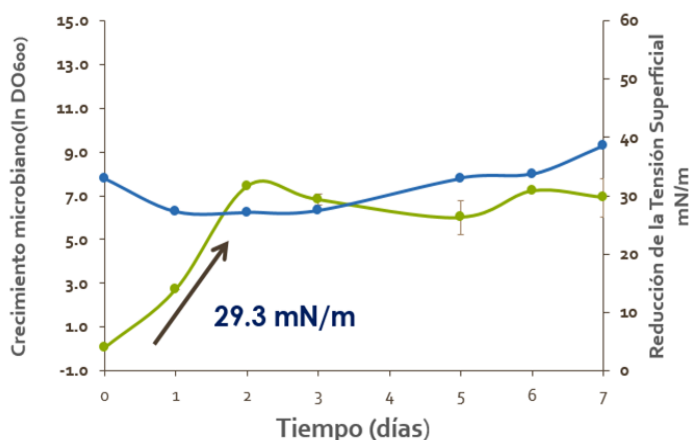


Figura 17 Cinética de crecimiento de la cepa *Bacillus* 12-IA-III en aceite de coco como fuente de carbono.

A nivel matraz con volumen final de 200mL; 200 rpm, 15 °C en aceite de coco como fuente de carbono. DO (línea verde) y TS (línea azul).

Las gráficas muestran los resultados de la producción de Bs tomando en cuenta la reducción de la tensión superficial en medio marino nutritivo adicionado con aceite de coco para las cepas *Bacillus* 12-IA-III y 12-IC-I.

La figura 17 muestra el crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus* 12-IC-I alcanzando el máximo de crecimiento con 12.65 DO indicado en color verde, en color azul se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 28.7mN/m durante las primeras 24 h, sin embargo la tensión superficial del medio de cultivo adicionado con aceite de coco es de 35 mN/m, por lo que el porcentaje de reducción de la tensión es mínimo, esto puede indicar una baja producción del Bs.

En el crecimiento bacteriano de la cepa *Bacillus* 12-IA-III se presenta en la figura 18. El máximo crecimiento se obtiene con una DO de 7.43, en color azul se muestra la reducción de la tensión superficial en donde el valor mínimo registrado fue de 29.8 mN/m durante las primeras 48 h.

En la tabla 13 se resumen los datos de crecimiento correlacionado con la reducción de la tensión superficial como respuesta en el aumento de la producción de Bs.

Tabla 13 Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs para las cepas *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus*12-IC-I en MMR con aceite de coco.

Cepa	Tiempo Horas	Crecimiento bacteriano (DO)	Tensión superficial mN/m
<i>Bacillus</i> 12-IA-III	48	7.43	29.3
<i>Bacillus</i> 12-IC-I	24	8.70	28.7

12.5.1 Perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I Y 12-IA-III crecidas en medio con aceite de coco

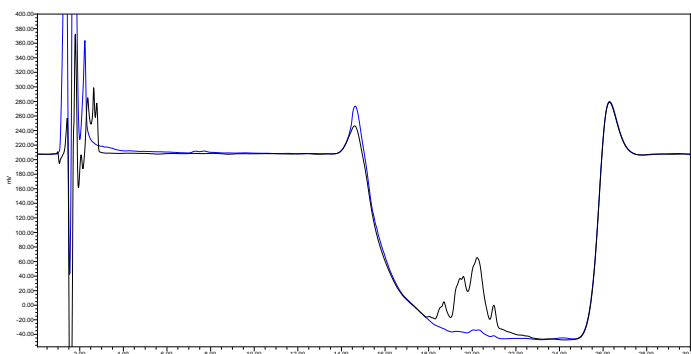


Figura 20 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IC-I obtenido en medio marino con aceite de coco.

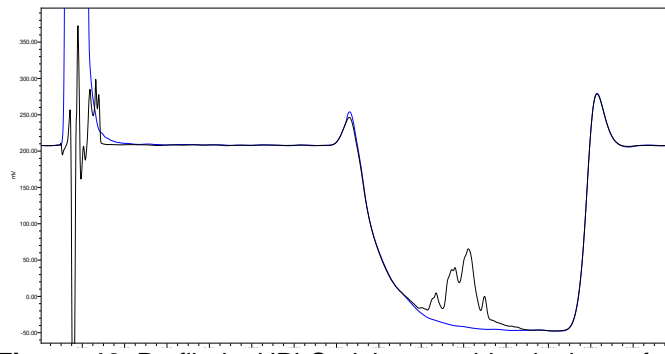


Figura 19 Perfil de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 µg/mL (línea negra) producida por *B. subtilis* y el extracto semi purificado (línea azul) producido por *Bacillus* 12-IA-III obtenido en medio marino con aceite de coco.

Se muestra el perfil cromatográfico del extracto de la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, en el cual existe la presencia de un pico que corresponde a la fracción uno del perfil cromatográfico del estándar de la surfactina, la concentración de esta fracción fue de 2.8 µg/mL (Figura 22). Mientras que el extracto de la cepa de *Bacillus* 12-IA-III en presencia de aceite de coco presenta un perfil cromatográfico en el cual se puede observar que no existe una producción de surfactinas ni de bacilomicinas.

Tabla 14 Producción de surfactina por las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III en diferentes fuentes de carbono hidrofóbicas.

Fuente de carbono hidrofóbica	Concentración mg/mL Extracto liofilizado	Surfactinas del extracto purificado* (ug/mL)
Cepa de <i>Bacillus</i> 12-IC-I		
Queroseno	5.19	35.6
Hexadecano	1.39	15.2
Aceite de coco	0.77	28.0
Cepa de <i>Bacillus</i> 12-IA-III		
Queroseno	3.65	11.1
Hexadecano	0	0
Aceite de coco	0	0

* (HPLC)

En la tabla 14 se resumen las concentraciones obtenidas de los extractos liofilizados y los extractos purificados por HPLC de ambas cepas, tanto en el extracto obtenido por precipitación acida, como en el extracto purificado por cromatografía, ambas cepas tuvieron una mejor respuesta en presencia de queroseno como fuente de carbono.

12.6 Cinética de producción de Surfactina por la cepa de *Bacillus* 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la fuente de carbono que favoreció la producción de surfactinas fue el queroseno, con la cepa *Bacillus* 12-IC-I. Para evaluar el tiempo de máxima producción de las surfactinas se realizaron cinéticas de 24 h con muestreo cada cuatro horas.

La figura 21 muestra los resultados obtenidos de la extracción de las surfactinas producidas por *Bacillus* 12-IC-I a las 4, 8, 12 y 16 horas, se observa que dentro de las primeras 16 h no hay una producción de Bs por parte de la cepa.

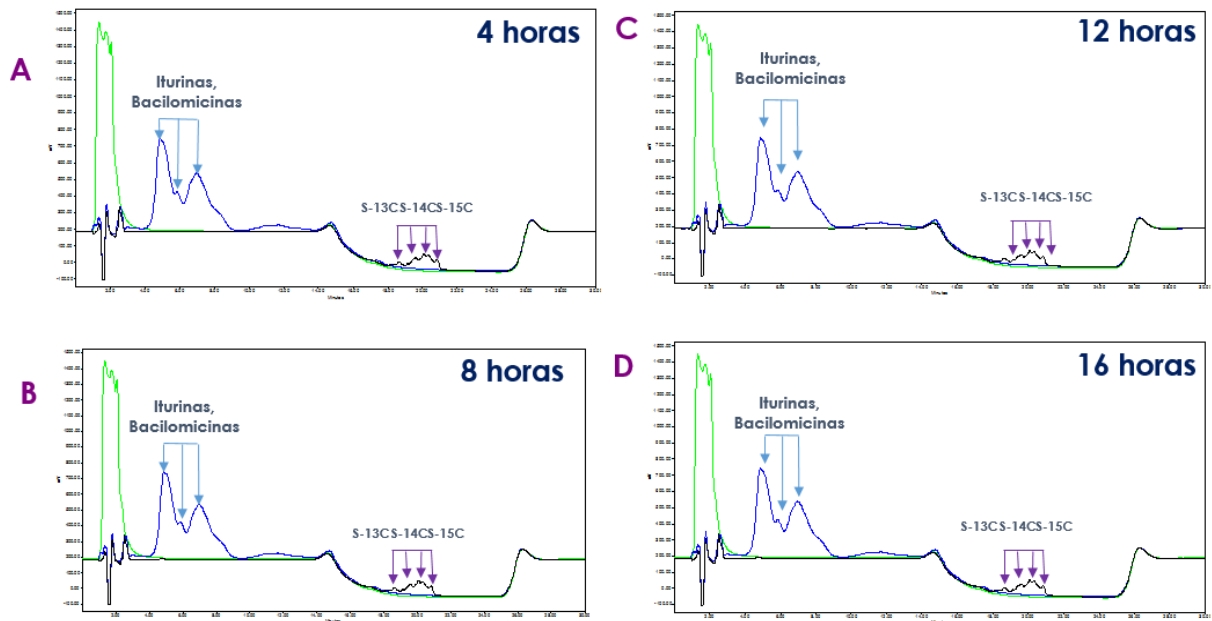


Figura 22 Perfiles de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (línea negra) producida por *B. subtilis*, iturinas SIGMA 1mg/mL (línea azul) y el extracto semi purificado (línea verde) producido por *Bacillus* 12-IC-I

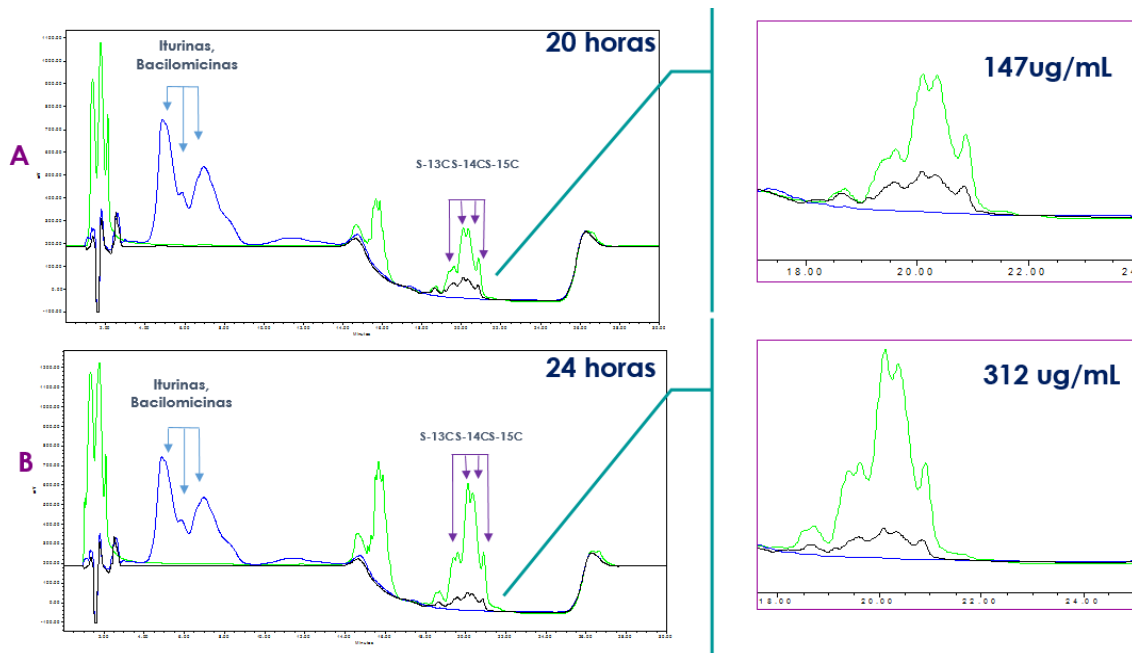


Figura 21 Perfiles de HPLC del ensamble de la surfactina SIGMA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (línea negra) producida por *B. subtilis*, iturinas SIGMA 1mg/mL (línea azul) y el extracto semi purificado (línea verde) producido por *Bacillus* 12-IC-I a las 20 y 24 h.

La figura 22 muestra el cromatograma de la muestra de surfactina producida por *Bacillus* 12-IC.I. Se pueden observar cuatro picos principales dentro del tiempo de retención de 15 a 30 min que corresponden a los tiempos donde se pueden ver a la familia de las surfactinas. La concentración de cada isómero fue mayor a la utilizada para la muestra estándar, y los tiempos de retención fueron muy similares, lo que indica la similitud en la estructura molecular del Bs producido en este trabajo por *Bacillus* 12-IC-I, con el del estándar de surfactina.

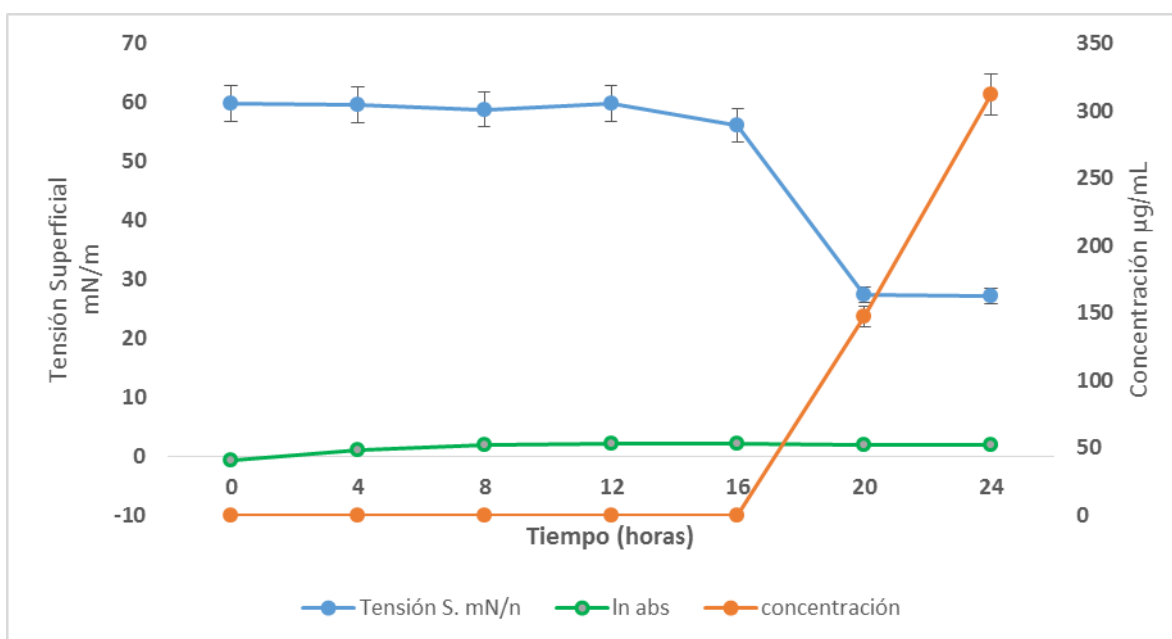


Figura 23 Evolución del crecimiento la cepa de *Bacillus*-12-IC - I. (DO) y de la producción de surfactinas. (TS, concentración de surfactina) durante 24 horas.

La cepa de *Bacillus* seleccionada se sometió a la producción de los lipopéptidos durante 24 horas y se investigó la influencia del tiempo de incubación en la síntesis de surfactina y la actividad superficial de los sobrenadantes del cultivo. El estudio cinético que se realizó durante 24 horas, permitió observar que la máxima concentración de surfactinas se da dentro del tiempo de 20 a 24 horas para la cepa de *Bacillus* 12-IC-I (Figura 23), cabe mencionar que a las 48 horas de incubación la medición de la tensión superficial mostró un valor alto lo que indica que no hay una producción del Bs.

XIII. BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR LAS CEPAS DE *Bacillus* 12-IC-I Y *Bacillus* 12-IA-III

Debido al interés de utilizar los Bs como aditivos para favorecer la biodegradación de los sustratos insolubles como los hidrocarburos del petróleo. Se realizaron experimentos de biodegradación de petróleo crudo con las cepas *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III. Los resultados se presentan a continuación.

Se llevó a cabo el ensayo de remoción de petróleo API 16-20 por las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III, las muestras se analizaron por CG y se obtuvieron los perfiles cromatográficos del control abiótico y del extracto remanente después de 30 días de incubación.

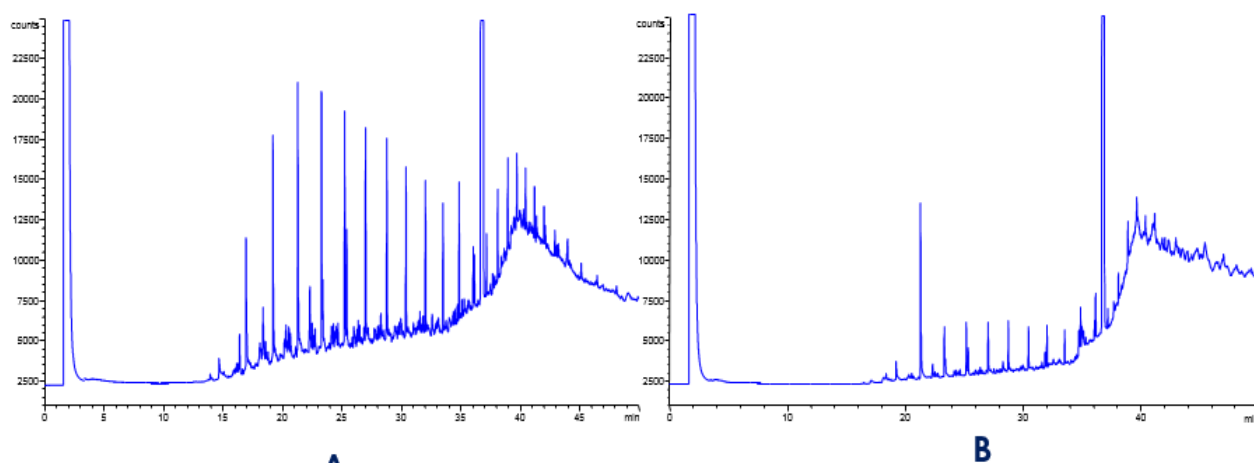


Figura 24 Biodegradación de petróleo crudo (API-16-20) utilizando la cepa de *Bacillus* 12-IC-I. 5000 ppm, 160 rpm 20 C°, en medio mínimo Czapeck A) Control abiótico y B) extracto remanente después de 30 días de incubación.

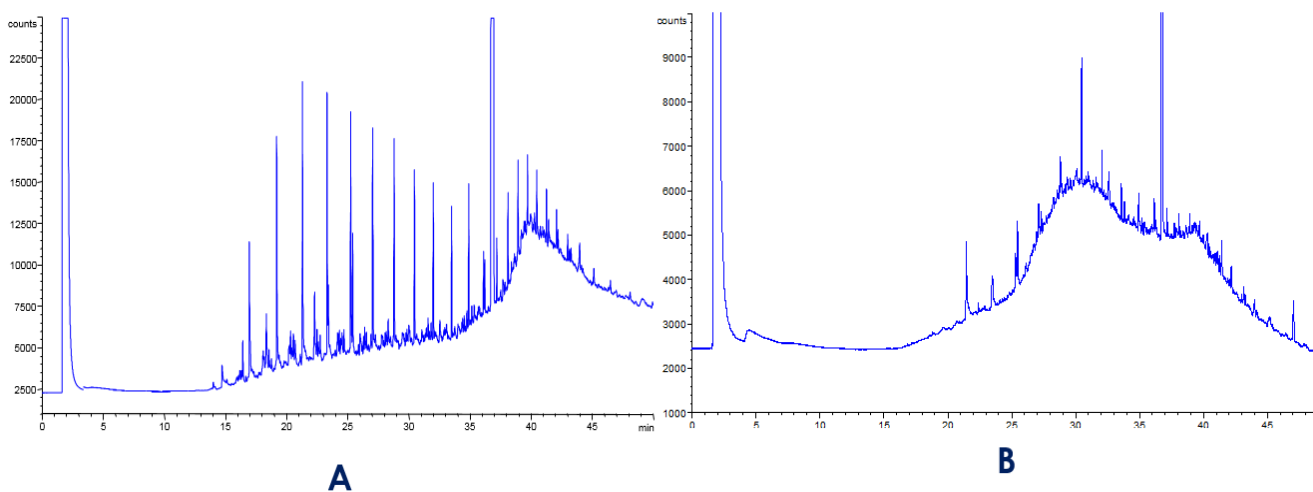


Figura 25 Biodegradación de petróleo crudo (API-16-20) utilizando la cepa de *Bacillus* 12-IA-III. 5000 ppm, 160 rpm 20 C°, en medio mínimo Czapeck A) Control abiótico y B) extracto remanente después de 30 días de incubación.

El perfil cromatográfico A (figura 24 y 25) muestra la presencia de compuestos orgánicos de elevado peso molecular que aparecen en diferentes tiempos de retención pertenecientes al petróleo API-16-20 el cual se compara con el remanente de petróleo después de 30 días de incubación de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III.

En la figura 24 se observa el fraccionamiento del petróleo API-16-20 con la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, después de los 30 días de incubación en comparación con el tiempo inicial, existe una reducción en el tamaño de los picos, el análisis gravimétrico reveló un porcentaje de degradación del petróleo del 88.2%.

El perfil cromatográfico del remanente de petróleo API-16-20 por la cepa de *Bacillus* 12-IA-III se muestra en la figura 25, se puede observar un cambio en el perfil en comparación con el control abiótico, además de una disminución en el número y tamaño de los picos, el análisis gravimétrico muestra un porcentaje de degradación del petróleo de 78.2%.

XIV. DISCUSIONES

14.1 Caracterización polifásica, pruebas microbiológicas

El estudio de microorganismos de origen marino es de gran interés debido a su capacidad de adaptarse a las condiciones que se presentan en este ambiente y producir metabolitos de interés como lo son los Bs. La caracterización microscópica y macroscópica permitió determinar algunas de sus características.

La tinción Gram es un procedimiento de gran importancia, ya que nos permite saber las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. Las bacterias de origen marino comprenden un grupo de vida complejo y diverso de vida microscópica, las cuales han desarrollado capacidades fisiológicas para asegurar su supervivencia en este tipo de sitios extremos.

De acuerdo con las prueba realizadas, los aislamientos de *Bacillus spp*, presentaron tinción de Gram positiva (Figura 9) lo cual coincide con el manual de Bergey (Bergey *et al*, 2011) para distintas especies de *Bacillus*. No obstante, al comparar la morfología microscópica y de colonia de ambas cepas, se observaron diferencias, lo cual nos indica que se trata de dos especies distintas.

14.2 Pruebas bioquímicas

Se realizó una comparación de los resultados del perfil bioquímico aportados por los test API 50 CHB para las cepas aisladas *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III de origen marino y el control de *Bacillus subtilis* de origen terrestre, las cepas marinas presentan diferencias en distintos carbohidratos del test de las galerías API 50 CHB con respecto al control, por lo que se podría tratar de una especie distinta a *B. subtilis*.

Por otro lado también se pueden observar diferencias en los resultados del consumo de los carbohidratos utilizados entre las dos cepas marinas por lo que son distintas entre sí; tratándose de dos especies diferentes, lo cual también se observó en la morfología de colonia y la morfología microscópica.

Las bacterias que habitan en el ecosistema marino se caracterizan por tener condiciones cambiantes ya que tienen un sistema metabólico complejo que les permite adaptarse a los cambios influenciados por factores como la temperatura, la salinidad, el pH y el cambio de nutrientes.

En la tabla 8 se puede observar que la cepa de *Bacillus* 12-IC-I metaboliza una menor cantidad de carbohidratos que la cepa de *Bacillus* 12-IA-III, recordemos que la zona de aislamiento de ambas cepas pertenece a la cuenca del Golfo de México, en la que se puede encontrar la presencia de petróleo. Las bacterias expuestas a hidrocarburos y sus derivados se encuentran en constante presión de selección, el hecho de que la cepa de *Bacillus* 12-IC-I consuma una menor cantidad de hidratos de carbono nos puede indicar que puede ser capaz de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono, así como también la producción de Bs para aumentar la biodisponibilidad de este tipo de compuestos.

Cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes contaminados con petróleo han mostrado capacidad de degradación de hidrocarburos, *Bacillus* (28A y 61B) desempeñaron un papel en la descomposición de los contaminantes del petróleo ya que fueron capaces disminuir el 50,4% en el peso del petróleo crudo después de 20 días de incubación. (Ijah *et al.*, 1992). En otro estudio la cepa de *Bacillus* MN6 aislada de una muestra de agua con petróleo mostró una alta eficiencia de biodegradación de los hidrocarburos con una disminución del 82% (Elumalai *et al.*, 2019). Se sabe que *Bacillus amyloliquefaciens* 6A, aislada de las aguas residuales industriales contaminadas con queroseno, fue capaz de eliminar 13, 39, 40 y 64% de queroseno, puede transformar hidrocarburos de cadena larga (C11-C34) en metabolitos pequeños (Shahzadi *et al.*, 2019).

Cepas de *Bacillus* aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos son capaces de degradarlos, los que nos indica que están utilizando estos compuestos como fuente de carbono, las pruebas bioquímicas realizadas para las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III en comparación con el *Bacillus subtilis* terrestre nos muestran que consumen en menor cantidad carbohidratos, por lo que nos señala que este comportamiento podría deberse a su capacidad de adaptarse y consumir otros compuestos como fuente de carbono para llevar a cabo las funciones de la célula.

14.3 Actividad hemolítica

Se sabe que los Bs por su carácter anfipático pueden causar la lisis de los eritrocitos, por lo que es común realizar pruebas de hemólisis para determinar su actividad Bs. La presencia de un halo de hemólisis alrededor de la cepa indica la lisis de los eritrocitos y por lo tanto, la presencia del Bs (Manaargadoo-Catin *et al.*, 2016).

El mecanismo de lisis inducido por los Bs se explica principalmente por los cambios conformacionales o asociativos de las proteínas de membrana que conducen a la formación de orificios y la posterior hemólisis. La lisis de agar sangre se ha utilizado para identificar la presencia de Bs como la surfactina y los ramnolípidos y se ha utilizado para detectar la producción de Bs de nuevos aislados (Youssef *et al.*, 2004).

Yonebayashi en el 2000 encontró una asociación entre la actividad hemolítica y la producción del Bs y recomendaron el uso de la lisis de agar sangre como método principal para detectar la actividad Bs. Sin embargo, solo el 13,5% de las deformaciones hemolíticas redujeron la tensión superficial por debajo de 40 mN /m, por lo que es necesario utilizar otras técnicas analíticas para verificar la actividad (Yonebayashi *et al.*, 2000).

En este estudio ambas cepas presentaron actividad hemolítica. En el caso de la cepa *Bacillus* 12-IA-III el tipo de hemólisis que se presenta es de tipo beta: en este caso la hemólisis es total y el halo que rodea a las colonias es totalmente transparente. En el caso de la cepa *Bacillus* 12-IC-I se presenta hemólisis de tipo alfa: es una hemólisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo de color verdoso. La penetración del Bs induce una reorganización de los lípidos y proteínas de la membrana que conducen a cambios en la forma de los eritrocitos y, a veces, en la lisis de los eritrocitos. En la literatura se proponen diferentes mecanismos que dependen de la concentración de Bs (Manaargadoo-Catin, *et al.*, 2016). Lo que puede explicar la diferencia de ambos tipos de hemolisis.

El ensayo de la actividad hemolítica nos permite contar con un resultado preliminar sobre la producción de Bs, como se observó las cepas de *Bacillus* fueron capaces de producir actividad hemolítica lo que pudo indicar la posibilidad de las producción de Bs, por las dos bacterias.

14.4 Crecimiento y producción de Bs en diferentes medios de producción

La producción de los Bs depende de la composición del medio, y como este afecte la eficiencia de su producción (Velioglu *et al.*, 2014). La composición química de los Bs es variable y depende principalmente de la cepa productora, de los sustratos que componen el medio de cultivo y las condiciones de incubación, así como las características de las fases de crecimiento bacteriano. Las propiedades fisicoquímicas de los Bs de bajo peso molecular son influenciadas por los residuos de los ácidos grasos que contienen, y estos a su vez se ven afectados por la bacteria que los produce y al mismo tiempo por las condiciones de crecimiento y los nutrientes presentes (Marta *et al.*, 2015).

Los Bs producidos por bacterias del género *Bacillus* se presentan principalmente durante la fase de crecimiento tardío durante las primeras 72 horas y en sustratos no miscibles en agua (Asfora Sarubbo *et al.*, 2006). La formulación de un medio de producción con la selección de nutrientes adecuados a niveles correctos para proporcionar un microambiente ideal propicia el crecimiento y la producción de metabolitos de interés (Mukherjee *et al.*, 2008). En el caso de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-II la producción del Bs aunado con la disminución de la Ts se llevó a cabo durante las primeras 48 h, lo cual como se mencionó anteriormente es un comportamiento que se puede visualizar para las bacterias de este género.

La producción de Bs de tipo lipopéptido se ve afectada por los componentes en el medio de crecimiento (Sun *et al.*, 2019). La producción de lipopéptidos se ve asociada a condiciones experimentales como la temperatura, pH, nutrientes y agitación (Martínez-Trujillo *et al.*, 2015).

Los resultados arrojados para las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III nos señalan; como se mencionó anteriormente que la composición del medio y los sustratos utilizados ejercen distintos efectos sobre la producción del Bs, siendo el mejor tratamiento para ambas cepas el medio marino nutritivo adicionado con queroseno como fuente de carbono, esto se ha comprobado en estudios como los realizados por Santos *et al.*, 2019 y Al-Dhabi *et al.*, 2020 los cuales mencionan que existe una mayor producción y actividad Bs en medios de cultivo nutritivos que contengan fuentes de carbono insolubles en agua.

El efecto de los medios de crecimiento y las condiciones de cultivo para la síntesis óptima de lipopéptidos es importante, analizar los efectos de diferentes condiciones de cultivo nos permitió tener información sobre el rendimiento de las cepas de *Bacillus* marinas utilizadas en este proyecto en cuanto a la producción de Bs.

14.5 Cinéticas para la producción de Bs con fuentes hidrofóbicas como fuente de carbono (queroseno, hexadecano y aceite de coco) y perfiles cromatográficos de los extractos purificados

Muchos microorganismos, especialmente bacterias, producen Bs cuando se cultivan en sustratos inmiscibles en agua, la adición de sustratos inmiscibles en agua a los medios y las limitaciones de nitrógeno y hierro en los medios dan como resultado una sobreproducción de algunos Bs (J. D. Desai & I. M. Banat, 1997).

Es por ello que se estudió el comportamiento de las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III utilizando queroseno, hexadecano y aceite de coco como fuente de carbono.

Estudios realizados en la producción de lipopéptidos han demostrado que la producción de estos está asociada con el crecimiento celular durante las primeras 72 h. (Yeh et al., 2006), (Adamu et al., 2015). Lo cual también corresponde con las cinéticas observadas para las cepas de *Bacillus* marinas de este estudio.

En cuanto al uso de queroseno como fuente de carbono, estudios realizados muestran que la fuente de carbono que ayuda a la producción más alta de surfactina es el queroseno (W.-C. Chen et al., 2015), este reporte realizado por Chen y colaboradores, corresponde a los datos obtenidos para las cepas de *Bacillus* trabajadas en este estudio, ya que la mayor producción de surfactina se obtuvo en presencia de queroseno como sustrato.

Estudios realizados por (Ghribi et al., 2011) muestran el uso de queroseno para optimizar el medio de producción de surfactina obteniendo 1700mg/L del extracto liofilizado, se puede observar que tanto la cepa de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III mostraron una producción de surfactina de 5190mg/L y 3650mg/L respectivamente del extracto liofilizado en presencia de queroseno como fuente de carbono.

Bacillus subtilis AB2.0 demostró producir un compuesto tensioactivo que se identificó como una surfactina, se identificaron cuatro isoformas diferentes las cuales estaban constituidos por ácidos grasos que variaban de C13 a C16, las surfactinas identificadas fueron capaces de reducir la tensión superficial de 70mN/m a 27mN/m (Alvarez et al., 2020), este comportamiento lo podemos observar en las dos cepas de *Bacillus* estudiadas.

Se analizó el efecto cuantitativo y cualitativo de los sustratos ricos en carbono miscibles e inmiscibles en el agua sobre la producción surfactina por *Bacillus amyloliquefaciens* ST3, en medio de sal mineral (MSM) suplementado fuentes de carbono inmisible en agua (diesel, queroseno y aceite de girasol), se produjeron cuatro análogos de surfactina utilizando los diferentes sustratos, sin embargo, las surfactinas C 13 -C 15 fueron dominantes en todos los extractos, este estudio destaca que las fuentes de carbono utilizadas influyen en el rendimiento y las variantes en la producción de surfactina (Ndlovu *et al.*, 2017).

El uso de hexadecano como fuente de carbono ha sido poco estudiada para cepas del género *Bacillus*, pero cabe destacar que otros géneros de bacterias como *Rhododoccus* en presencia de hexadecano como fuente de carbono produjo un Bs de tipo trehalosa capaz de reducir la Ts hasta 30.3 mN/m (Pirog *et al.*, 2004).

En este estudio comparando ambas cepas en relación con el uso de, se muestra una diferencia marcada tanto en el crecimiento como en la producción de Bs correlacionado con la reducción de la tensión superficial.

Podemos notar una constancia en la producción del Bs relacionada con el crecimiento lo que puede indicar que ambas cepas lo estén consumiendo como única fuente de carbono y que para aumentar la biodisponibilidad de este compuesto necesiten producir Bs, aunado a esto también se puede apreciar un decaimiento en la curva asociado al aumento de la tensión superficial.

La disponibilidad de un sustrato específico en este caso hexadecano influye en la biosíntesis del Bs en este sentido, se han propuesto que la disponibilidad de la fuente de carbono puede constituir un estimulador o inhibidor de la síntesis del compuesto (Xia *et al.*, 2012). El tipo de fuente de carbono utilizada puede influir directamente sobre la calidad y cantidad del Bs y la producción del Bs se puede ver influenciada por el cambio en la fuente de carbono permitiendo un cambio en la estructura del mismo.

Los análisis microbiológicos de un río contaminado con hidrocarburos dieron como resultado el aislamiento de 33 cepas capaces de crecer en hexadecano como fuente de carbono con una concentración inicial de 0,5 %, el 82% del hidrocarburo se degradó en la primera etapa del cultivo (50 h). Durante el crecimiento, se produjo un tensoactivo extracelular y se observó una disminución en la tensión superficial de los medios de cultivo (Espeche *et al.*, 1994).

El uso de aceites vegetales también ha sido utilizado para la producción de Bs, es posible observar que ambas cepas son capaces de crecer en el medio adicionado con aceite de coco como fuente de carbono hidrofóbica, pero la producción tomando en cuenta la disminución de la tensión superficial para ambas cepas es mínima en comparación con los resultados obtenidos en las otras fuentes de carbono probadas. Cepas de *Bacillus* (B1 - B5) aisladas de suelo de la industria del aceite de coco fueron identificadas como productoras de lipasas. El resultado indicó que la producción de lipasa variaba entre las cepas de *Bacillus* y también entre los diferentes parámetros probados. Entre los sustratos probados se descubrió que el aceite de coco a una concentración de 0,5% mejora la producción de las enzimas lipasas (Mohan *et al.*, 2008). Estudios realizados previamente para las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III muestran que tienen actividad lipasa por lo que es posible que estén utilizando este mecanismo enzimático para degradar compuestos como el aceite de coco y utilicen la energía para la producción de estas enzimas y no en la producción de Bs.

En un intento de utilizar fuentes de carbono rentables en la producción Bs, el aceite de coco se seleccionó como sustrato para estos estudios. La cepa *Pseudomonas aeruginosa* fue seleccionada como productora potencial de rhamnolipidos en presencia de este sustrato hidrofóbico (S. George *et al.*, 2013). Se estudió la producción de rhamnolipidos utilizando el aceite de coco como fuente de carbono por la bacteria *P. aeruginosa*. Esta bacteria se cultivó en medios que contenían 1% de fuente de carbono (glucosa / aceite de coco), el estudio demostró la capacidad de esa cepa de producir rhamnolipidos utilizando aceite de coco como sustrato, mostrando un IE₂₄ del 57% (Halim, 2018).

Los reportes en los que se ha utilizado el aceite de coco para la producción de Bs indican que la mejor respuesta ha sido para la producción de rhamnolipidos, lo que puede justificar que la producción de los lipopéptidos no se esté llevando a cabo y que el aceite de coco como fuente de carbono para la producción de surfactina no es favorable.

Para ambas cepas el uso de queroseno en el medio de cultivo fue favorable ya que en estas condiciones se obtuvo la mayor producción de surfactinas obteniendo 35.6 µg/mL de surfactinas producidos por la cepa de *Bacillus* 12-IC-I y 11.1 µg/mL producidos por la cepa *Bacillus* 12-IA-III.

Principalmente la producción de metabolitos de microorganismos está fuertemente influenciada por la composición de los nutrientes en su entorno. Por lo tanto, la investigación de un medio específico, con el objetivo de producir una determinada molécula ha sido de interés. Esto también se aplica a la producción de surfactina. Existen estudios sobre el medio optimizado o el empleo de fuentes de carbono innovadoras para la producción de surfactina (Willenbacher *et al.*, 2015). La adición de hidrocarburos al medio de cultivo aumenta la producción de Bs, en consecuencia, los aceites vegetales (como el aceite de oliva, el aceite de girasol, el aceite de maíz, y parafina) e hidrocarburos (como queroseno, diesel, benceno, y heptano) se han utilizado como fuentes de carbono para la producción de la surfactina.

(A. Mohammad Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008) Reportan el uso de fuentes de carbono hidrofóbicas como el hexadecano para la producción de surfactina, obteniendo 370mg/L del extracto liofilizado. La cepa de *Bacillus* 12-IC-I también presentó la producción de surfactina obteniendo 1390 mg/L del extracto liofilizado, mientras que cuantificada por métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se obtuvo una concentración de 15.2mg/L del extracto purificado. Los resultados muestran claramente que suplementar el medio con 5000 ppm de queroseno mejora la producción de surfactina en comparación con las otras fuentes de carbono utilizadas en este estudio. La producción más importante se obtuvo al usar el queroseno.

Los sustratos utilizados en este estudio como fuente de carbono tales como queroseno, hexadecano y aceite de coco fueron probados para la producción de surfactina por las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III.

Las cepas fueron capaces de usar todos estos sustratos, lo que se puede observar en las cinéticas de crecimiento, pero el uso queroseno como fuente de carbono para producir el Bs parece ser más interesante, ya que ambas cepas tuvieron una mayor producción de surfactina con este sustrato como fuente de carbono.

Entre los aceites probados como sustratos para la producción de Bs se encuentra el aceite de coco, usado principalmente para la producción de ramnolípidos, para incrementar la eficiencia de emulsificación en el queroseno. (S. George & Jayachandran, 2013). Otro estudio realizado por (Seba George *et al.*, 2012) Muestra la posibilidad de que el aceite de coco se use como un sustrato alternativo muy efectivo para la producción económica de ramnolípidos.

Debido a que el aceite de coco ha sido utilizado como fuente de carbono para la producción de agentes emulsificantes, es posible que sea una la razones por la cual la producción de surfactinas, las cuales son moléculas tensoactivas no se presente con la adición de este sustrato.

Cabe mencionar que al utilizar aceite de coco como fuente de carbono también se realizaron pruebas de IE₂₄ sin obtener resultados positivos.

Debido a sus condiciones ambientales únicas, los ambientes marinos son una buena fuente para el aislamiento de nuevos microorganismos productores de Bs. Se ha informado un número considerable de microorganismos marinos capaces de producir Bs con diferentes estructuras (Gudiña *et al.*, 2016).

Es importante señalar que la presencia de estos sustratos hidrofóbicos en el medio de cultivo puede causar que las cepas de *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus* 12-IC-I produzcan lipopéptidos distintos a la Surfactina estándar utilizada en este estudio, si recordamos en la tabla 3 se muestran las variantes de cada familia de lipopéptidos, en donde existe un cambio en el largo de la cadena del ácido graso y los aminoácidos que forman la parte hidrofílica del lipopéptido. El uso de los sustratos hidrofóbicos de este estudio para estas cepas, muestra que el producto son surfactinas, mientras que el cambio en la fuente de carbono si muestra una diferencia en la concentración obtenida del Bs.

Se caracterizó usando HPLC el extracto crudo producido por *Bacillus circulans* en medio mineral con glucosa como fuente de carbono, en el cual se reportaron seis fracciones distintas donde se observó parecido con lipopéptidos como la surfactina y la liquenisina (P. Das *et al.*, 2008).

El biotensioactivo lipopéptido producido por *B. circulans* DMS-2 en medio mineral con glucosa, se identificó como una mezcla de diferentes isoformas de fenginicina (incluyendo C₁₅ -, C₁₆ - y C₁₇) (Sivapathasekaran *et al.*, 2009).

Cepas de *Bacillus* son capaces de la producción de distintos lipopéptidos y sus isoformas, es necesario realizar un análisis más detallado que permita observar una diferencia en la estructura de éstas para las cepas de *Bacillus* 12-IC- y *Bacillus* 12-IA-II estudiadas en este proyecto.

14.6 Cinética de producción de Surfactina por la cepa de *Bacillus* 12-IC-I en queroseno como fuente de carbono

Generalmente, hay tres tipos de fuentes de carbono que se usan comúnmente en la producción de Bs: carbohidratos, aceites, grasas, e hidrocarburos. Para la producción de Bs se ha observado que la adición de compuestos hidrofóbicos como el queroseno, mejora y propicia el crecimiento y producción del Bs por parte del microorganismo productor.

La mayoría de los Bs pueden producirse utilizando los tres tipos de fuentes de carbono mencionados anteriormente. Esto podría deberse a la existencia del componente hidrofóbico en el sustrato que induce la producción de una fracción hidrofóbica del Bs (Nurfarahin, *et al.*, 2018). Según la literatura la diferencia en la concentración obtenida de las isoformas está relacionada con la cepa de *Bacillus* utilizada, y también de las condiciones nutricionales y ambientales (Sousa *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios producidos por microorganismos consisten en una amplia gama de moléculas, un grupo de metabolitos secundarios producidos por una amplia variedad de microorganismos son los Bs, los cuales se producen en la fase exponencial tardía o fase estacionaria (Roelants *et al.*, 2014).

La mayoría de los Bs se producen generalmente cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, aunque también está reportado que algunas especies pueden producirlos durante la fase exponencial de crecimiento (Ron *et al.*, 2001). La comparación del crecimiento celular y la producción de Bs por la cepa de *Bacillus* 12-IC-I, muestra que la producción de surfactina empezó temprano en la fase exponencial donde se detectó una alta concentración del Bs al final de la fase de crecimiento exponencial ($t = 24$ h), lo que indica que la producción se asoció con el crecimiento.

Debido a su estructura única, la surfactina no solo puede disminuir la tensión superficial del agua de 72 a 27 mN / m, sino que también es altamente estable térmicamente y tolerante a la sal (Zou *et al.*, 2010). Por lo tanto, tiene un gran potencial en la mejora microbiana de la recuperación de petróleo (MEOR) y su aplicación en procesos de biorremediación (Liu *et al.*, 2015).

En los últimos años, ha existido el interés en la mejora de la producción de la surfactina, los parámetros tomados en cuenta incluyen pH, temperatura, velocidad de agitación, suministro de oxígeno, composición del medio y cambios en la fuente de carbono (Wei *et al.*, 2007). Se ha reportado la producción de surfactina en el rango de 100-600 mg / L (Liu, *et al.*, 2015). Por ejemplo, se informó que *B. subtilis* BS-37 produce 585 mg / L y *B. velezensis* H3 488 mg / L.

Ha sido difícil lograr avances significativos en la producción, por lo que se propone el uso de distintas fuentes de carbono para mejorar esta. La aparición de compuestos tensioactivos puede incrementarse con la adición de hidrocarburos al medio de cultivo aumentando la producción de Bs, en consecuencia, los aceites vegetales (como el aceite de oliva, el aceite de girasol, el aceite de maíz, y parafina) e hidrocarburos (como queroseno, diésel, benceno, y heptano) se han utilizado como fuentes de carbono para la producción de la surfactina (W.-C. Chen, *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se logró producir aproximadamente 312µg/mL de las diferentes surfactinas en 24 h utilizando queroseno como fuente de carbono por la cepa de *Bacillus* 12-IC-I.

14.7 Biodegradación de hidrocarburos por las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III

La presencia de petróleo en el mar debido a numerosas fuentes naturales y antropogénicas plantea una amenaza grave y continua para los ecosistemas marinos. Aproximadamente, 1.3 millones de toneladas de petróleo ingresan al medio marino cada año, en el Golfo de México después del incidente de Deep Horizon, 600,000 toneladas fueron liberadas al mar ocasionando impactos negativos en la vida marina y costera (Antoniou *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las bacterias marinas son capaces de degradar hidrocarburos; microorganismos nativos de zonas contaminadas con petróleo y sus derivados son conocidos como hidrocarbonoclasticas obligados (OHCB), desempeñan un papel importante en la eliminación biológica de hidrocarburos de petróleo de aguas marinas contaminadas (Yakimov *et al.*, 2007). Los Bs producidos por bacterias del género *Bacillus* se han considerado candidatos prometedores para la limpieza de derrames de petróleo, ya que son más biodegradables, menos tóxicos y mejoran la biodegradación al permitir la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos (Zhu *et al.*, 2016).

Las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y *Bacillus* 12-IA-III aisladas del Golfo de México de zonas con presencia de hidrocarburos, son capaces de la degradación de petróleo pesado, se demostró la capacidad degradadora de ambas cepas ya que existen diferencias en el porcentaje de degradación, reflejadas en la disminución de los picos de los hidrocarburos mostrados en los cromatogramas.

Existen estudios que muestran la capacidad del género de *Bacillus* en la producción de lipopéptidos y en la degradación de petróleo, Gudiña y colaboradores estudiaron a cepas de *Bacillus subtilis* y comprobaron su capacidad para la biodegradación de petróleo logrando degradar los n- alcanos de cadena larga, además de la reducción de la viscosidad del aceite (Gudiña *et al.*, 2013).

Tres cepas de *Bacillus*, *B. atrophaeus* 5-2a, *B. aryabhatai* 6-2a y *B. amyloliquefaciens* 6-2c, se aislaron de muestras contaminadas con hidrocarburos, las cepas eliminaron un promedio de 82.32–94.50% de petróleo crudo (Zhang *et al.*, 2016).

La eficiencia general de degradación del petróleo crudo de la cepa *Bacillus subtilis* A1 fue de aproximadamente 87% en un periodo de tiempo de 7 días (Parthipan *et al.*, 2017).

(Fatima *et al.*, 2015) estudiaron distintos géneros bacterianos capaces de degradar hidrocarburos, entre ellos el género *Bacillus* el cual fue eficaz en el proceso de biorremediación de suelo contaminado con Diesel y altas concentraciones de sal.

La biorremediación utiliza microorganismos para degradar los contaminantes tóxicos a productos inofensivos como el CO₂ y H₂O y otros compuestos inorgánicos, estos procesos son amigables con el ambiente. Se ha informado que aproximadamente el 25% de toda la tierra contaminada con petróleo está siendo bioremediada mediante procesos de atenuación natural, lo que subraya la importancia de los microorganismos en las estrategias de remediación (Fathepure, 2014).

Las cepas de *Bacillus* marinas estudiadas en este trabajo tienen potencial para la degradación de petróleo y sus derivados, ya que como se puede observar en los perfiles cromatográficos son capaces de formar nuevos compuestos de menor peso molecular y consumir otros como única fuente de carbono logrando su total remoción.

Los Bs producidos por las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-II durante el crecimiento en sustratos hidrofóbicos identificados como surfactinas, pueden ser producidos con el fin de aumentar la solubilidad del sustrato para promover la degradación biológica.

La ventaja de usar bacterias marinas para la biorremediación es el uso directo de organismos en cualquier condición adversa sin ninguna manipulación genética (Dash *et al.*, 2013). Por lo tanto, cualquier bacteria marina que tenga el potencial de biorremediación puede convertirse en candidato para el tratamiento biológico de hábitats extremos contaminados.

XV. CONCLUSIONES

- Las cepas aisladas *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III, son capaces de crecer en medio marino nutritivo, producen hemólisis α y β respectivamente en agar sangre.
- La caracterización polifásica permitió demostrar que las cepas marinas de *Bacillus* son diferentes entre sí y con los *Bacillus* terrestres utilizados como controles.
- Los medios nutritivos adicionados con fuente de carbono hidrofóbica favorecen la producción del Bs ya que es donde se dieron los valor más altos en el % de reducción de la TS. Las cepas aisladas *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III, son capaces de crecer en medio marino nutritivo adicionado con queroseno, hexadecano, aceite de coco, mostrando actividad Bs desde las primeras 24 h.
- La cepa *Bacillus* 12-IC-I en MMN adicionado con queroseno produjo un promedio de Bs de 312 $\mu\text{g/mL}$, mientras que adicionado con hexadecano se produjo 15.2 $\mu\text{g/mL}$ de surfactina.
- La cepa *Bacillus* 12-IA-III en MMN adicionado con queroseno, se produjo un promedio de Bs de 11.1 $\mu\text{g/mL}$.
- Las cepas de *Bacillus* 12-IA-II y *Bacillus* 12-IC-I crecidas en sustratos hidrofóbicos pueden inducir la síntesis de lipopéptidos distintos a la familia de surfactinas (estándar Sigma- *Bacillus subtilis*). Los resultados obtenidos de la producción de surfactinas demuestran la producción de una familia de surfactinas pero es necesario evaluar si existen diferencias en su estructura del lipopéptido, diferencias en el tipo de aminoácidos (fracción polar) y/o en la cadena de ácidos grasos (fracción no polar).
- Con respecto las surfactinas son una familia y al menos se observan 4, no producen bacilomicinas ni iturinas por las cepas marinas a diferencia de las cepas terrestres.
- Se observa un efecto notable en la producción del Bs al utilizar las distintas fuentes de carbono hidrofóbicas para ambas cepas de *Bacillus*.

XVI. PERSPECTIVAS

- Optimizar la producción de las surfactinas utilizando diseños experimentales
- Evaluar diferencias en la estructura de los lipo-péptidos producidos por espectrometría de masas.
- Evaluar la biodegradación con las cepas de *Bacillus* 12-IA-III y *Bacillus* 12-IC-I utilizando diferentes tipos de Hcs y efecto de la concentración.
- Identificar los genes y enzimas responsables de la síntesis de las surfactinas de origen marino
- Evaluar sus aplicaciones en los procesos de desorción de hidrocarburos extracción mejorada de petróleo vía microbiana. (MEOR) y el efecto sobre la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos.

XVII. REFERENCIAS

- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2019). Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. *3 Biotech*, *9*(4), 151. doi: 10.1007/s13205-019-1683-y
- Al-Dhabi, Naif Abdullah, Esmail, Galal Ali, & Valan Arasu, Mariadhas. (2020). Enhanced Production of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* Strain Al-Dhabi-130 under Solid-State Fermentation Using Date Molasses from Saudi Arabia for Bioremediation of Crude-Oil-Contaminated Soils. *International journal of environmental research and public health*, *17*(22), 8446. doi: 10.3390/ijerph17228446
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *31*(3), 488-494. doi: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, *10*, 149-155.
- Banat, I. M., Carboué, Q., Saucedo-Castañeda, G., & de Jesús Cázares-Marinero, J. (2021). Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. *Bioresource Technology*, *320*, 124222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124222>
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(2), 427-444. doi: 10.1007/s00253-010-2589-0
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, *53*(5), 495-508.
- Ben Ayed, H., Jemil, N., Maalej, H., Bayouhd, A., Hmidet, N., & Nasri, M. (2015). Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *99*, 8-14. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.12.009
- Cameotra, S. S., & Bollag, J.-M. (2003). Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *33*(2), 111-126. doi: 10.1080/10643380390814505
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(3), 262-266. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>
- Camesano, T. A., & Nagarajan, R. (2000). Micelle formation and CMC of gemini surfactants: a thermodynamic model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *167*(1), 165-177. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(99\)00473-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00473-2)
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., & Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(2), 589-602. doi: 10.1007/s00253-018-9520-5
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two bacillus species. *Applied and environmental microbiology*, *53*(2), 224-229.
- Chen, Y., Liu, S. A., Mou, H., Ma, Y., Li, M., & Hu, X. (2017). Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. *Frontiers in microbiology*, *8*, 871-871. doi: 10.3389/fmicb.2017.00871
- Chong, H., & Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 137. doi: 10.1186/s12934-017-0753-2





- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., . . . Yang, C. (2019). Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 68. doi: 10.1186/s12934-019-1121-1
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology research international*, 2011, 941810. doi: 10.4061/2011/941810
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.015>
- De, S., Malik, S., Ghosh, A., Saha, R., & Saha, B. (2015). A review on natural surfactants. [10.1039/C5RA11101C]. *RSC Advances*, 5(81), 65757-65767. doi: 10.1039/c5ra11101c
- 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.
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., . . . Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms- From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. doi: 10.3390/microorganisms7050130
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155-166. doi: 10.5650/jos.55.155
- Gentry, T., Rensing, C., & Pepper, I. A. N. (2004). New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology - CRIT REV ENVIRON SCI TECHNOL*, 34, 447-494. doi: 10.1080/10643380490452362
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan, Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., . . . Gao, X. (2017). Bacillomycin D Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Is Involved in the Antagonistic Interaction with the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), e01075-01017. doi: 10.1128/aem.01075-17
- Hasani Zadeh, P., Moghimi, H., & Hamed, J. (2017). *Biosurfactant production by *Mocur circinelloides* on waste frying oil and possible uses in crude oil remediation* (Vol. 76).
- Inoue, S., & Ito, S. (1982). Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentations. *Biotechnology Letters*, 4(1), 3-8. doi: 10.1007/bf00139273
- Karant, N. G. K., Deo, P. G., & Veenanadig, N. K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, 77(1), 116-126.
- Könnecker, G., Regelman, J., Belanger, S., Gamon, K., & Sedlak, R. (2011). Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: Physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1445-1460. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.015>
- Ławniczak, Ł., Marecik, R., & Chrzanowski, Ł. (2013). Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2327-2339. doi: 10.1007/s00253-013-4740-1
- Lotfabad, T. B., Shourian, M., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R., Adelzadeh, M. R., & Noghabi, K. A. (2009). An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69(2), 183-193. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.018>

- Makkar, R. S., & Rockne, K. J. (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), 2280-2292. doi: <https://doi.org/10.1897/02-472>
- Maneerat, S. (2005). *Biosurfactants from marine organisms* (Vol. 27).
- Morales-Oyervides, L., Ruiz-Sánchez, J. P., Oliveira, J. C., Sousa-Gallagher, M. J., Méndez-Zavala, A., Giuffrida, D., . . . Montañez, J. (2020). Biotechnological approaches for the production of natural colorants by Talaromyces/Penicillium: A review. *Biotechnology Advances*, 43, 107601. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107601>
- Mujumdar, S., Joshi, P., & Karve, N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by Acinetobacter spp.: A review. *Journal of Basic Microbiology*, 59(3), 277-287. doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800364>
- Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 252-259. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>
- Niu, J., Liu, Q., Lv, J., & Peng, B. (2020). Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 192, 107350. doi: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107350>
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production-An Overview. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(5), 1049. doi: 10.3390/molecules23051049
- Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebuseye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., & Amund, O. O. (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by Pseudomonas sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1615-1623. doi: 10.1007/s11274-009-0053-z
- Olkowska, E., Ruman, M., & Polkowska, Z. (2014). Occurrence of surface active agents in the environment. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014, 769708-769708. doi: 10.1155/2014/769708
- Overmann, J., & Lepleux, C. (2016). Marine Bacteria and Archaea: Diversity, Adaptations, and Culturability (pp. 21-55).
- Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., & Nicolaus, B. (2017). Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms*, 5(2), 25. doi: 10.3390/microorganisms5020025
- Poursat, B. A. J., van Spanning, R. J. M., de Voogt, P., & Parsons, J. R. (2019). Implications of microbial adaptation for the assessment of environmental persistence of chemicals. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(23), 2220-2255. doi: 10.1080/10643389.2019.1607687
- Raffa, P., Broekhuis, A. A., & Picchioni, F. (2016). Polymeric surfactants for enhanced oil recovery: A review. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 145, 723-733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2016.07.007>
- Ramos-Castillo, A., García-Cruz, N., & Aguirre-Macedo, M. (2019). Metagenómica marina: un enfoque al descubrimiento de nuevos biosurfactantes para su posible aplicación ambiental (pp. 206-2026).
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 249-252. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 141-172. doi: 10.3390/ijms12010141

- Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005-1016. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8
- Santos, Elane Cristina Lourenço dos, Miranda, Daniele Alves dos Reis, Silva, Amanda Lys dos Santos, & López, Ana Maria Queijeiro. (2019). Biosurfactant Production by Bacillus strains isolated from sugar cane mill wastewaters. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401-401. doi: 10.3390/ijms17030401
- Scott, M. J., & Jones, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1508(1), 235-251. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00013-7)
- Sekhon, B. (2013). *Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects* (Vol. 1).
- Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 714-724. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.05.001>
- Sen, R. (2010). Surfactin: Biosynthesis, Genetics and Potential Applications. In R. Sen (Ed.), *Biosurfactants* (pp. 316-323). New York, NY: Springer New York.
- Stelmack, P. L., Gray, M. R., & Pickard, M. A. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 163-168. doi: 10.1128/aem.65.1.163-168.1999
- Thombre, R., Mujumdar, S., Pardeshi, S., & Bashetti, S. (2016). Industrial Applications of Biosurfactants (pp. 82-100).
- Varadavenkatesan, T., & Murty, V. R. (2013). Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel Bacillus sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 2013, 8. doi: 10.1155/2013/621519
- Vecino, X., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2017). Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 911-923. doi: 10.1080/07388551.2016.1269053
- Wang, M., Yu, H., Li, X., & Shen, Z. (2020). Single-gene regulated non-spore-forming Bacillus subtilis: Construction, transcriptome responses, and applications for producing enzymes and surfactin. *Metabolic Engineering*, 62, 235-248. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.008>
- Wang, W., Cai, B., & Shao, Z. (2014). Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium Dietzia maris As-13-3. *Front Microbiol*, 5, 711. doi: 10.3389/fmicb.2014.00711
- 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. [<https://doi.org/10.1111/jam.12287>]. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 744-755. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12287>
- Zhang, J., Gao, H., & Xue, Q. (2020). Potential applications of microbial enhanced oil recovery to heavy oil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(4), 459-474. doi: 10.1080/07388551.2020.1739618
- Zhi, Y., Wu, Q., & Xu, Y. (2017). Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in Bacillus amyloliquefaciens MT45. *Scientific reports*, 7, 40976-40976. doi: 10.1038/srep40976

XVIII. ANEXOS

Tabla 15 Galerías API 50 CHB (metabolismo de hidratos de carbono) para las cepas de *Bacillus* 12-IC-I y 12-IA-III.

Sistema API 50 CHB Tiempo 0	Sistema API 50 CHB 48h, Control <i>B. subtilis</i> .	Sistema API 50 CHB 48 h. Cepa <i>Bacillus</i> 12-IC-I	Sistema API 50 CHB 48 h. Cepa <i>Bacillus</i> 12-IA-III
			

Cada test consta de cincuenta pozos que contienen una zona anaerobia para el estudio de fermentación, y una zona aerobia para el estudio de oxidación. El primer pozo no contiene ningún sustrato y se usa como control negativo. El resto de los pozos contienen una cantidad determinada de sustrato deshidratado, pertenecientes a la familia de hidratos de carbono y sus derivados. Estos sustratos pueden ser metabolizados mediante diferentes rutas bioquímicas. Las lecturas de las galerías se realizaron a las 24 y 48 horas. Cada ensayo positivo y negativo fue anotado en la hoja de resultados, tomando como positivo un cambio de coloración a color amarillo y como negativo un cambio de coloración a color naranja o bien que se conservara el color rojo.

Tabla 16 Resultados de la identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante del sistema API 50 CHB.

Pruebas Bioquímicas		Control <i>B. subtilis</i>*	<i>Bacillus</i> 12-IC-I	<i>Bacillus</i> 12-IA-III
control	0	-	-	-
GLY	1	+	-	-
ERY	2	-	-	-
DARA	3	-	-	-
LARA	4	+	+	+
RIB	5	-	+	-
DXYL	6	-	+	+
LXYL	7	-	-	+
ADO	8	-	-	-
MDX	9	-	-	-
GAL	10	-	-	-
GLU	11	+	+	+
FRU	12	+	+	+
MNE	13	+	+	+
SBE	14	-	-	-
RHA	15	-	-	-
DUL	16	-	-	+
INO	17	+	-	+
MAN	18	-	+	+
SOR	19	+	+	-
MDM	20	-	-	-
MDG	21	-	-	+
NAG	22	-	-	+
AMY	23	-	-	-
ARB	24	+	+	+
ESC	25	+	+	+
SAL	26	+	-	+
CEL	27	+	+	+
MAL	28	+	-	+
LAC	29	-	-	-
MEL	30	-	-	+
SAC	31	+	+	+
TRE	32	+	+	-
INU	33	-	-	-
MLZ	34	-	-	-
RAF	35	-	-	+
AMD	36	+	-	-

GLYG	37	+	-	-
XLT	38	-	-	-
GEN	39	+	-	-
TUR	40	+	-	-
LYX	41	-	-	-
TAG	42	-	-	-
DFUC	43	-	-	-
LFUC	44	-	-	-
DARL	45	-	-	-
LARL	46	-	-	-
GNT	47	-	-	-
2KG	48	-	-	-
5KG	49	-	-	-

**Bacillus subtilis* proporcionado por el Dr. Leobardo Serrano Carreón, planta piloto IBT-UNAM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Directora de Tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

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

M. en C. José Raunel Tinoco Valencia (IBT-UNAM)

Dr. Brandt Bertrand (ICF-UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la capacidad tensoactiva de cepas de *Bacillus* sp. de origen marino crecidas en medios hidrofóbicos."**

Alumno que lo presenta a revisión: **Alejandra Victoria Baca Gómez**

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:2021-04-12 19:54:47 | Firmante

NXprryFOJ/BXHVQ9Py1rdbooCp9tWqDA9sBUa3yGTiKAtm8ydPh0mqzvYqweGWceJ59oFz7vPyHhNATxEXkKT2Tw8o4WyFwgUSNhiPhMMaNzrDRjkw96sASB+NF6y4m+p53CD63uk3WttWw28xFBzH5AV244s7ZaZe0FY0uC5+mr9QHeHpMJhF/trD5NKpBPSnUJLwsO1pNPhx10YclJpiKGC/UPzZ7/42amnVZdAZkHUJxNgWBpxQYgKp63TPc3zbJ12o755dvgZoX4TuSJGk4ay1JrlJvodnMkYLRCtJwHOKoe15BRTySC6je2EJ1zaRuhQjkoywGvFLa8UfrJg==

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



fJFZ29

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/muCbhJnXaEkBBrl4neXNt97ch7HWj0Di>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Directora de Tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

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

M. en C. José Raunel Tinoco Valencia (IBT-UNAM)

Dr. Brandt Bertrand (ICF-UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la capacidad tensoactiva de cepas de *Bacillus* sp. de origen marino crecidas en medios hidrofóbicos."**

Alumno que lo presenta a revisión: **Alejandra Victoria Baca Gómez**

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

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

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2021-03-29 06:57:20 | Firmante

a13BBZoFc7jSPp4ZakTitefHYJTACqIMXksDLytQNvaEnjrYIF3hMeuyKLJn9fz3FyS/wXL36JVYDolPKVXHz+DhCTpUaQy1FrX76Cpg3AQowCWwDJ6a37ha9s+I4iprxHY3RaofEL
KJgGKnh2T3TdHqvfiDCSE3Mc3NRnuxmJGMU2v+1e9XtNnrMcJXtEo1cs0Qy2WF5QciqO9sMD1POTp10Dv/EyRcCUB1H97dseH7vkNo20/biGIYXtsVLk0aXVP0daQ50RDxgyg
Cy34rxvi0C1rRQFxbKS0wm7cwQ1mujEmoDcVPlmJfVyclW47RFSExw6rLvYEudWB18qXXg==

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



[XzG4to](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IKzmbCrfD8LhJPSEbxq17cXsmitLeNgj>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Directora de Tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

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

M. en C. José Raunel Tinoco Valencia (IBT-UNAM)

Dr. Brandt Bertrand (ICF-UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la capacidad tensoactiva de cepas de *Bacillus* sp. de origen marino crecidas en medios hidrofóbicos."**

Alumno que lo presenta a revisión: **Alejandra Victoria Baca Gómez**

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:2021-04-10 22:36:06 | Firmante

BGp4wxB0ToBR/xfNHTWti2axLFce4kkYKki/z2w1y3o+b0hbK30ZWllsWSF5Jo7cBx3gEMk2BGzuSZaOVtzsrn6DQ47P+4b1gx+v1TrvC0BmN6drTGjju3QcWZqLUz5I9J0hStOpCM8m0eek98+0NqOHn13jS3zB9iew8dZnq0j+C3CnVII/X8HGZepJtroZFBd9aCldPF31PtY9NAu.JxvTHYdOKftzSfweMnsMfs9bJO4Aqr1Q2l+nRzB6YE7fSaeuMHVtwQJ9RxCO9DBD Ec6f+RlmoDvfgB7K6ynU9leXKYkVm84xXKqa2F3dG1HT+6O+h5yLjqKGX55sb93UCGw==

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



[uqfexE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gWDF1BYVZRq5Ua5ffniGX7HmA0Z27a7l>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Directora de Tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

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

M. en C. José Raunel Tinoco Valencia (IBT-UNAM)

Dr. Brandt Bertrand (ICF-UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la capacidad tensoactiva de cepas de *Bacillus* sp. de origen marino crecidas en medios hidrofóbicos."**

Alumno que lo presenta a revisión: **Alejandra Victoria Baca Gómez**

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. BRANDT BERTRAND



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

BRANDT BERTRAND | Fecha:2021-04-13 15:46:46 | Firmante

KEHFCzEqXOzr3yWd18GIK+44Zs8PXGFaV8+veYHMOAorJtodf17eNpYfmc2ODVbv4RWVcmfkacNr1a/WT20kJYkXQb20nhrlGC5FHNZUViy9DG37eHuOS3AjfuOBqt9ZU6J6pBllaEa/Q7k4NN4OjT1rlaaPCsmxf7ba8Gurl5W5k7vZrSXDkTPH11rrGkKnihbYOrFGZLUW85gtAaK0arGsc0Bz2vIPtpvJ2DsBPqCok10dTx2UC0/C1rb0s0BkUvF7sUaDN8eCEE0r9wX6gQloj/jq5YYyd4CHsWZ1khhtwIPSHH6I4AVL1ChoUdLFgv4sFutqg7TOq0Oe2zBcQ==

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



[BkVxib](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Kh98bfWiz1PZ3DFhZFrds2mKelk08tzP>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Directora de Tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

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

M. en C. José Raunel Tinoco Valencia (IBT-UNAM)

Dr. Brandt Bertrand (ICF-UNAM)

Tesis: **"Evaluación de la capacidad tensoactiva de cepas de *Bacillus* sp. de origen marino crecidas en medios hidrofóbicos."**

Alumno que lo presenta a revisión: **Alejandra Victoria Baca Gómez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

M. EN C. JOSÉ RAUNEL TINOCO VALENCIA



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

JOSE RAUNEL TINOCO VALENCIA | Fecha:2021-03-30 09:34:52 | Firmante

oN0uAb755ARJr6JBdT2PacN/PKU/3K16MG9oHN/NMqyA7M2Oz+WiAHO/+M4Kg51Z8AJHpOJaX6SMn5ftfZuyppu1VGKXhwO/xB82i8uq9Ys0k7rkxz1Hbg7Z1WUVXWN48ieEbhq4Ymota/zSyrYbP7zQC5432SN4raBPzNZh7xwRtgta0xl1g/cuAUU2aDLUj3HEw+EpCHjepkvAxQ6wanQM0KEEeFa2eLZEAmU+7u8jaoLb9eobpdDxhPbLwOJPUXw6ZNNhZ8qSKeoUxPGLnYJJwexSXXW+JfowoQ1zsHnc98rUge9gEtzhd7uZlc9QLMj6d+791ud48aM0VuMtg==

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



jO6bx4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gr3zeQURTMoXCSI8K0HTpRcSAbxxo6kb>

