



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE
BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MANEJO
DE
RECURSOS NATURALES

PRESENTA
JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR: Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano
CODIRECTOR: Dr. Arnoldo Wong Villarreal

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2023



Índice

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO 2.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1 Aspectos generales de nematodos.....	12
2.2 <i>Nacobbus aberrans</i>.....	12
2.2.1 Morfología.....	13
2.2.2 Cutícula.....	15
2.2.3 Sistema reproductivo.....	15
2.2.4 Sistema digestivo.....	16
2.2.5 Ciclo de vida.....	16
2.3 <i>Panagrellus redivivus</i>.....	17
2.4 Ácaros.....	18
2.4.1 <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	18
2.4.2 Ciclo de vida.....	19
2.4.3 Morfología.....	20
2.5 Biosurfactantes.....	21
2.5.1 Origen y clasificación.....	23
2.5.2 Propiedades.....	26
2.5.2.2 Concentración micelar critica (CMC).....	27
2.5.2.3 Tensión interfacial (TI).....	28
2.5.2.4 Tensión superficial (TS).....	28
2.5.3 Mecanismo de acción de los biosurfactantes en remediación de suelos..	29
2.5.4 Mecanismo de acción de los biosurfactantes contra larvas.....	31
2.5.5 Aplicación agrícola.....	32
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos particulares.....	32
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS.....	33
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1 Localización.....	33
5.2 Obtención de <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	33
5.3 Cultivo de <i>Panagrellus redivivus</i>	33
5.4 Obtención de <i>Nacobbus aberrans</i> (huevos y J2).....	34
5.5 Confirmación de producción de biosurfactante.....	34
5.6 Producción de biosurfactantes.....	34
5.7 Evaluación de la actividad nematicida.....	35

5.8 Evaluación de la actividad acaricida.....	36
5.9 Secuenciación del gen 16S rRNA.	37
5.10 Producción de Biosurfactante.....	37
5.11 Análisis estadístico.....	37
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	38
6.1 Resultado de actividad nematicida de los biosurfactantes contra larvas J2 de <i>Nacobbus aberrans</i>	38
6.2 Resultado de actividad acaricida de los biosurfactantes contra <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	46
6.3 Identificación molecular de cepas productoras de biosurfactantes.	49
6.4 Evidencia de presencia de biosurfactante.....	51
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	53
CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN	56
CAPÍTULO 9. LITERATURA CITADA	57
CAPÍTULO 10. ANEXO	69
10.1 Votos y Artículo	69

Índice de cuadros

Cuadro 1 Clasificación de los biosurfactantes (Raiger y López, 2009).....	24
Cuadro 2 Tratamientos establecidos en las pruebas de evaluación <i>in vitro</i>	35
Cuadro 3 Tratamientos establecidos en las pruebas de evaluación <i>in vitro</i> contra el ácaro <i>T. putrescentiae</i>	36
Cuadro 4 Análisis de varianza del efecto de nematocida de los biosurfactantes contra <i>N. aberrans</i> J2 con agua de diluyente.....	38
Cuadro 5 Mortalidad de <i>N. aberrans</i> J2 usando biosurfactantes como nematocida con agua como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$). CV: Coeficiente de Variación.....	38
Cuadro 6 Análisis de varianza del efecto de nematocida de los biosurfactantes contra <i>N. aberrans</i> J2 con $MgSO_4$ como diluyente.	40
Cuadro 7 Mortalidad de <i>N. aberrans</i> J2 usando biosurfactantes como nematocida con sulfato de magnesio como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).	40
Cuadro 8 Análisis de varianza del PROBIT a partir del efecto de nematocida de los biosurfactantes contra <i>N. aberrans</i> J2.....	42
Cuadro 9 Mortalidad de <i>N. aberrans</i> J2 usando biosurfactantes como nematocida, conforme al PROBIT. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).	42
Cuadro 10 Obtención de concentración letal 50 y 90 a partir del PROBIT.....	45
Cuadro 11 Análisis de varianza a partir del efecto acaricida de los biosurfactantes con H_2O como diluyente contra <i>T. putrescentiae</i>	46
Cuadro 12 Promedio (\pm Desviación estándar) de la mortalidad de <i>T. putrescentiae</i>	

usando biosurfactantes como acaricida con H₂O como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05). CV: Coeficiente de Variación. 46

Cuadro 13 Análisis de varianza del PROBIT a partir del efecto acaricida del biosurfactante *Bacillus* ROSS 2 con H₂O como diluyente contra *T. putrescentiae*. 48

Cuadro 14 Mortalidad de *T. putrescentiae* usando el biosurfactante *Bacillus* ROSS 2 como acaricida con H₂O como diluyente, conforme al PROBIT. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05). ... 48

Cuadro 15 Cantidad de Bs sólido obtenido en 350 mL de MSM+AUC al (2%). ... 51

Fig. 1 Ciclo de vida de <i>N. aberrans</i> , infectando raíces y tubérculos (Méndez-Santiago et al., 2021).	13
Fig. 2 Morfología del nematodo (Franco, 1981).	14
Fig. 3 Hembra en etapa adulta con huevos, dentro de una raíz infestada (Bongers y Esquivel, 2011).	15
Fig. 4 Aparato digestivo del nematodo (Franco, 1981).	16
Fig. 5 Estadios del nematodo, iniciando desde la etapa de huevo hasta llegar a adulto (Franco, 1981).	17
Fig. 6 Ácaro <i>T. putrescentiae</i> observado en 10X (A). <i>T. putrescentiae</i> adulto en medio agua agar al 5 % (B) (escala de medición =100 µm). (Abundes-Arteaga et al., 2020).	19
Fig. 7 Ciclo de vida del ácaro <i>T. putrescentiae</i> , la cual consiste desde la etapa de huevo hasta llegar a adulto, posteriormente producir huevos, para poder iniciar una población ácaros (Abundes-Arteaga et al., 2020).	20
Fig. 8 A.- Estructura general de los Bs y ubicación de la interfaz, B.- formación de una micela cuando los Bs interactúan en un ambiente acuoso (Riojas-González et al., 2010).	23
Fig. 9 Estructura química de (A) mono y dirhamnolípidos. (B) cadena abierta y forma lactónica de sofrorolípido. (C) Surfactina producida por <i>Bacillus subtilis</i> y (D) Emulsan, producido por <i>Acenobacter calcoaceticus</i> . (Oliva, 2022).	26
Fig. 10 Representación de las partes polares y no polares, las cuales son partes hidrofóbico e hidrofílico.	27
Fig. 11 Disminución de la TS, cuando el Bs alcanza la formación de micelas, reduciendo la tensión superficial.	28
Fig. 12 Interfaz de la TS en un medio liquido-aire, para así poder tener una buena	

biodisponibilidad (de Kronemberger et al., 2007).....	29
Fig. 13 Interacción de los Bs en remediación de suelo contaminados. Transferencia de masa de micela de los Bs a la célula bacteriana (Riojas-González et al., 2010).	30
Fig. 14 Efecto del Bs en la descomposición del exoesqueleto de <i>A. aegypti</i> , donde la solubilización de la quitina o un polisacárido presente, son un factor importante (Franco et al., 2017)......	31
Fig. 15 Análisis filogenéticos basados en secuencias del gen 16S rDNA de aislados con capacidad de producir biosurfactantes. Los números de acceso de las secuencias de referencia se muestran después del nombre de la especie.	50
Fig. 16 Producción de Biosurfactantes por las diferentes cepas en medio agar CTAB.....	51

Resumen

Los biosurfactantes (Bs) son moléculas tensoactivas anfipáticas de origen microbiano. Poseen diversas aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica, petrolera, agrícola y en biorremediación. Debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, son eficaces en diferentes condiciones ambientales. Se ha reportado actividad antimicrobiana, antifúngica y larvicida. Por lo cual, en el presente estudio, se evaluó *in vitro* el efecto nematicida contra la fase (J2) de *Nacobbus aberrans* y del ácaro de polvo *Tyrophagus putrescentiae* el cual provoca pérdidas económicas en un 33% a 65% en productos alimenticios de origen vegetal y animal. De igual forma el nematodo endoparásito sedentario, formador de agallas en las raíces, es uno de los diez más importante a nivel mundial debido a las pérdidas que ocasiona. Los Bs evaluados fueron obtenidos (*Bacillus*. ROSS 2, *Bacillus*. ROSS 4 y *Bacillus*. ROSS 2214). El Bs producido por la cepa de *Bacillus* ROSS2 presentó una mortalidad del 39.29% en juveniles de segundo estadio (J2) de *N. aberrans* a una concentración de 30 mg/mL, esta misma cepa presentó mayor mortalidad en *T. putrescentiae* que fue del 57.97% a la concentración de 39 mg/mL. Basado en los resultados los Bs pueden ser una alternativa para biocontrol de nematodos agallador *N. aberrans* y el ácaro *T. putrescentiae*.

Palabras clave: biosurfactantes, fitonematodos, ácaros del polvo, alternativas sustentables, agroecología.

Abstract

Biosurfactants (Bs) are amphipathic surfactant molecules of microbial origin. They have various applications in the food, pharmaceutical, oil, agricultural and bioremediation industries. Due to their biocompatibility and biodegradability properties, they are effective under different environmental conditions. Antimicrobial, antifungal and larvicidal activity has been reported. Therefore, in the present study, the nematicidal effect against phase (J2) of the phytopathogenic nematode *Nacobbus aberrans* and the dust mite *Tyrophagus putrescentiae* was evaluated *in vitro*, which causes economic losses of 33% to 65% in food products of vegetable and animal origin. In the same way, the sedentary endoparasitic nematode, which forms galls on the roots, causing great losses in agriculture. This nematode is one of the ten most important worldwide due to the losses it causes. The Bs evaluated were obtained (*Bacillus*. ROSS 2, *Bacillus*. ROSS 4 and *Bacillus*. ROSS 2214). The Bs produced by the *Bacillus* ROSS2 strain presented a mortality of 39.29% in second stage juveniles (J2) of *N. aberrans* at a concentration of 30 mg/mL, this same strain presented higher mortality in *T. putrescentiae* which was 57.97% at the concentration of 39 mg/mL. Based on the results, Bs may be an alternative for biocontrol of root-knot nematodes *N. aberrans* and the mite *T. putrescentiae*.

Keywords: Biosurfactants; Phytonematodes; Dust mites; Sustainable Alternatives; Agroecology.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.

Diferentes especies de nematodos, ácaros, ciempiés, caracoles, babosas, coleópteros y dípteros, disminuyen la producción agrícola, teniendo como resultado perdidas en la producción de alimentos (Franco et al., 1999; Sánchez-Ramos, 2000; Flores-Camacho et al., 2007).

En México el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* tiene un amplio rango de hospedantes; parasita a 84 especies de plantas cultivadas y malezas, pertenecientes a 18 familias, los principales cultivos de importancia económica afectados son: la papa (*Solanum tuberosum*), betabel (*Beta vulgaris*), chile (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Manzanilla-López et al., 2002; Gomez Valdez, 2016). De acuerdo con García et al. (2016), el nematodo *N. aberrans* es considerado como un endoparásito sedentario, ya que forma agallas en las raíces de las plantas infectadas, lo cual produce importantes pérdidas económicas en algunos países del continente americano, como es el caso de México (Caccia y Doucet, 2013).

Sin embargo, los nematodos no son la única problemática que puede causar pérdidas económicas en los cultivos, también existe otros organismos como los arácnidos que pueden afectar en almacén los alimentos de origen agrícola y animal, como el ácaro *Tyrophagus putrescentiae*. Adicionalmente en su cuerpo puede transportar esporas de hongos y bacterias patógenas (Hughes, 1976; Colloff, 2009; (Gulati, 2017). *Tyrophagus putrescentiae* es conocido por colonizar diferentes hábitats relacionados con los seres humanos y se alimentan de diversos alimentos almacenados (Erban et al., 2016).

Para controlar las poblaciones de ácaros y nematodos se utilizan plaguicidas sintéticos, los cuales tienen efectos tóxicos en los suelos, agua y en la salud pública, causando daño al sistema respiratorio al pasar de los años. Los químicos más utilizados para el control de nematodos y ácaros son: Ivermectina, Quitosán (Poli-D-glucosamina equivalente a 78.3 g de quitosán/l), fenamifos (ethyl 4-methylthio-m-tolyl isopropylphosphoramidate), Piretrinas: (Z)-(S)-2-metil-4-oxo-3(penta-2,4dienil)

ciclopent-2-enil (1R,3R)-2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropanocarboxilato. Sin embargo, los nematodos y ácaros han desarrollado resistencia a los plaguicidas y antihelmínticos, lo que ha llevado al interés en buscar nuevas alternativas sustentables que mitiguen el impacto ambiental (Tak et al., 2006; Kaya et al., 2010; García et al., 2016; Al-Assiuty et al., 2019; Velasco-Azorsa et al., 2021).

En la búsqueda de nuevas alternativas, se encuentran los metabolitos los cuales son producidos por plantas, hongos y bacterias. Los biosurfactantes (Bs), son metabolitos que se han reportado con actividad antimicrobiana, antifúngica y larvívica. Fernandes et al. (2020), reportaron que los Bs producidos por *Wickerhamomyces anomalus* poseen actividad larvívica contra *Aedes aegypti*, un mosquito con la capacidad de ser vector de enfermedades de importancia a nivel mundial y nacional, como el dengue, zika y la fiebre de chikungunya.

D'aes et al. (2010) menciona que los Bs producidos por *Pseudomonas* actúan como agentes citolíticos, provocando la destrucción de membranas de patógenos como *Phytophthora capsici* un oomiceto causante del tizón y la pudrición de la fruta de los pimientos y otros cultivos comerciales importantes.

El uso de estos compuestos ayudará a evitar la aparición de resistencia química y la contaminación de suelos (Isman, 2017). Los Bs se han caracterizado por ser compuestos con propiedades emulsificantes y dispersantes, que disminuyen la tensión superficial con la superficie o sustancia con la que entra en contacto (Yañez-Ocampo y Wong-Villareal, 2013).

CAPÍTULO 2.- REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Aspectos generales de nematodos.

Los nematodos son un grupo ubicado en el *Phylum Nematoda*, son redondos con un cuerpo alargado, cilíndrico y no segmentado, para poder crecer tienen la necesidad de mudar la cutícula en un proceso llamado *ecdísis* (Avila, 2021). Son tanto de vida libre como parásitos, se conocen 26,646 especies de nematodos, están distribuidas entre especies de vida libre (10,681); parásitos de invertebrados (3,501), de vertebrados (8,359) y de plantas (4,105) (Hugot et al., 2001). Los nematodos fitoparásitos son patógenos, que causan pérdidas anuales en los cultivos de importancia económica como son las leguminosas (Villa-Briones et al., 2008; Piedrahita et al., 2012).

2.2 *Nacobbus aberrans*.

Nematodo endoparásito sedentario, formador de agallas en las raíces provocando pérdidas del 65% en papa y el 36% en tomate y frijol (Caccia y Doucet, 2013; García et al., 2016). Este nematodo es uno de los diez más importante a nivel mundial debido a las pérdidas que ocasiona. En las raíces parasitadas genera agallas las cuales son similares a las que produce *Meloidogyne* sp. (nematodo agallador) por esta razón, *N. aberrans* es conocido como nematodo falso agallador (Marro et al., 2018). *Nacobbus aberrans* posee una alta gama de hospederos, ataca principalmente a hortalizas de importancia económica (García et al., 2016). Doucet y Lax (2005), han reportado que *N. aberrans* ha sido detectado en Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Estados Unidos, México y Perú. Su ciclo de vida consta de 4 etapas larvarias antes de llegar a la adultez, las cuales son J1, J2, J3, J4 y adulto (Figura 1).

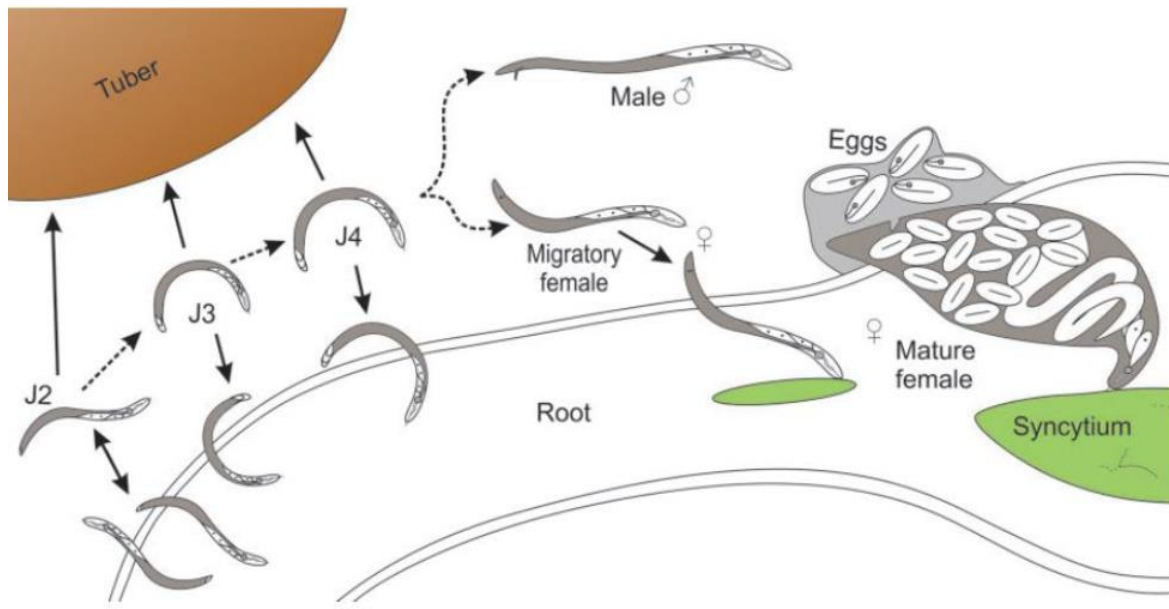


Figura 1 Ciclo de vida de *N. aberrans*, infectando raíces y tubérculos (Méndez-Santiago et al., 2021).

2.2.1 Morfología.

Los nematodos son filiformes transparentes, cubiertos de una cutícula hialina (Piedrahita et al., 2012). Con simetría bilateral y cavidad corporal primaria que va derivada del blastocele (Navone et al., 2017). Cuentan con un canal digestivo, boca, esófago, intestino, recto y ano (Figura 2). Dentro de la boca contiene un estilete el cual consiste en una estructura fuerte, tubular y móvil la cual le sirve para perforar la pared celular y absorber alimentos (Bongers y Esquivel, 2011), los cuales pasan por un tubo esofágico que contiene el bulbo medio (Franco, 1981). Los músculos de la pared del cuerpo presentan un arreglo longitudinal la cual no posee capa circular (Navone et al., 2017).

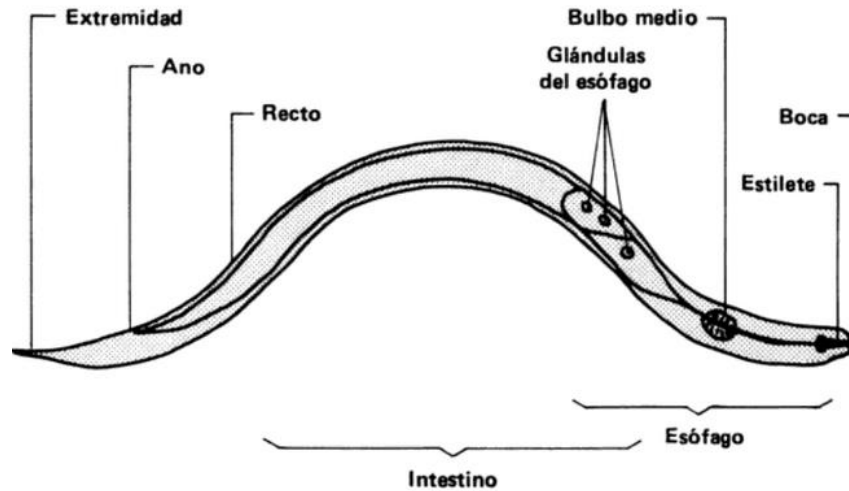


Figura 2 Morfología del nematodo (Franco, 1981).

De acuerdo con lo que describe Navone et al. (2017), la mayoría de los nematodos son dioicos presentan dimorfismo sexual, las hembras son las que generalmente son las más largas. En algunas especies cuando las hembras llegan a la etapa adulta son abultadas en forma de peras (Piedrahita et al., 2012). Esta forma la comienzan a obtener cuando la hembra encuentra el lugar adecuado para la alimentación desde la raíz de la planta, provocándole una inmovilidad (Figura 3), cuando la hembra alcanza esta etapa, pasa a la muerte convirtiéndose en un quiste duro la cual alberga y protege hasta 600 huevos; de la consistencia del cuerpo, los quistes presentan una forma esférica o globular, llegando a medir 0,5 y 1 mm de diámetro, presenta una pequeña prominencia la cual corresponde a lo que era la cabeza, ya que estaba adherida a las raíces pero se desprenden fácilmente (Franco, 1981).

Sin embargo, los machos mantienen la forma delgada y redonda para la búsqueda de las hembras inmóviles, llegando a medir más o menos un milímetro de longitud (Bongers y Esquivel, 2011).

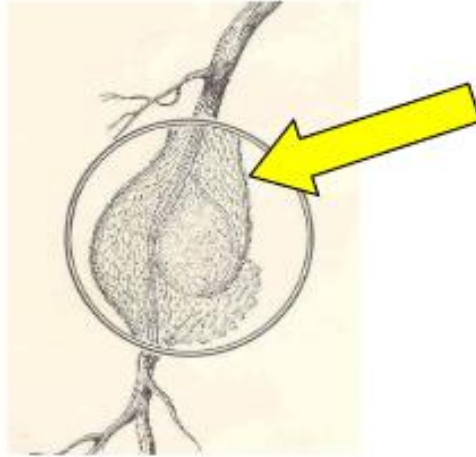


Figura 3. Hembra en etapa adulta con huevos, dentro de una raíz infestada (Bongers y Esquivel, 2011).

2.2.2 Cutícula.

Los nematodos tienen una cutícula con propiedades elásticas conformadas por diferentes capas, siendo la externa remplazada durante el proceso de muda ésta puede ser lisa o provista de incisuras longitudinales (Bongers y Esquivel, 2011). Es secretada por la hipodermis, conformada por tres capas desde afuera hacia dentro: la cortical, homogénea o matriz y fibrosa. La capa cortical se divide, a su vez, en cortical externa o interna. La externa puede presentar estriaciones, pelos, púas, papilas y poros para el intercambio con el externo. La capa homogénea o matriz según la especie, está compuesta por una capa fibrilar externa y una homogénea externa y la capa fibrosa es el estrato más interno lo cual está compuesto por tres capas: externa, media e interna (Navone et al., 2017).

2.2.3 Sistema reproductivo.

El sistema reproductivo se inicia ventralmente del recto la cual forma la cloaca, puede llegar a tener uno o dos testículos, también poseen espículas las cuales son utilizadas como estructura copulatoria. En las hembras presentan una vulva que está localizada ventralmente cerca de la mitad del cuerpo o posterior (Castro-Ortega, 2020). Los machos se pueden distinguir ya que presentan al extremo posterior curvado ventralmente y por la presencia de bolsas. Por lo tanto, la

reproducción es por partenogénesis con mitosis o meiosis (Navone et al., 2017).

2.2.4 Sistema digestivo.

De acuerdo con lo que menciona Bongers y Esquivel (2011), el esófago también se le denomina faringe la cual es muscular. La boca es circular y está rodeada por seis labios en las formas de vida libre, en tanto que en las formas *zooparásitos* puede reducirse a tres. Presenta una cavidad bucal entre la boca y el esófago, que en algunas especies pueden estar cubiertas por una gruesa pared formando por una capsulas bucal. Esta puede presentar estructuras accesorias como dientes, placas, estiletes y espinas (Figura 4) (Navone et al., 2017).

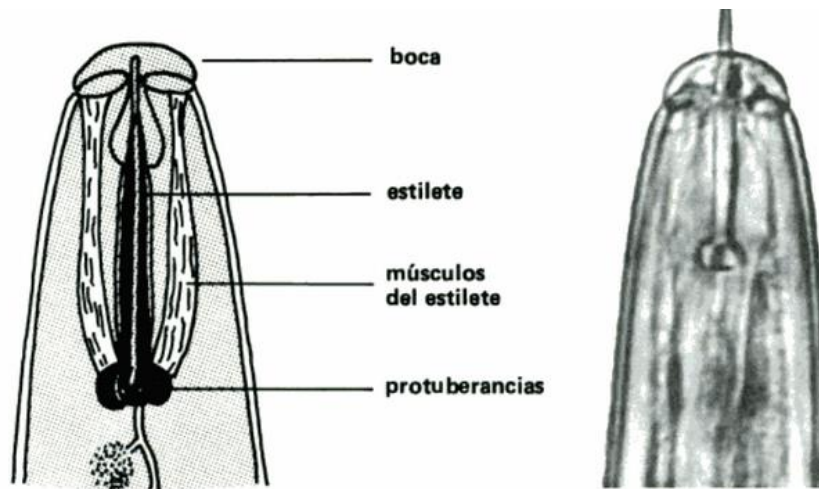


Figura 4. Aparato digestivo del nematodo (Franco, 1981).

2.2.5 Ciclo de vida.

Los nematodos pasan diferentes fases de desarrollo sin presentar cambios en el exterior. A estas fases se les llama estados juveniles las cuales sirven para distinguir de la fase adulta (Franco, 1981). Todos los nematodos pasan un proceso donde experimentan cuatro mudas durante su desarrollo (Figura 5). Sin embargo, el crecimiento entre estos estadios no siempre es muy evidentes y esta favorecido por la temperatura de 15-23°C y la nutrición (Navone et al., 2017; Hidalgo et al., 2014).

El ciclo de vida del nematodo está dividido en 5 etapas: las cuales es una fase de huevo, tres fases juveniles y una fase adulta.

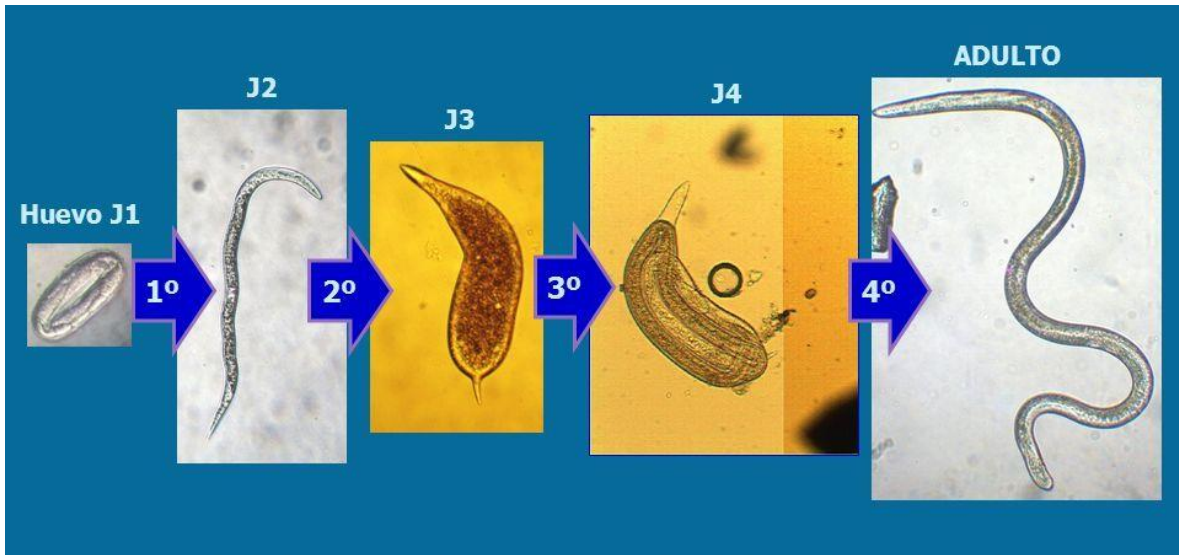


Figura 5. Estadios del nematodo, iniciando desde la etapa de huevo hasta llegar a adulto (Franco, 1981).

Un ciclo de vida, que es una generación, ocurre en una temporada la cual dura de 6 a 10 semanas. Para la reproducción, los machos abandonan las raíces en busca de una hembra para aparearse.

2.3 *Panagrellus redivivus*

Es un nematodo de vida libre, el cual posee una coloración blanca y transparente, el tamaño de este nematodo puede variar, se pueden encontrar 1.5 mm de longitud aproximadamente, su hábitat puede ser tanto terrestre como acuático (Sanabria, 2019).

Este nematodo es caracterizado por tener un ciclo de vida de 20 a 25 días, llegando a la madurez al tercer día. Sin embargo, el ciclo de vida de *P. redivivus* depende de las condiciones ambientales que se puedan presentar. Su ciclo reproductivo es corto, son ovíparos el cual libran de 10 a 40 crías cada 24 a 72 horas (Figueroa, 2009).

Para la producción de *P. redivivus* se deben tener en consideración la temperatura, la cual debe estar entre 20 a 32° C, una humedad mayor del 70%, un pH entre el 2.6 y 3.2 (Sanabria, 2019; de Lara et al., 2007). La alimentación de *P. redivivus* está basada en material orgánica en presencia del proceso de fermentación y/o de hongos y bacterias. Y para la iniciación del proceso de reproducción del nematodo es importante tener una cepa inoculada en un medio de avena (Castro et al., 2003).

2.4 Ácaros.

Los ácaros pertenecen a la subclase *Acarí* dentro de la clase *Arachnida*. Poseen un par de quelíceros, pedipalpos y cuatro pares de patas marchadoras. Dentro de la familia de los arácnidos constituyen el grupo más diverso y rico en especies, las cuales se ha demostrado que existen más de 45,000 especies (Iraola, 1998). Se divide en diferentes ordenes: *Ixodidae*, *Mesostigmata*, *Trombidiformes* y *Sarcoptiformes* (Aguilar-Marcelino et al., 2016). Abundes-Arteaga et al. 2020, reportaron diferentes tipos de ácaros, que viven en el suelo y se encuentran en diferentes tipos de alimentos y productos almacenados. De acuerdo con Pulido-Villamarí et al. 2016 el ciclo de vida de los ácaros puede durar cuatro semanas, incluyendo uno o varios estadios: huevo (eclosiona en 4 a 6 días), prelarva (3 a 6 días), larva (3 a 5 días), protoninfa (4 a 5 días), deutoninfa (6 a 10 días), tritoninfa y adulto. El desarrollo de huevo a adulto pasa por un ciclo de 2 a 3 semanas. Los huevos pueden ser depositados externamente o son mantenidos en el útero de la hembra hasta la eclosión

2.4.1 *Tyrophagus putrescentiae*.

Los daños que causa *T. putrescentiae* (Figura 6), son cuantiosos teniendo un impacto económico importante en los productos alimenticios de origen vegetal y animal, (granos y quesos), adicionalmente en su cuerpo pueden transportar esporas de hongos y bacterias patógenas (Hughes, 1976). El ciclo biológico del ácaro *T. putrescentiae* consta de varios estadios: 1) huevo, 2) larva, 3) ninfa y 4) adulto (Collof, 2009; Rachna y Manoj, 2017). Cabe mencionar que este ácaro presenta hábitos depredadores y una gran capacidad de voracidad contra nematodos de vida

libre y parásitos de importancia agropecuaria (Aguilar-Marcelino, 2012). En un estudio realizado por Abou El-Atta et al. (2016) investigaron los parámetros de desarrollo y reproducción de *T. putrescentiae* alimentándose de huevos y hembras adultas de los nematodos fitoparásitos: *Meloidogyne incognita* y *Rotylenchulus reniformis* obteniendo una importante disminución de la población de nematodos.

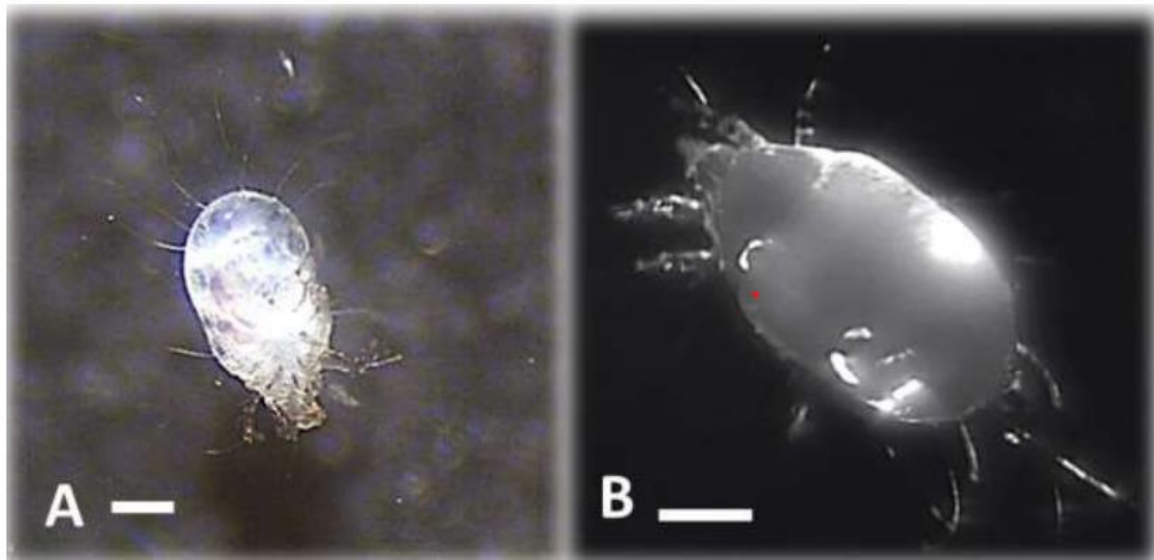


Fig. 6 Ácaro *T. putrescentiae* observado en 10X (A). *T. putrescentiae* adulto en medio agua agar al 5 % (B) (escala de medición =100 μ m). (Abundes-Arteaga et al., 2020).

Por otro lado, Canevari et al. (2012), investigaron el potencial de *T. putrescentiae* para el control biológico de *Lasioderma serricorne*, uno de los insectos más destructivos que se encuentra en el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Donde *T. putrescentiae* es utilizado para el control en las larvas de *L. serricorne* teniendo un resultando en un 54, 68 y 78% de mortalidad en presencia de este ácaro.

2.4.2 Ciclo de vida.

El ciclo biológico de *T. putrescentiae* consta de varios estadios: huevo, larva, protoninfa, tritoninfa y adulto (Figura 7). Por lo que los huevos suelen tardar de 24 a 72 h para pasar a larva, lo cual adoptan una coloración blanquecina y forma de

oviposición de 15-50 huevos por hembra por día (Abundes-Arteaga et al., 2020).

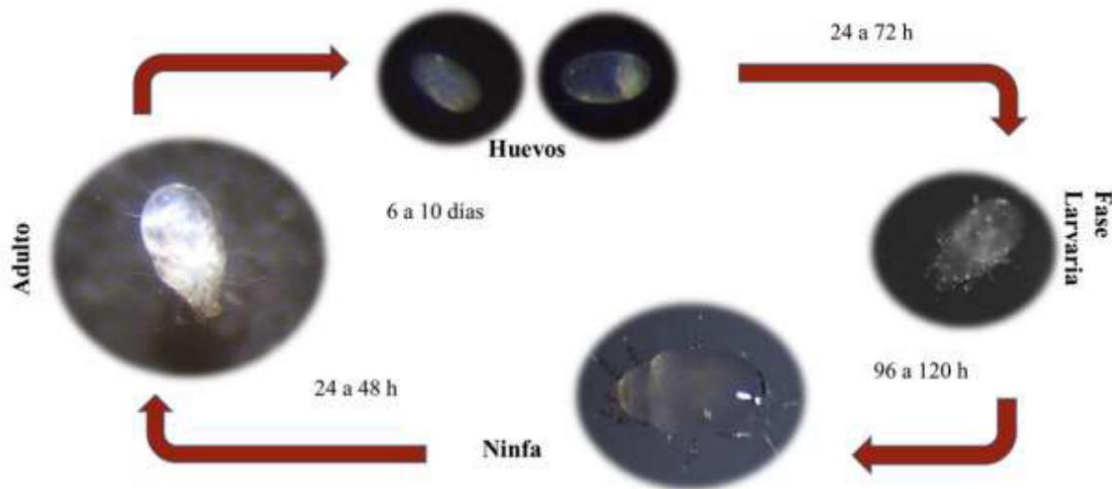


Figura 7. Ciclo de vida del ácaro *T. putrescentiae*, la cual consiste desde la etapa de huevo hasta llegar a adulto, posteriormente producir huevos, para poder iniciar una población ácaros (Abundes-Arteaga et al., 2020).

El estadio de huevo a la larva tiene un periodo de 24 a 72 h, de larva a ninfa entre 96 y 120 h, de ninfa a adulto un periodo de 24 y 48 h. (Abundes-Arteaga et al., 2020).

2.4.3 Morfología.

El macho se caracteriza por la longitud del idosoma ya que ocupa una mayor porción del sistema digestivo. Sin embargo, el macho de igual forma es identificado por tener un escudo dorsal con sedas en la parte acicular del cuerpo, presenta sedas dorsales-caudales, las cuales se observan a la mitad posterior del dorso, son más largas que las de la hembra y no son rígidas, miden 350 μm . El macho se caracteriza por ser muy parecido a la hembra y se diferencia por la ausencia de la vulva; en lugar de la vulva tiene dos pares de pequeñas ventosas (Abundes-Arteaga et al., 2020).

Las diferencias que existen en cada ciclo de vida del ácaro son la que los huevos son blanquecinos y ovalados, con unas dimensiones de $120 \pm 7 \mu\text{m}$ de largo por $66 \pm 3 \mu\text{m}$ de diámetro. Por otra parte, la fase larvaria, es la forma más joven del ácaro y se parece a un pequeño gusano blanco, con un cuerpo largo y delgado y patas cortas. Sin embargo, las ninfas son etapas intermedias en el ciclo de vida de los ácaros. A diferencia de las larvas, las ninfas tienen un cuerpo más corto y ancho, con patas más largas en proporción al tamaño del cuerpo. La fase adulta es la etapa final del ciclo de vida del ácaro. En esta etapa, el cuerpo del ácaro es de forma ovalada, con una longitud de aproximadamente 0,3-0,4 mm y un color blanquecino o marrón claro (Enkegaard et al., 1997; Sánchez-Ramos, 2000).

2.5 Biosurfactantes.

Adnan et al. (2021) define a los Biosurfactantes como una molécula tensoactiva producida por hongos, bacterias y levaduras (Becerra Gutiérrez et al., 2016). Las cuales tienen diferentes aplicaciones (Jahan et al., 2020). Esto se debe a que presentan propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, y a su eficacia para poder funcionar en diferentes condiciones ambientales (Adnan et al., 2021; Patel et al., 2021). Así como también; la diversidad de usos, en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y agrícola (de Kronemberger et al., 2007). Los Bs son un grupo de metabolitos secundarios los cuales son producidos particularmente por microorganismos de crecimiento anaerobio como bacterias, hongos filamentosos y levaduras. en medio líquidos a partir de carbohidratos, hidrocarburos y aceites (Cala et al., 2010).

Los Bs son biomoléculas anfifílicas, con porciones hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 8) (Jahan et al., 2020). La parte hidrófoba de la molécula se basa en ácidos grasos saturados o insaturados. La porción hidrófila puede ser aminoácidos catiónicos y aniónicos o mono, di y polisacáridos (Banat et al., 2000).

Entre los diversos tipos de Bs se encuentran los ramnolípidos que se han estudiado extensamente debido a su actividad y son sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* (Prieto et al., 2008). Algunas actividades en la agricultura son utilizadas

como agentes antifúngicos, insecticidas y herbicidas. Algunos otros Bs ampliamente conocidos son la surfactina producida por *Bacillus subtilis*, soforolípidos por *Candida bombicola* (Rosenberg y Ron, 1999) y emulsan por *Acinetobacter calcoaceticus* (Karanth et al., 1999). Algunas *Burkholderia* sp. han demostrado ser muy útiles en la producción de glicolípidos (Pérez et al., 2010). Wong et al. (2016) reportaron que las cepas de *B. pumilus* OCOB5 y *Rhizobium* sp. BGC8 aisladas de la rizosfera de piñón producen biosurfactantes a partir de glicerol crudo y lactosuero. Mientras que Somoza et al. (2020) reportaron la producción de biosurfactantes por *P. aeruginosa* B0406 a partir de aceite de cocina usado, el cual mantuvo su estabilidad en diferentes rangos de pH, salinidad y temperatura. El biosurfactante producido por esta cepa es un glicolípidos aniónico que incrementó la solubilidad de los pesticidas endosulfán (ED) y metil paratión (MP) en el agua, para potenciar la degradación de estos plaguicidas (García et al., 2016).

También se menciona otra aplicación de los biosurfactantes en el área agrícola, como agente de biocontrol de bacterias y hongos que afectan a los cultivos, actuando como agente citolítico, principalmente los lipopéptidos cíclicos, que provocan la destrucción de membranas de bacterias, hongos, oomicetos y virus (D'aes et al., 2010). Thrane et al. (2000) reportaron que la Viscosinamida un lipopéptido cíclico producido por *P. fluorescens*, controlan a los fitopatógenos *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* en la rizosfera de la remolacha de azúcar. Mientras Nielsen et al. (2006) reportan el efecto de los biosurfactantes ramnolípidos y saponinas para el biocontrol de *Phytophthora capsici* causante de la pudrición de raíz. Otros fitopatógenos que son controlados por biosurfactantes son *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum* y *Fusarium* (Fernandes et al., 2020).

Una de las últimas aplicaciones reportada de los biosurfactantes es la actividad en larvas de *A. aegypti*, vector causante de la transmisión de enfermedades como dengue, Zika, y Chikungunya, que es un problema de salud pública a nivel mundial (Fernandes et al., 2020). Con todos estos antecedentes se propone como objetivo evaluar biosurfactantes producidos por diferentes cepas de *Bacillus* sp, a partir de residuos agroindustriales para el biocontrol *in vitro* en el nematodo de *N. aberrans*

J2 y el ácaro *T. putrescentiae*.

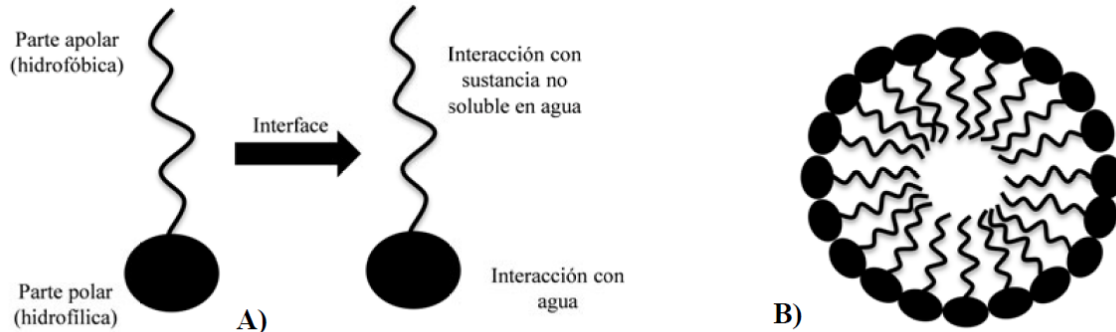


Figura 8 A. Estructura general de los Bs y ubicación de la interfaz, **B.** formación de una micela cuando los Bs interactúan en un ambiente acuoso (Riojas-González et al., 2010).

2.5.1 Origen y clasificación

La diferencia de los surfactantes sintéticos con los biosurfactantes (Bs), es que estos últimos, se clasifican principalmente por la composición química del grupo polar. Muchos de los Bs son aniónicos o neutros y la parte hidrofóbica consiste en cadenas largas de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos (Cuadro 1.). La parte hidrofílica puede contener carbohidratos, aminoácidos, grupos fosfato o péptidos cíclicos (Figura 9.), (Burgos, 2012; Raiger y López, 2009). Una de las diferencias entre los surfactantes y los Bs son la aceptación ecológica, por la potencialidad que posee en los procesos de biorremediación, biodegradación y detoxificación de los efluentes de la industria (Cala et al., 2010).

Cuadro 1 Clasificación de los biosurfactantes (Raiger y López, 2009).

Tipo de biosurfactante	Organismo que lo produce	Parte hidrofóbica	Parte hidrofílica
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomona</i> sp., <i>Serratia rubidea</i>	Ácido 3-b-Hidroxicanoico	1 o 2 moléculas de ramnosa
Trehalolípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.	Ácido C6-C6' Micólico	Trehalosa
Soforolípidos	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	Ácido 3-Hidroxiácido	Soforosa
Celobiolípidos	<i>Ustilago maydis</i>	Ácido graso	Celobiosa
Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>	Ácido graso	Polioxipropilenglicol
Diglicosil diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>	2 ácidos grasos	di-hidrato de carbono+ glicerol
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Oligosacárido+ péptido
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Lichenysin A, Lichenysin B	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hidroxiácido	Péptido cíclico
Ornitina, lisina	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>	Compuesto alifático de cadena larga	Grupos amino y grupos Ácido
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ácido graso	Grupo fosfato
Sulfonilípidos	<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	Ácido graso	Grupo sulfonilo

Ácidos grasos (ácido corinomicólico, espiculispórico, etc.)	<i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaramyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>	Ácido graso
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Complejo de proteínas y polisacáridos aniónicos de PM aprox. 1x10 ⁶ (11)
Streptofactin	<i>Streptomyces tendae</i>	Proteína hidrofóbica de alto peso molecular
Surfactantes Particulados	<i>Acinetobacter</i> sp. HO1-N. <i>Pseudomonas marginalis</i>	Vesículas extracelulares, Células bacterianas completas con alto grado de hidrofobicidad en su superficie (12)
Biosur PM	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Complejo de proteínas (50%) y polisacáridos (12 a15%) (13).

De acuerdo Anandara y Thivakaran (2010) los biosurfactantes tienen amplias ventajas en comparación con los surfactantes químicos, una de las ventajas es la biodegradabilidad, la baja toxicidad y la biocompatibilidad, la cual le permite el uso en la industria farmacéutica y alimentaria. También se producen a partir de residuos agroindustriales, tal como el aceite de cocina, que son utilizados como fuentes de carbono (Raiger y López, 2009).

El uso de los biosurfactantes ha ido en aumento en las últimas décadas principalmente en la industria del petróleo, alimentación y farmacéutica. Debido a la creciente preocupación ambiental sobre el uso de los surfactantes sintéticos por su alta toxicidad, la atención se ha dirigido a los biosurfactantes esencialmente debido a su naturaleza biodegradable, baja toxicidad y estabilidad relativamente alta (Martínez-Trujillo et al., 2015). Los biosurfactantes se pueden clasificar por su naturaleza química y los microorganismos de los que se originan.

2.5.2 Estructura química.

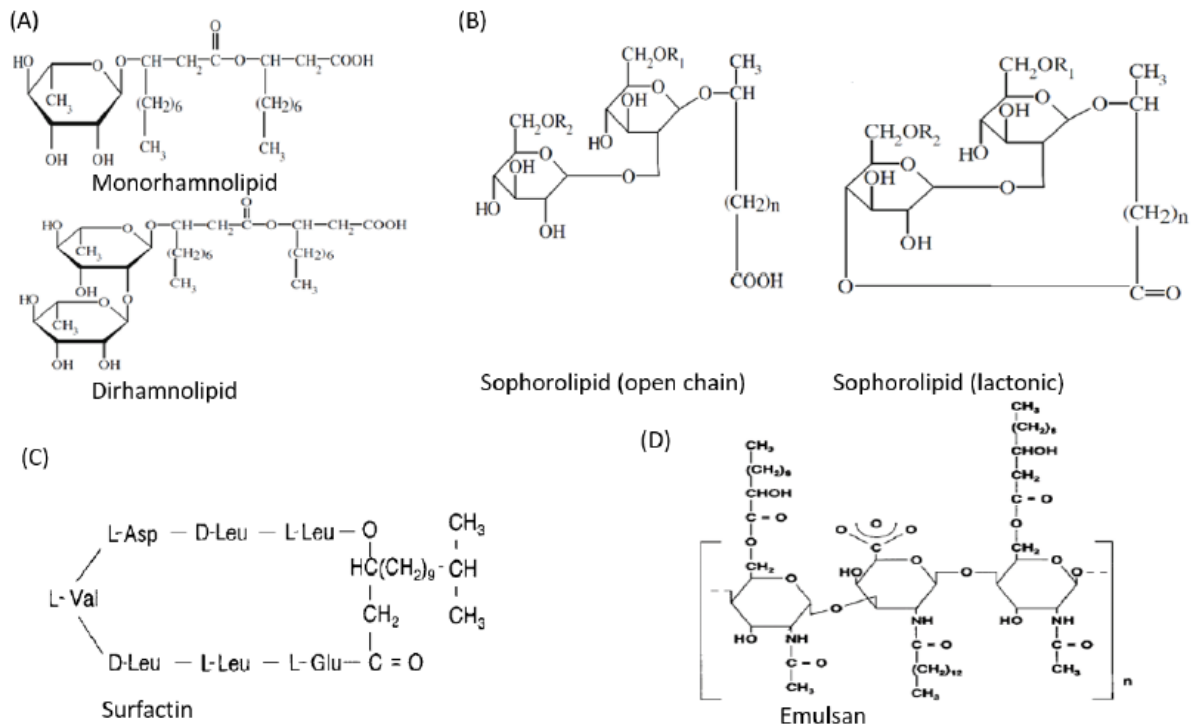


Figura 9. Estructura química de (A) mono y dirhamnolípidos. (B) cadena abierta y forma lactónica de sofrorolípidos. (C) Surfactina producida por *Bacillus subtilis* y (D) Emulsan, producido por *Acenobacter calcoaceticus*. (Oliva, 2022).

2.5.2 Propiedades

Los Bs son reconocidos por sus propiedades fisicoquímicas, como la reducción de la tensión superficial, su capacidad para formar espuma, su habilidad para emulsionar sustancias, sus bajas concentraciones micelares críticas y su capacidad para actuar como detergentes. Estas propiedades son importantes para evaluar su desempeño y seleccionar microorganismos con potencial para producir estos agentes. (Aguilar, 2013).

2.5.2.1 Propiedades anfifílicas.

Los Bs, tienen propiedades anfifílicas. Es considerado anfifílico por disponer una doble afinidad polar–no polar, en decir, cuando existe presencia en una misma molécula de dos o más grupos químicos que contienen propiedades antagónicas respecto a un mismo disolvente (Sanz, 2015) (Figura 10).

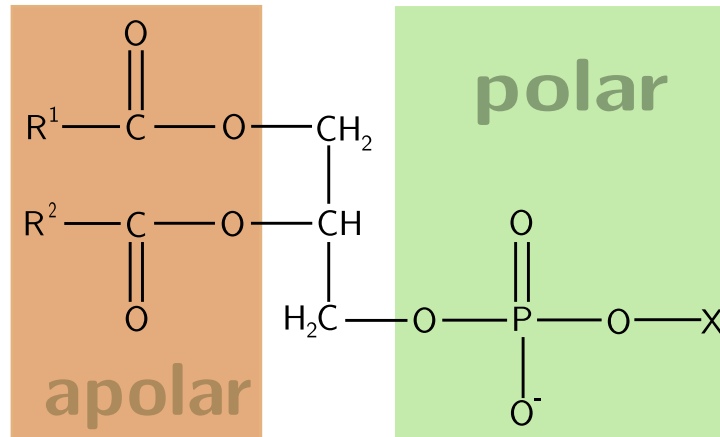


Figura 10. Representación de las partes polares y no polares, las cuales son partes hidrofóbico e hidrofílico.

2.5.2.2 Concentración micelar crítica (CMC)

Los Bs poseen un comportamiento que ayuda a la formación de emulsión esto se debe a la capacidad que tiene para reducir la tensión superficial entre dos fases distintas y en una etapa subsecuente. Un Bs eficiente puede presentar un descenso en la CMC (Figura 11).

Los Bs tienen la capacidad de formar micelas de forma espontánea por encima de una concentración crítica del Bs. La cual es conocida como CMC por arriba de esta, pueden ocurrir cambios en las propiedades fisicoquímicas de la solución. Las micelas se producen una vez que la parte hidrofóbica del Bs no tiene la capacidad para formar enlaces de hidrogeno con las moléculas de agua, lo cual produce un

aumento de la energía libre en el sistema. Cuando menor sea la CMC, más eficiente es el Bs. Esta formación de micelas mixtas entre Bs y otros compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos favorecen la dispersión del mismo medio acuoso ayudando a aumentar la biodisponibilidad y con lo siguiente una posible degradación (Salager y Fernández, 2004; Raiger y López, 2009).

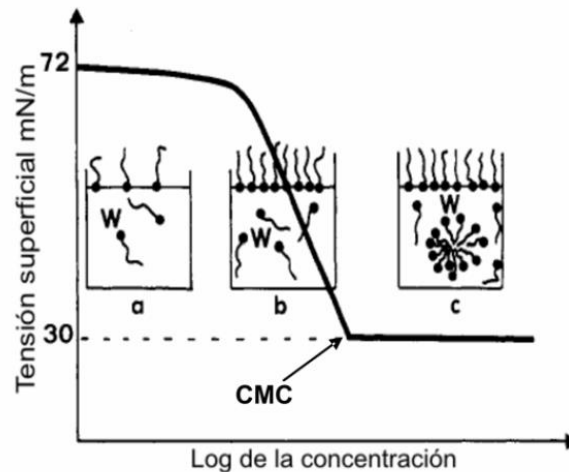


Figura 11. Disminución de la TS, cuando el Bs alcanza la formación de micelas, reduciendo la tensión superficial.

2.5.2.3 Tensión interfacial (TI).

Es la que depende de una fuerza de cohesión entre las moléculas de cada líquido y la adhesión entre las moléculas de un líquido y otro. De esta manera la TI entre dos líquidos tienen una relación con la tensión superficial de cada líquido que se encuentre saturado en el otro. Para que la TI disminuya, los Bs actúan como un puente donde forman una tercera fase de microemulsión la cual favorece a la interacción de la fase acuosa y la de un hidrocarburo (Aguilar, 2013; Becerra et al., 2016)

2.5.2.4 Tensión superficial (TS).

Está presente en la interfaz de líquido-aire, los Bs realizan un papel importante para su disminución debido a que interfieren en la formación de enlaces de hidrogeno y

de otras fuerzas que puedan estar involucradas en adhesión de moléculas. Tanto la TS, como la CMC dependen del pH, de la temperatura y de los demás solutos presentes en un medio acuoso (Figura 12) (de Kronemberger et al., 2007).

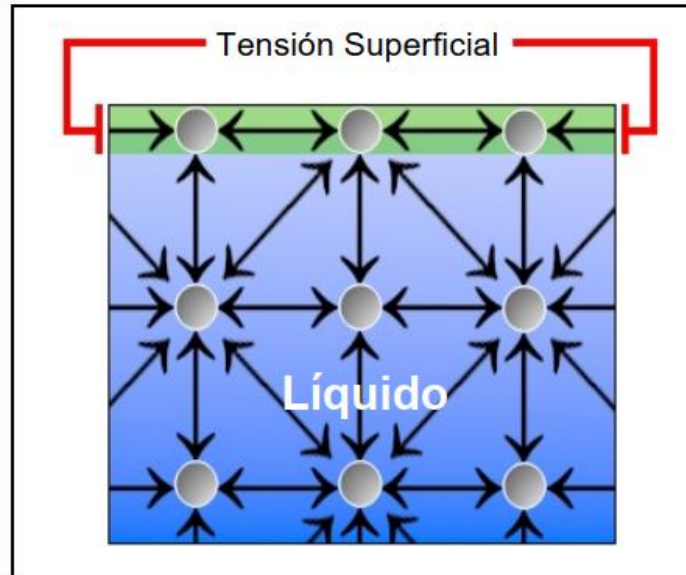


Fig. 12 Interfaz de la TS en un medio líquido-aire, para así poder tener una buena biodisponibilidad (de Kronemberger et al., 2007).

2.5.3 Mecanismo de acción de los biosurfactantes en remediación de suelos.

Los Bs contribuyen a la solubilización de compuestos hidrofóbicos, ya que en la interacción de las micelas con los plaguicidas se apropia la transferencia de las masas hacia el microorganismo (Figura 13). Lo cual, la primera fase es el transporte de la micela solubilizada con el sustrato (I de la Figura 13). Posteriormente se apropia el intercambio de las moléculas del Bs (micelas) con la célula, la cual esta etapa se puede interpretar como el proceso para la degradación (II de la Figura 13). Finalmente se lleva a cabo la transferencia del sustrato a la célula bacteriana (De la Rosa et al., 2014).

Uno de los efectos más importantes de los Bs en la interacción entre el suelo y los contaminantes es la estimulación del transporte de masa del contaminante desde el

suelo hacia la fase acuosa. Afectando la biodisponibilidad del contaminante, la cual está influenciada por la interacción del Bs y las células del suelo, las interacciones de célula y el contaminante, así como las interacciones en las áreas contaminadas. Estos procesos están asociados con tres mecanismos fundamentales: la emulsión de contaminantes, la solubilización micelar y la facilidad de transporte como es mencionado por Yu et al. (2007).

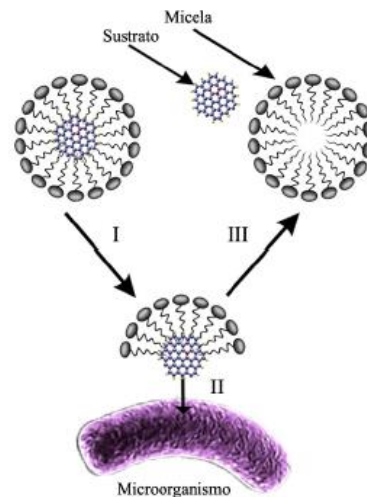


Figura 13. Interacción de los Bs en remediación de suelo contaminados. Transferencia de masa de micela de los Bs a la célula bacteriana (Riojas-González et al., 2010).

De acuerdo con De la Rosa Cruz et al. (2014), la efectividad de los Bs puede determinarse mediante varios parámetros relacionados con su capacidad para solubilizar compuestos hidrofóbicos.

La concentración micelar crítica (CMC) es una variable importante en la formación de micelas en los Bs, ya que depende de la parte hidrofóbica del compuesto. Cuando la concentración del compuesto B supera su CMC, las moléculas hidrofóbicas son incapaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que resulta en un aumento de la energía libre (Jahan et al., 2020). Además, Ayirala et al. (2020) destaca que otro parámetro fundamental es la tensión interfacial (TI) entre dos líquidos, que está relacionada con la fuerza de adhesión entre las

moléculas de ambos líquidos. La TI está influenciada por la tensión superficial de cada líquido.

2.5.4 Mecanismo de acción de los biosurfactantes contra larvas.

Existen pocos estudios enfocados en los mecanismos de acción de los Bs contra patógenos. Kim et al. (2011) resaltan el mecanismo de acción de los ramnolípidos los cuales daña la cutícula de los pulgones, conduciendo a una deshidratación de los componentes celulares de *Myzus persicae*. Por otra parte, Franco et al. (2017) mencionan que el mecanismo de acción de los Bs contra la larva de *A. aegypti*, es la descomposición del exoesqueleto donde un factor importante es la solubilización de la quitina o la estructura de un polisacárido presente (Figura 14), otro mecanismo que se le atribuye a los Bs contra *A. aegypti* es el daño que provoca sobre la cutícula de la larva, debido a la emulsificación y remoción de hidrocarburos y otros compuestos apolares presentes en la cutícula.

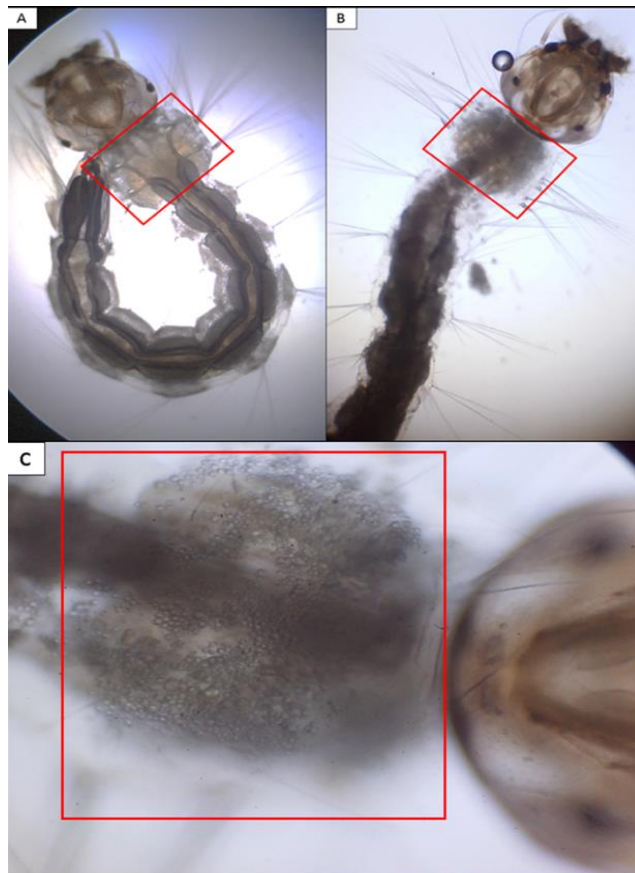


Figura 14. Efecto del Bs en la descomposición del exoesqueleto de *A. aegypti*, donde la solubilización de la quitina o un polisacárido presente, son un factor importante (Franco et al., 2017).³¹

2.5.5 Aplicación agrícola

Stanghellini y Miller (1997) hacen mención del uso de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas fluorescens*, y su eficacia contra los fitopatógenos *Phythium aphanidermatum*, *Olpidium brassicae* y *Phytophthora capsici*, demostrando una efectividad en los sistemas de recirculación en cultivos hidropónicos. Los ramnolípidos producidos por *P. aeuroginosa* poseen efecto lítico sobre las zoosporas, y actividad inhibitoria para la germinación de esporas y para el crecimiento de las hifas de patógenos (Stanghellini y Miller, 1997; Cala et al., 2010). Otro uso que se le da a los Bs es como complemento para formulaciones de herbicidas y pesticidas, ya que algunas de estas sustancias no tienen una interacción directa ante al medio en que se piensa usar, sin embargo, al usar el Bs como complemento, ayuda a tener esta homogenización deseada. Los compuestos activos son generalmente las formulaciones hidrofóbicas, la cual es necesaria para dispersar emulsionantes para soluciones acuosas.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto nematocida y acaricida de biosurfactantes producidos por diferentes cepas bacterianas a partir de aceite de soya.

3.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad nematocida de los biosurfactantes en el nematodo *Nacobbus aberrans* (huevos y J2).
2. Evaluar la actividad acaricida de los biosurfactantes en el ácaro *Tyrophagus putrescentiae*.
3. Identificar por secuencia del gen 16S ribosomal las cepas productoras de Biosurfactantes.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

Los biosurfactantes producidos por diferentes cepas bacterianas poseen actividad nematocida y acaricida *in vitro* sobre el nemátodo *Nacobbus aberrans* y el ácaro *Tyrophagus putrescentiae*.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Localización.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. Laboratorio de Helminología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del INIFAP, ubicado en Jiutepec, Morelos, México y Universidad Tecnológica de la Selva, localizada en Ocosingo, Chiapas, México.

5.2 Obtención de *Tyrophagus putrescentiae*.

Se utilizaron poblaciones del ácaro *T. putrescentiae*, cuyo pie de cría se encuentra en el Centro Nacional de Investigación Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), INIFAP. Los especímenes fueron aislados en el año 2013 en el poblado de San Juan Tlacotenco, Morelos, México. Se mantienen a una temperatura ambiente (28 ± 2 °C), adicionando nematodos *Panagrellus redivivus* (Goodey) como fuente principal de alimento, para facilitar su reproducción e incrementar sus poblaciones. Los ácaros fueron transferidos a placas Petri con agar estéril con la finalidad de obtener monocultivos a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) bajo condiciones de oscuridad (Aguilar-Marcelino et al., 2014).

5.3 Cultivo de *Panagrellus redivivus*.

Los nematodos se cultivaron en recipientes de plástico empleando hojuelas de avena comercial y agua como sustrato. Las hojuelas de avena y el agua se mezclaron y se esterilizaron en un horno de microondas por 5 min (de Lara et al.,

2007). Los recipientes se cubrieron con una tapa de aluminio con una ventana de malla de tela fina para permitir la oxigenación y evitar la entrada de insectos (Aguilar-Marcelino et al., 2014). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura ambiente ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$). Después de una semana la población de nematodos se incrementó para llevar a cabo los bioensayos. Los nematodos de *P. redivivus*, fueron proporcionados por el CENID-SAI.

5.4 Obtención de *Nacobbus aberrans* (huevos y J2).

El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum Mill*) de las raíces con agallas, se recolectaron en el Colegio de Postgraduados, Campus de Montecillo, Estado de México, México, la población se estableció a partir de una sola masa de huevos, la extracción de huevos se realizó por el método descrito por Vrain (1977) e incubados a 27°C en placas de Petri con agua destilada estéril, hasta la eclosión y la obtención de juveniles del segundo estadios (J2) según (Villar-Luna et al., 2009).

5.5 Confirmación de producción de biosurfactante.

Las cepas que estaban conservadas a -80°C fueron resembradas en caldo y en agar nutritivo durante 24 h a 28°C , ya crecidas y reactivadas fueron sembradas en agar CTAB modificado para confirmar presencia de halos traslucidos como evidencia de la producción de biosurfactantes. (Abbasi et al., 2012).

5.6 Producción de biosurfactantes.

Se inoculó un preinóculo en medio PY (peptona 0.5%, extracto de levadura 0.3%, CaCl_2 0.007 M) a 30°C durante 24 h. Para la recolección de biomasa, las muestras fueron centrifugadas a $10,000 \times g$ durante 20 min a 4°C . El crecimiento se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer (125 mL) que contenía 80 mL de medio de sal mineral. Para cada cepa, el medio mineral se suplementó con 2 % de aceite de soya y los matraces se inocularon al 1% (v/v) (Wong et al., 2016).

5.7 Evaluación de la actividad nematocida.

Se realizó una selección preliminar con 7 muestras de Bs en una concentración de 20 mg/mL, para poder determinar al Bs con mayor actividad nematocida, las cepas evaluadas fueron las siguientes: SLC G101, SLC 2, SLC 3, SLC 4, SLC 697, SLC 27853 Y SLC 2214. Seleccionando las tres cepas con mayor actividad nematocida. Se desarrollaron bioensayos con cuatro repeticiones y dos replicas con diferentes concentraciones que se presentan el Cuadro 2. En placas de ELISA de 96 pozos con fondo plano, fueron utilizadas para la evaluación nematocida que consiste en colocar los diferentes tratamientos en cada pozo con dos repeticiones por tratamiento donde se colocaron 100 nematodos por pozo y se incubaron a una temperatura de 28 °C, evaluando a las 72 h. Se colocaron dos grupos control y estuvo compuesto de agua destilada estéril y por Nematrol Plus nematocida orgánico (Méndez-Santiago et al., 2021).

El efecto nematocida del biosurfactante el porcentaje de mortalidad se calculó usando la siguiente fórmula: % de mortalidad = Nematodos muertos en el tratamiento/ Nematodos vivos en el testigo x 100 (Abbott, 1925).

Posteriormente se determinó la CL₅₀ y CL₉₀ usando un análisis de PROBIT en el entorno R®.

Cuadro 2 Tratamientos establecidos en las pruebas de evaluación *in vitro*.

Serie	Tratamiento	<i>N. aberrans</i>
1	Agua	X
2	Nematrol Plus(nematocida)	X
3	Biosurfactante al 10 mg/mL	X
4	Biosurfactante al 20 mg/mL	X
5	Biosurfactante al 30 mg/mL	X

5.8 Evaluación de la actividad acaricida.

Los tres biosurfactantes seleccionados se evaluaron a concentraciones independientes, siendo un total de 5 tratamientos (Cuadro 3). Considerando la Ivermectina® a una concentración de 5mg/mL como control positivo y el control negativo agua destilada. En placa de ELISA de 24 pozos se colocaron círculos de papel Whatman número 4 con 1.7 cm de diámetro, impregnados con 20 µL de solución de los biosurfactantes. Por pozo se depositaron 10 ácaros adultos hembras y machos. Se incubaron en cámara húmeda a 28°C. Se determinó la mortalidad a las 72 h postratamiento con bajo microscopio estereoscópico.

Para evaluar el efecto acaricida del biosurfactante el porcentaje de mortalidad se calculó usando la siguiente fórmula: % de mortalidad = $\frac{\text{Ácaros muertos en el tratamiento}}{\text{Ácaros vivos en el testigo}} \times 100$ (Abbott, 1925). En la determinación de la CL₅₀ y CL₉₀ se utilizó un análisis de PROBIT en el entorno R®.

Cuadro 3 Tratamientos establecidos en las pruebas de evaluación *in vitro* contra el ácaro *T. putrescentiae*.

Tratamiento	Concentración (mg/mL)
SLC 2	39
SLC 4	60
SLC 2214	40

5.9 Secuenciación del gen 16S rRNA.

La identificación molecular de las tres cepas productoras de Bs evaluadas se realizó mediante el ADN genómico de cada cepa bacteriana productora de Bs, se extrajo utilizando el ZR Fungal/Bacterial DNA Kit TM. El gen ribosomal 16S se amplificó utilizando los oligonucleótidos rD1 y fD1 y las condiciones descritas por Weisburg et al. (1991). Los productos de amplificación se purificaron a partir de gel utilizando el kit GeneJET (Thermo Scientific). La secuenciación se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT, UNAM).

Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con los números de acceso: 1) ROSS2 (ON740901), 2) ROSS4 (ON740900) y 3) ROSS2214 (ON740899). Las secuencias de 16S rDNA se compararon con los genes 16S rDNA de la base de datos GenBank usando BlastN. El análisis filogenético de la matriz se realizó con el modelo Kimura 2 parametros con 1000 bootstrap en el programa seaview 4.6.1 (Manolo Gouy et al., 2010).

5.10 Producción de Biosurfactante.

Para la obtención de biosurfactantes, por la técnica de precipitación ácida, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL, con aforo al 70%, según lo recomendado, por lo que, por cada cepa, se utilizaron 350 mL de medio de cultivo (medio de sales minerales + aceite usado de cocina (2%). En la cuadro 4, se describen las cantidades de biosurfactante totales obtenidas respecto al total de medio de cultivo empleado en la técnica.

5.11 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la mortalidad de los ácaros y nematodos se sometieron a una normalización utilizando la transformación de raíz cuadrada de arcoseno, estos se analizaron con un diseño completamente aleatorizado. La media se comparó mediante una prueba de Tukey, considerando un valor de significancia estadística de $\alpha=0.05$.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 Resultado de actividad nematocida de los biosurfactantes contra larvas J2 de *Nacobbus aberrans*.

El Cuadro 4, señala los datos obtenidos del ANOVA, para poder determinar si entre los datos existían diferencias, entre los tratamientos

Cuadro 4 Análisis de varianza del efecto de nematocida de los biosurfactantes contra *N. aberrans* J2 con agua de diluyente.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr(>F)
Tratamiento	20	25184	1259	15.35	>0.001
Error	126	10337	82		
Total	146	35521			

En el Cuadro 5, se aprecia el porcentaje de mortalidad de los Bs contra *N. aberrans* en tres concentraciones, más dos controles de referencia.

Cuadro 5 Mortalidad de *N. aberrans* J2 usando biosurfactantes como nematocida con agua como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$). CV: Coeficiente de Variación.

Biosurfactante	Concentración mg/mL	% Mortalidad
<i>Bacillus</i> ROSS 2	30	39.29 ±18.36 ^b CV= 46.72%
<i>Bacillus</i> ROSS 4		34.06 ±10.92 ^{bc} CV:32.06%
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		25.83 ±4.38 ^{cd} CV:16.95%
<i>Bacillus</i> ROSS 2	20	33.35 ±12.27 ^{bc} CV:36.79%
<i>Bacillus</i> ROSS 4		30.16 ±8.95 ^{bcd} CV:29.67%
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		25.43±5.46 ^{cd} CV:21.47%

Bacillus ROSS 2	10	20.08±5.71 ^{cd} CV:28.43%
Bacillus ROSS 4		16.76±8.01 ^d CV:47.79%
Bacillus ROSS 2214		16.66±11.02 ^d CV:66.14%
Agua	--	2.54±0.77 ^e CV:4.62%
Nematrol Plus	6	90.24± 6.72 ^a CV:7.44%

Para este bioensayo *in vitro* se estableció un diseño completamente aleatorizado y los resultados obtenidos fueron sometidos a un ANOVA (Cuadro 4). El análisis estadístico reveló diferencia estadística entre los tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Con base a los datos obtenidos de los bioensayos *in vitro* que se muestran en el Cuadro 5. Podemos observar que el Bs producido por *Bacillus* ROSS 2 a una concentración de 30 mg/mL obtuvo una mortalidad del 39.29%, a 20 mg/mL una mortalidad del 33.35%, a 10 mg/mL una mortalidad del 20.08%, siendo el Bs con mayor actividad nematocida, sobresaliendo entre los demás Bs. Sin embargo, *Bacillus* ROSS 4 tuvo una mortalidad del 34.06% a la concentración de 30 mg/mL, un 30.16% a 20 mg/mL y un 16.76% a 10 mg/mL, siendo el Bs con una actividad de mortalidad media, quedando por debajo de *Bacillus* ROSS 2. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 2214 tuvo una baja actividad nematocida entre los tres Bs, a una concentración de 30 mg/mL obtuvo un 25.83%, a 20 mg/mL 25.43% y a 10 mg/mL 16.66%.

Cabe mencionar que, dentro de los bioensayos, se anexaron dos tratamientos más las cuales son controles de referencia, se utilizó el agua destilada como una referencia de control negativo y un control positivo el cual fue Nematrol Plus a 6 mg/mL. En lo cual el agua como tratamiento tuvo una mortalidad del 2.54 %, siendo un porcentaje de mortalidad baja, teniendo como referencia a *Bacillus* ROSS 2214 a 10 mg/mL, el Bs con menor actividad nematocida. Sin embargo, Nematrol Plus a 6 mg/mL tuvo una mortalidad del 90.24%, siendo el tratamiento con alta actividad nematocida, siendo comparado con *Bacillus* ROSS 2 a 30 mg/mL el Bs con mayor

actividad entre los tres Bs, el cual se puede notar una diferencia significativa, basados con los análisis estadísticos.

Se realizaron evaluaciones de Bs con sulfato de magnesio, como diluyente. Para el bioensayo realizado se utilizó un diseño completamente al azar, y los resultados que se obtuvieron fueron sometidos a un análisis de ANOVA (Cuadro 6), para poder determinar las diferencias significativas con ayuda del entorno R®.

Cuadro 6 Análisis de varianza del efecto de nematicida de los biosurfactantes contra *N. aberrans* J2 con MgSO₄ como diluyente.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr(>F)
Tratamiento	10	17280	1728.0	19.89	<0.001
Error	62	5386	86.9		
Total	72	22,666			

Cuadro 7 Mortalidad de *N. aberrans* J2 usando biosurfactantes como nematicida con sulfato de magnesio como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05).

Biosurfactante	Concentración mg/mL	% Mortalidad
<i>Bacillus</i> ROSS 2		21.18 ±21.91 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 4	30	36.01±23.95 ^a
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		29.68±10.02 ^a
<i>Bacillus</i> ROSS 2		3.25±5.57 ^b
<i>Bacillus</i> ROSS 4	20	28.91±28.81 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		14.77±20.78 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 2		2.08±2.70 ^b
<i>Bacillus</i> ROSS 4	10	15.75±23.95 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		11.01±9.93 ^{ab}
MgSO ₄	10mM	4.16±3.93 ^c
Nematrol Plus	6	90.24± 6.16 ^a

De acuerdo con el Cuadro 7, el Bs que presentó mayor mortalidad, fue la diluida con $MgSO_4$, fue *Bacillus* ROSS4 con mortalidad del 36.01% a la concentración de 30 mg/mL, con 28%.91 a 20 mg/mL y un 15.75% a 10 mg/mL, siendo el Bs con mayor actividad nematicida. Teniendo una similitud con los resultados presentados en el Cuadro 5. Mientras *Bacillus* ROSS 2214 tuvo el 29.68% de mortalidad a una concentración de 30 mg/mL, un 14.77% a 20 mg/mL y 11.01% a la concentración de 10 mg/mL con $MgSO_4$ como diluyente, teniendo una similitud con agua como diluyente como se presenta en el Cuadro 7. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 2 tuvo una mortalidad del 21.18% a 30 mg/mL, a 20 mg/mL una mortalidad del 3.25% y a 10 mg/mL una mortalidad del 2.08%, siendo el Bs con baja mortalidad, esto es cuando los Bs fueron diluidos en $MgSO_4$

Los datos que se presentan en los Cuadros fueron obtenidos de un diseño completamente al azar, en la cual se sometieron a un análisis de ANOVA, con la ayuda del entorno R®, la cual esta presentada en los Cuadros 8 y 9. Los análisis estadísticos determinaron las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Cuadro 8 Análisis de varianza del PROBIT a partir del efecto de nematicida de los biosurfactantes contra *N. aberrans* J2.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr(>F)
Tratamiento	16	25581	1473.8	54.17	>0.001
Error	49	1333	27.2		
Total	65	26914			

Cuadro 9 Mortalidad de *N. aberrans* J2 usando biosurfactantes como nematicida, conforme al PROBIT. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05).

Biosurfactante	Concentración mg/mL	% Mortalidad
<i>Bacillus</i> ROSS 2	7.5	7.27± 3.59 ^{ij}
<i>Bacillus</i> ROSS 4		9.41± 1.88 ^{hij}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		12.98± 3.56 ^{ghi}
<i>Bacillus</i> ROSS 2	15	26.22± 18.59 ^{fgh}
<i>Bacillus</i> ROSS 4		24.16 ± 5.77 ^{efg}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		19.50 ± 15.80 ^{ghij}
<i>Bacillus</i> ROSS 2	30	44.49 ± 4.13 ^{cd}
<i>Bacillus</i> ROSS 4		38.05 ± 4.01 ^{de}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		29.62± 4.06 ^{def}
<i>Bacillus</i> ROSS 2	60	75.98± 8.78 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 4		76.38 ± 9.50 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		75.70± 23.96 ^a
<i>Bacillus</i> ROSS 2	120	64.22± 4.57 ^{bc}
<i>Bacillus</i> ROSS 4		40.78± 8.13 ^{de}
<i>Bacillus</i> ROSS 2214		78.84± 5.62 ^{ab}
Agua	---	2.54 ±2.87 ^j
Nematrol Plus	6	90.24 ± 6. 16 ^a

Con base a los resultados obtenidos anteriormente las cuales estan plasmados en los Cuadros 5 y 7, se determinó que los Bs tuvieron mayor actividad con el agua como diluyente, a lo cual se procedió a realizar un PROBIT para poder determinar la CL₅₀ y CL₉₀ de cada tratamiento evaluado.

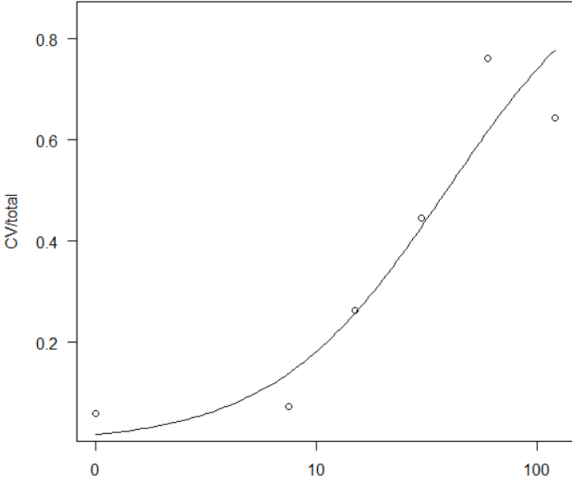
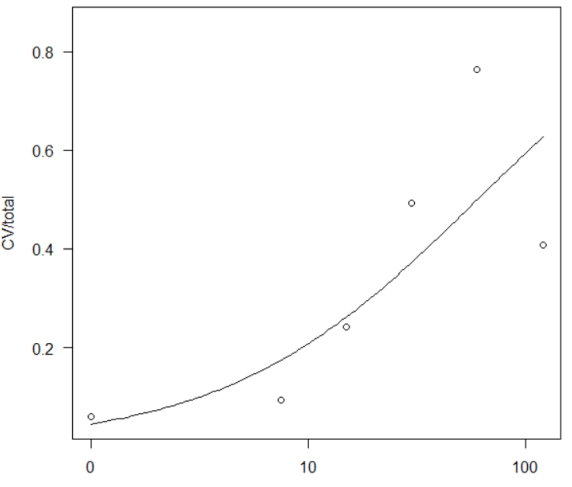
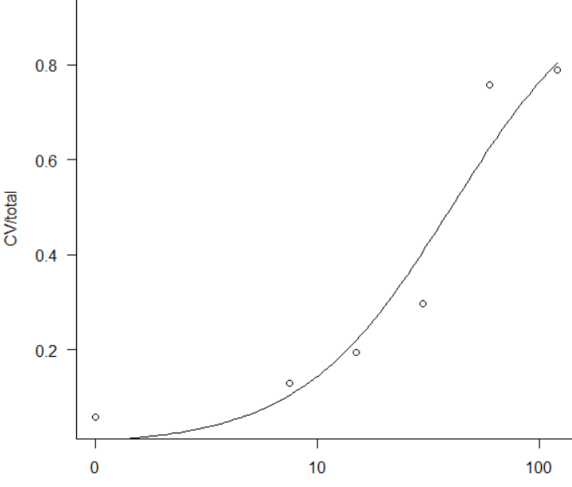
Conforme a los datos del Cuadro 9, se puede ver una similitud de los resultados entre las concentraciones 10, 20 y 30 mg/mL con los datos que se pueden observar en el Cuadro 5. Sin embargo, a partir de las concentraciones 60 y 120 mg/mL cambia el panorama a una decendencia entre los Bs *Bacillus* ROSS 2 Y *Bacillus* ROSS 4 en la concentración 120 mg/mL. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 2214, a partir de la concentración 30 a 60 mg/mL hay un incremento exponencial, de 29.62% a 30 mg/mL a un 75.70% a 60 mg/mL, a lo cual se mantiene a una similitud entre los otros Bs. De tener bajos porcentajes de mortalidad entra ahora se mantiene a la par con *Bacillus* ROSS 2 y *Bacillus* ROSS 4.

Es importante destacar que *Bacillus* ROSS 2214 a una concentración de 120 mg/mL mostró un aumento significativo en la mortalidad de *N. aberrans*, alcanzando un 78.84% de mortalidad. Esto contrasta con los resultados obtenidos con *Bacillus* ROSS 2 y *Bacillus* ROSS 4, ya que en lugar de aumentar la mortalidad de *N. aberrans*, mostraron una disminución en su efectividad. Por ejemplo, *Bacillus* ROSS 2 a una concentración de 60 mg/mL obtuvo una mortalidad de 75.98%, pero a una concentración de 120 mg/mL mostró una ligera disminución a 64.22% de mortalidad. Por otro lado, *Bacillus* ROSS 4 obtuvo una mortalidad de 76.98% a una concentración de 60 mg/mL, pero a una concentración de 120 mg/mL presentó una mortalidad de 40.78%, mostrando una diferencia con *Bacillus* ROSS 2 y *Bacillus* ROSS 2214.

Con todos estos resultados obtenidos se procedió a determinar las CL₅₀ Y CL₉₀, de cada Bs, las cuales se pueden observar en el Cuadro 10. Donde con *Bacillus* ROSS 2 para obtener la CL₅₀, se necesita una concentración de 38.92 mg/mL y la CL₉₀ una concentración de 282.13 mg/mL. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 4 para la CL₅₀: pretende necesitar una concentración de 60.04 mg/mL y para CL₉₀: una

concentración de 1134.74 mg/mL. Para el caso de *Bacillus* ROSS 2214 para la CL₅₀: 40.16 mg/mL y para CL₉₀: 222.58 mg/mL. Para llegar a estos datos estadísticos, se utilizó el entorno R®.

Cuadro 10 Obtención de concentración letal 50 y 90 a partir del PROBIT.

Biosurfactante	CL 50 Y 90	Grafica
ROSS 2	CL ₅₀ : 38.92 mg/mL CL ₉₀ : 282.13 mg/mL	
ROSS 4	CL ₅₀ : 60.04 mg/mL CL ₉₀ : 1134.74 mg/mL	
ROSS 2214	CL ₅₀ : 40.16 mg/mL CL ₉₀ : 222.58 mg/mL	

6.2 Resultado de actividad acaricida de los biosurfactantes contra *Tyrophagus putrescentiae*.

Cuadro 11 Análisis de varianza a partir del efecto acaricida de los biosurfactantes con H₂O como diluyente contra *T. putrescentiae*.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr(>F)
Tratamiento	4	5169	1292.4	7.66	<0.01
Error	15	2530	168.7		
Total	19	7699			

Cuadro 12 Promedio (\pm Desviación estándar) de la mortalidad de *T. putrescentiae* usando biosurfactantes como acaricida con H₂O como diluyente. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05). CV: Coeficiente de Variación.

Biosurfactante	Concentración mg/mL	Promedio + DS
<i>Bacillus</i> ROSS 2	39	57.95 ^b \pm 7.25 CV: 12.551%
<i>Bacillus</i> ROSS 4	60	33.25 ^{bc} \pm 23.50 CV: 70.67%
<i>Bacillus</i> ROSS 2214	40	16.60 ^{bc} \pm 16.16 CV: 97.34
Agua	----	2.20 ^d \pm 4.40 CV: 200%
Ivermectina	5	95 ^a \pm 10 CV: 10.52%

En el Cuadro 12, se presenta los resultados de los bioensayos *in vitro* de los Bs contra el ácaro del polvo *T. putrescentiae*. Los datos obtenidos, fueron analizados por un ANOVA, donde se pudo determinar las diferencias significativas entre los tratamientos.

Las concentraciones seleccionadas para estos bioensayos, se basó en los resultados obtenidos de las CL₅₀ de los bioensayos *in vitro* de *N. aberrans*. Cada Bs se le dio una concentración independiente conforme a la CL₅₀, de cada uno. Dentro de estos resultados se puede observar, que el Bs producido por *Bacillus* ROSS 2 a la concentración de 39 mg/mL, obtuvo una mortalidad de 57.95%. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 4 a la concentración de 60 mg/mL presentó una mortalidad de 33.25%. un porcentaje de mortalidad bajo referente a *Bacillus* ROSS 2, una clara diferencia entre mortalidad y concentración. Por otra parte, *Bacillus* ROSS 2214 a 40 mg/mL demostró una mortalidad de 16.60%. Una mortalidad baja, a comparación de los demás Bs, tomando como punto de referencia *Bacillus* ROSS 2 a la concentración de 39 mg/mL.

Para este bioensayo se determinó utilizar agua como control negativo e Ivermectina como un control positivo. El agua presentó un porcentaje de mortalidad de 2.20%, siendo un porcentaje bajo tomando como referencia a *Bacillus* ROSS 2214, el cual tuvo una mortalidad de 16.60%. Por otra parte, la Ivermectina se utilizó a una concentración de 5 mg/mL, presentando una mortalidad de 95%, siendo el tratamiento con mayor actividad acaricida, tomando como referencia a *Bacillus* ROSS 2 con una mortalidad de 57.95%.

Con base a los datos obtenidos, se procedió a realizar un PROBIT en el entorno R®, tomando únicamente a *Bacillus* ROSS 2 para determinar la CL₅₀ Y CL₉₀ (Cuadro 14). Siendo el Bs con mayor mortalidad a comparación de los demás Bs.

Cuadro 13 Análisis de varianza del PROBIT a partir del efecto acaricida del biosurfactante *Bacillus* ROSS 2 con H₂O como diluyente contra *T. putrescentiae*.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr(>F)
Tratamiento	6	22416	3736	27.42	>0.001
Error	49	6676	136		
Total	55	29092			

Cuadro 14 Mortalidad de *T. putrescentiae* usando el biosurfactante *Bacillus* ROSS 2 como acaricida con H₂O como diluyente, conforme al PROBIT. Promedio con letras diferentes indican que existen diferencias significativas (Tukey, P<0.05).

Biosurfactante	Concentración mg/mL	Promedio + DS
<i>Bacillus</i> ROSS 2	156	67.02 ^b ± 14.98
	78	61.66 ^b ± 20.27
	39	56.37 ^b ± 16.82
	19	11.69 ^c ± 14.35
	10	8.12 ^c ± 9.10
Agua	---	4.58 ^d ± 5.20
Ivermectina	5	90.83 ^a ± 6.16

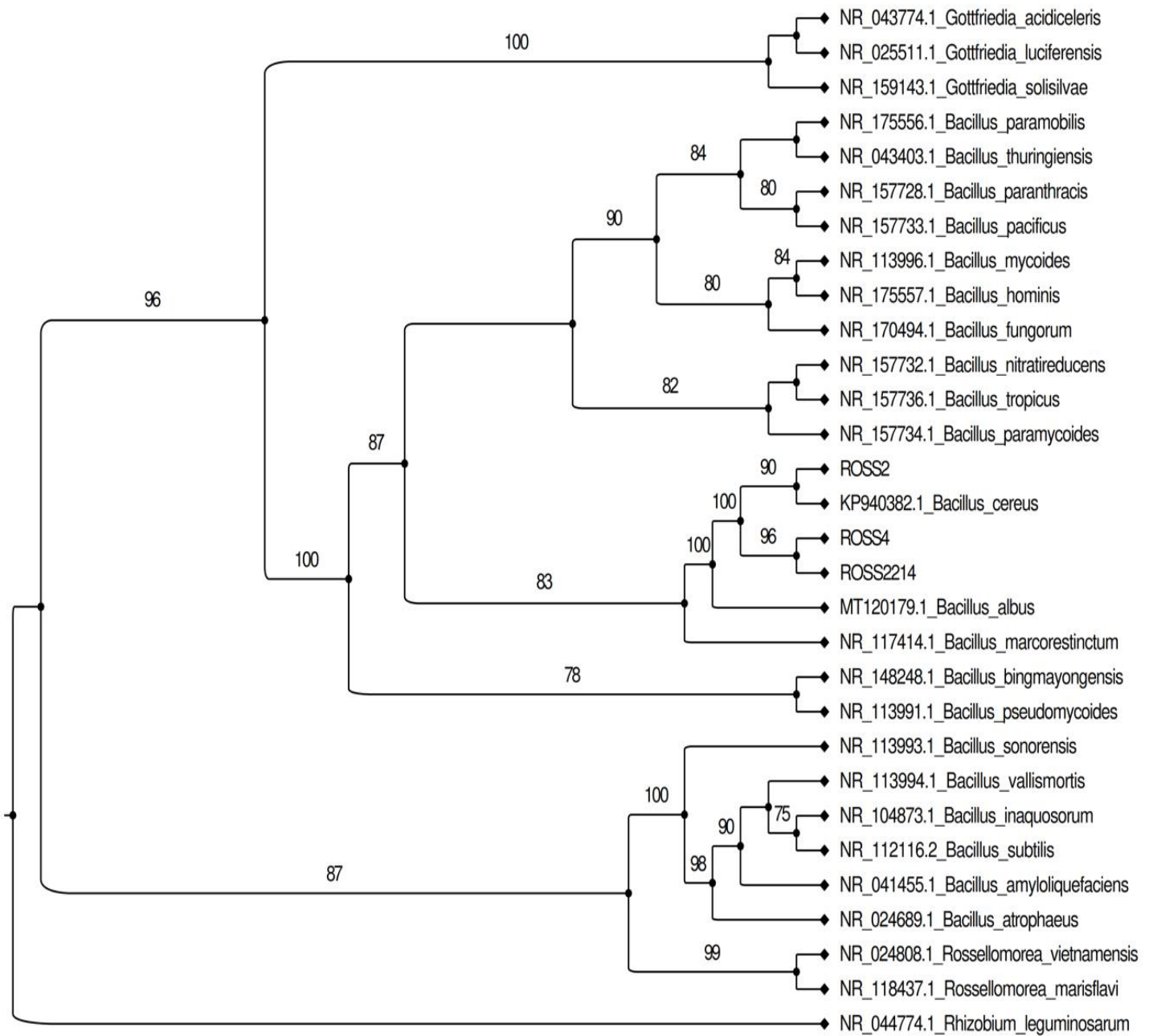
Conforme en el Cuadro 14, se puede percibir una tendencia positiva, observándose una correlación de dosis reacción. Por lo que la dosis obtiene un incrementando el porcentaje de mortalidad, un caso muy diferente entre los estudios realizados con *N. aberrans*, ya que, si la dosis era más alta, la mortalidad disminuía. Muy diferente en el caso de *T. putrescentiae*.

Otro dato por recalcar es que hubo un incremento exponencial entre la concentración de 19 a 39 mg/mL. Donde 19 mg/mL se presentaba una mortalidad del 11.69% y un 56.37 a 39 mg/mL. Sin embargo, se puede observar que a la concentración de 10 mg/mL hay un 4.58% de mortalidad.

Con los resultados que se tuvieron en el bioensayo se sometieron a un ANOVA, donde se pudo determinar si existían diferencia entre los tratamientos. El proceso estadístico se realizó con la ayuda del entorno R®.

6.3 Identificación molecular de cepas productoras de biosurfactantes.

Las secuencias del gen ribosomal 16S de las tres cepas fueron analizadas por el algoritmo Blast, donde se observó que las cepas ROSS 2, ROSS 4 y ROSS2214 tiene una alta similitud con especies del género *Bacillus* (Fig. 15). El árbol filogenético se construyó utilizando fragmentos de las secuencias de los genes ribosomales 16S para confirmar la identidad de los aislamientos a nivel de género. El cladograma muestra que las cepas ROSS2, ROSS4 y ROSS2214 probablemente estén relacionadas con *Bacillus cereus* y *Bacillus albus* (Figura 15).



1.0

Figura 15. Análisis filogenéticos basados en secuencias del gen 16S rDNA de aislados con capacidad de producir biosurfactantes. Los números de acceso de las secuencias de referencia se muestran después del nombre de la especie.

6.4 Evidencia de presencia de biosurfactante.

En las cepas (*Bacillus* ROSS 2, *Bacillus* ROSS 4 Y *Bacillus* ROSS 2214). Se pudo detectar la producción de Bs en el medio agar CTAB (Abbasi et al., 2012) y Agar Siegmund y Wagner realizándole un cambio el CTAB por CaCl₂ (Aparna et al., 2012). La mejor producción de Bs fue con residuo de glicerol, por lo que se optó utilizar este residuo para la producción y purificación de los biosurfactantes para los bioensayos (Figura 16).

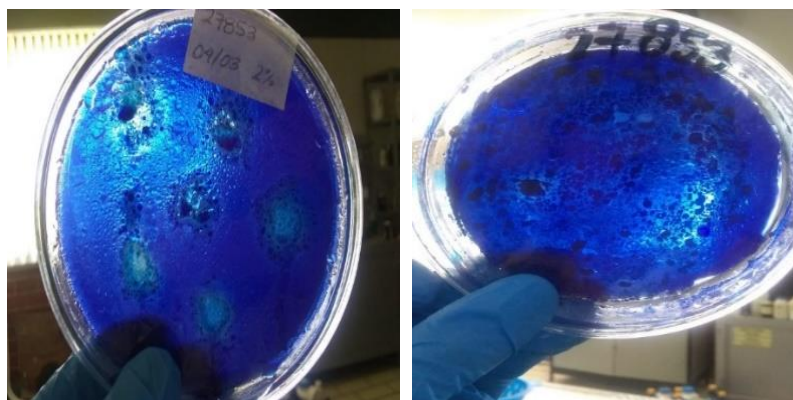


Figura 16. Producción de Biosurfactantes por las diferentes cepas en medio agar CTAB.

En Cuadro 15, se describe la cantidad de Bs total obtenido en estado sólido, con base a la técnica y al medio de cultivo empleado. El medio utilizado fue a base de un medio de sales minerales (MSM) más aceite usado de cocina (AUC) al 2%.

Cuadro 15 Cantidad de Bs sólido obtenido en 350 mL de MSM+AUC al (2%).

Cepa	Muestra	Masa (g/L)
2	<i>Bacillus</i> ROSS (1)	0.0003
	<i>Bacillus</i> ROSS (2)	0.0014
	Precipitado	-
4	<i>Bacillus</i> ROSS (1)	0.00038

	<i>Bacillus</i> ROSS (2)	0.0014
	Precipitado	-
2214	<i>Bacillus</i> ROSS (1)	0.00039
	<i>Bacillus</i> ROSS (2)	0.0016
	Precipitado	

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la actividad nematicida y acaricida de Bs producidas por las cepas *Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4 y *Bacillus* ROSS2214. Las cepas fueron identificadas por secuencia del gen 16S ribosomal indicando el análisis filogenético su relación con las especies de *B. cereus* y *B. albus* (Figura 16).

Según Edosa et al. 2018; Ibrahim et al. 2013; Ismail et al. 2013, los Bs producidos por las cepas de *Bacillus* son de naturaleza lipopéptica y no son de alto peso molecular. Los lipopéptidos son biosurfactantes con propiedades de biocontrol con un potencial en la agricultura, ya que inhiben una amplia gama de hongos patógenos de plantas (Plaza et al., 2015). por ser compuestos hidrofóbicos, debido a la interacción de las micelas con los plaguicidas se apropia la transferencia de las masas hacia el microorganismo. De igual manera, tiene presente aminoácidos, péptidos, mono o polisacáridos y una región hidrofóbica en la que están presentes ácidos grasos saturados e insaturados (De la Rosa et al., 2014). De acuerdo con Das et al., 2008 los Bs producidos por *Bacillus* son lipopéptidos antimicrobianos el cual inhiben el crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal.

Los compuestos conocidos de los Bs son los ramnolipidos, trehalolípidos, soforolípidos y manosileritritol lípidos, las cuales contienen monosacáridos o disacáridos, combinados con ácidos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxialifáticos (Banat et al., 2010).

Se ha reportado de la producción de un Bs por la cepa de *B. cereus* 28BN cuya parte de su estructura contiene una ramnosa (Tuleva et al., 2005). Durval et al., (2020) reportaron un Bs de naturaleza química lipopeptídica, producido por la cepa *B. cereus* UCP1615. Los diferentes biosurfactantes que han sido reportados están relacionados principalmente en procesos de biorremediación, sin embargo, también estos metabolitos pueden tener actividad antibacteriana, antifúngica y nematicida.

De la Rosa et al., 2014 mencionan el potencial y el posible mecanismo de los Bs con interés a la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas sintéticos.

Ugaz-Hoyos et al., 2020 menciona la aplicación de los Bs en biorremediación de suelos contaminados de hidrocarburos y el bajo coste de su uso, y lo más importante la baja toxicidad que esa produce en comparación con los sintéticos. Los Bs han sido estudiados para una extensa gama de usos. Un estudio sobresaliente de los Bs es con interés agrícola, las cuales conllevan a la mejora y fertilidad de semillas, igual manera, contemplando el control de patógenos en plantas (Naughton et al., 2019).

Las cepas de *Bacillus* ROSS 2, *Bacillus* ROSS 4 y *Bacillus* ROSS 2214 presentaron actividad nematicida contra *N. aberrans* (J2), cabe mencionar que este es el primer reporte de Bs con actividad nematicida contra esta especie de nematodo falso agallador. Un efecto similar de un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* HussainT-AMU fue reportado por (Hussain et al., 2020), donde se obtuvo el 90% de mortalidad de J2 de *M. incognita* a las 24 h, así como también disminuyó el número de agallas en las raíces de las plantas de tomate.

En otro estudio realizado por Fazaeli et al., (2021) reportaron que el Bs producido por *Staphylococcus epidermidis* presentó mortalidad del 63.3% contra larvas del escarabajo de la harina, *Tribolium castaneum*; este mismo efecto se observó con el Bs ochrosin producido por la cepa *Ochrobactrum* sp. BS-206 contra *T. castaneum*, *Callosobruchus chinensis* y *Sitophilus oryzae* fue reportado por Kumar et al., 2021. Franco et al. (2017), también reportaron la producción de un Bs de naturaleza glicolípida con actividad contra larvas del mosquito *A. aegypti*. Mientras, Geetha et al. (2010) probaron la “surfactina” producida por *B. subtilis* contra las pupas del mosquito *Anopheles stephensi*.

Adicionalmente se pudo notar actividad acaricida de Bs producidos por *Bacillus*. Existe antecedente de dicha actividad en la patente llamada Composición que comprende células de *Bacillus* recombinantes y lipopéptido (Curtis y Thompson, 2016). Sin embargo, existe otro reporte de Bs producidos por *Bacillus* contra el insecto *Myzus persicae* en la que se obtuvo una mortalidad del 87.1%, (Yun et al., 2013). Otro reporte del género *Bacillus* contra el mismo filo, es para el control de la

Tuta absoluta (Khedher., 2015). De igual manera se ha reportado *Bacillus* contra *Spodoptera littoralis* (Khedher., 2017).

Sin embargo, existen reportes de Bs con una asociación con extractos *Melia azedarach* contra *Camptotylus reuteri* donde el extracto sin el Bs obtenía una mortalidad entre el 11.4-18.7% y con el Bs suministrado una mortalidad entre el 53.5-74.1% (Jazzar y Hammad., 2003). Krishnayaand y Grewal., 2002, reportaron efecto de Neem contra el nematodo *Steinernema feltiae*, en la que se usó un suplemento el cual fue un Bs mejorando la actividad de virulencia.

Aunque los Bs se han reportado con actividad nematocida contra *M. incognita*, los resultados presentados pueden ser considerados como el primer reporte de los Bs contra el nematodo *N. aberrans* y el ácaro *T. putrescentiae*, por lo que los Bs pueden representar una alternativa sustentable para el control de plagas de interés agrícola.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN

Las cepas ROSS 2, ROSS 4 y ROSS 2214, están relacionadas por secuencia del gen 16s con las especies *Bacillus cerus* y *Bacillus albus*.

Los Bs poseen actividad nematocida contra *N. aberrans* (J2) y acaricida en el ácaro *T. putrescentiae*.

Bacillus ROSS 2 tuvo una mayor actividad contra, *N. aberrans* y *T. putrescentiae*.

Los Bs pueden ser considerados como nuevas alternativas de control de nematodos y ácaros, ayudando a eliminarlos en los cultivos de importancia económicas y de igual forma en alimentos derivados de cárnicos.

CAPÍTULO 9. LITERATURA CITADA

- Abbasi, H., Hamedi, M. M., Lotfabad, T. B., Zahiri, H. S., Sharafi, H., Masoomi, F. and Noghabi, K. A. (2012). Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(2), 211-219.
- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1987 jun;3(2):302-303. PMID: 3333059
- Abou El-Atta, D. A. E. M., & Osman, M. A. (2016). Development and reproductive potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) on plant-parasitic nematodes and artificial diets. *Experimental and Applied Acarology*, 68, 477-483.
- Abundes-Arteaga, L. F., Castañeda-Ramírez, G. S., López-Guillén, G., y Aguilar-Marcelino, L. (2020). Ciclo de vida y caracterización morfológica del ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (schrank) (astigmata: acaridae) como agente potencial de biocontrol de nematodos parásitos de ovinos. *Entomología mexicana*, Vol. 7: 420–424.
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Ashraf, S. A., Hassan, M. I., Snoussi, M., & Patel, M. (2021). Functional and Structural Characterization of *Pediococcus pentosaceus*-Derived Biosurfactant and Its Biomedical Potential against Bacterial Adhesion, Quorum Sensing, and Biofilm Formation. *Antibiotics*, 10(11), 1371.
- Aguilar Sagástegui, L. D. (2013). Aislamiento de Microorganismos Productores de Biosurfactantes.
- Aguilar-Marcelino L. 2012. Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Texcoco, Edo. De México. México, 1-178.

- Aguilar-Marcelino L., M. T. Quintero-Martínez, P. Mendoza-de Gives, M. E. López-Arellano, E. Liébano- Hernández, G. Torres-Hernández, J.M. González-Camacho and I. V.Cid del-Prado. 2014. Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacterial feeding nematodes. *J. Helminthol.* 88 (1): 20-3. DOI: 10.1017/S0022149X12000624.
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de Gives, P., Quintero-Martínez, M. T., López-Arellano, M. E., Bautista-Garfias, C. R., Reyes-Guerrero, D. E., and Olmedo-Juárez, A. (2016). Cultivo in vitro de ácaros nematófagos *Lasioseius penicilliger* y *Caloglyphus mycophagus* como agentes de biocontrol. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11(2), 52-59.
- Al-Assiuty, B. A., Nenaah, G. E., & Ageba, M. E. (2019). Chemical profile, characterization and acaricidal activity of essential oils of three plant species and their nanoemulsions against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored-food BSmite. *Experimental and Applied Acarology*, 79, 359-376.
- Anandaraj, B., Thivakaran, P. 2010. Isolation and Production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *J. Biosci. Tech* 1:120-126.
- Aparna, A., Srinikethan, G., and Smitha, H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
- Avila, T. M. G. (2021). Propagación del nematodo entomopatógeno *Caenorhabditis brenneri*.
- Ayirala, S., Li, Z., Mariath, R., AlSofi, A., Xu, Z., & Yousef, A. (2020). Microscale interactions of surfactant and polymer chemicals at crude oil/water interface for enhanced oil recovery. *SPE Journal*, 25(04), 1812-1826.
- 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, 427-444.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 495-508.

- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de canales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Bongers, T., y Esquivel, A. (2011). Morfología de los nematodos curso de identificación. Universidad Nacional, 1-42.
- Burgos Díaz, C. (2012). Biotensioactivos producidos por "*Sphingobacterium detergens*" sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades.
- Caccia, M., Lax, P., and Doucet, M. E. (2013). Effect of entomopathogenic nematodes on the plant parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 105-109.
- Cala, S., & Leonardo, E. (2010). Producción, caracterización, y evaluación de la actividad biológica de biosurfactantes (ramnolípidos) a partir rizobacterias de fique (*Furcraea* spp.) (No. Doc. 26819) CO-BAC, Bogotá).
- Canevari, G. D. C., Rezende, F., Silva, R. B. D., Faroni, L. R. D. A., Zanuncio, J. C., Papadopoulou, S., & Serrão, J. E. (2012). Potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Astigmata: Acaridae) for the biological control of *Lasioderma serricorne* (F.)(Coleoptera: Anobiidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 299-303.
- Castro, B. T., De Lara, A. R., Castro, M. G., Castro, M. J., & Malpica, S. A. (2003). Alimento vivo en la acuicultura. *Contactos*, 48, 27-33.
- Castro-Ortega, I. R. (2020). Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nematodos entomopatógeno en cultivos de caña de azúcar en Morelos. Tesis, Doctorado, Facultad de Centro de investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México. 5 p.
- Colloff MJ (2009) Dust mite allergens. In *Dust mites*, Springer, Dordrecht. 2009.
- Curtis D and Thompson B (2016) Compositions comprising recombinant *Bacillus cells* and another biological control agent. International application published under the patent cooperation treaty (PCT) WO2016044529-A1.

- D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E., & Höfte, M. (2010). Biosurfactants in plant–*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environmental microbiology reports*, 2(3), 359-372.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1675-1684.
- de Kronemberger, F. A., Santa Anna, L. M. M., Fernandes, A. C. L. B., de Menezes, R. R., Borges, C. P., & Freire, D. M. G. (2007). Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. In *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 401-413). Humana Press.
- De la Rosa Cruz, N. L., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 5(1), 1-21.
- de Lara, R., Castro, T., Castro, J., & Castro, G. (2007). Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de biología marina y oceanografía*, 42(1), 29-36.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64. DOI: <https://doi.org/10.1128/mnbr.61.1.47-64.1997>
- Doucet, M. E., and Lax, P. (2005). El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en la Argentina. 6.
- Durval IJB, Mendonça AHR, Rocha IV, Luna JM, Rufino RD Converti A, Sarubbo LA (2020) Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Mar Pollut Bull* 157:111357.
- Edosa, T. T., Jo, Y. H., Keshavarz, M., & Han, Y. S. (2018). Biosurfactants: production and potential application in insect pest management. *Trends Entomol*, 14(79), 79-87.
- Enkegaard, A., Sardar, M. A., & Brødsgaard, H. F. (1997). The predatory mite *Hypoaspis miles*: biological and demographic characteristics on two prey

species, the mushroom sciarid fly, *Lycoriella solani*, and the mould mite, *Tyrophagus putrescentiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82(2), 135-146.

- Erban, T., Klimov, P. B., Smrz, J., Phillips, T. W., Nesvorna, M., Kopecky, J., and Hubert, J. (2016). Populations of stored product mite *Tyrophagus putrescentiae* differ in their bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1046.
- Fazaeli N, Bahador N, Hesami S (2021) A Study on Larvicidal Activity and Phylogenetic Analysis of *Staphylococcus epidermidis* as a Biosurfactant-Producing Bacterium. *Pol J Environ Stud* 30(5): 4511-4519. <https://doi.org/10.15244/pjoes/132807>.
- Fernandes, N. D. A. T., de Souza, A. C., Simoes, L. A., Dos Reis, G. M. F., Souza, K. T., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2020). Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiological Research*, 241, 126571.
- Figueroa, J. L. (2009). Nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. *Investigación y Ciencia*, 17(45), 4-11.
- Flores-Camacho, R., Manzanilla-López, R. H., Cid del Prado-Vera, I., & Martínez-Garza, Á. (2007). Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y *Allen* con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 26-34.
- Franco Marcelino, P. R., da Silva, V. L., Rodrigues Philippini, R., Von Zuben, C. J., Contiero, J., Dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2017). Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. *PLoS One*, 12(11), e0187125.
- Franco, J. (1981). Nematodos Del Quiste de la Papa *Globodera* spp (Vol. 9). International Potato Center.

- Franco, J., Ramos, J., Oros, R., Maín, G. M., & Ortuño, N. (1999). Pérdidas económicas causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. en el cultivo de la papa en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la papa*, 11(1), 40-66.
- García-Munguía, A. M., Contreras-Martínez, R. N., Ramos-Barreto, C. A., Pérez-Sato, M., Gastélum-Ferro, W. K., Pérez-Cabrera, L. E., ... & García-Munguía, C. A. (2016). Biological control of nematodes *in vitro* root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.) based on chitosan and fluensulfone. *Revista Biológico-Agropecuaria Tuxpan*, 5(7), 1471-1477.
- Geetha I, Manonmani AM (2010) Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. *Lett Appl Microbiol* (4):406-12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02912. x.
- Gomez Valdez, L. (2016). Potencial nematocida de un metabolito secundario producido por *Serratia* sp. (*Enterobacteriales: Enterobacteriaceae*) sobre *Nacobbus Aberrans* (*Tylenchida: Pratylenchidae*)- (Bachelor's thesis).
- Gulati, R. (2017). Damage potential of *Tyrophagus putrescentiae* Schrank (Acari: Acaridae) in mushrooms. *Emergent Life Sciences Research*, 3, 6-15.
- Hidalgo, A. J., Ponce, G. V., Aguilera, G. M., Alviter, A. R., & Mendoza, N. M. (2014). OCURRENCIA DE *Nacobbus aberrans* EN CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL NOROESTE DE MICHOACÁN, MÉXICO. *Nematropica*, 44(1)
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Hughes, A. M. (1976). *The mites of stored food and houses* (No. 2nd edition). Her Majesty's Stationery Office.
- Hugot, J.P., Baujard, P. ans Morand, S. 2001. Biodiversity on helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 3:199-208.
- Hussain T, Haris M, Shakeel A (2020) Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root Galling caused by *Meloidogyne incognita*. *Vegetos* 33: 229–238. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00099-5> 354.

- Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS, Umar S (2013) Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Int Biodeter Biodegr* 81: 28-34. 356.
- Iraola, V. (1998). Introducción a los ácaros (I): Descripción general y principales grupos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina*, 23, 13-19.
- Ismail W, Al-Rowaihi IS, Al-Humam AA, Hamza RY, El Nayal AM (2013) Bououdina, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. *Int Biodeter Biodegr* 84: 168-178.
- Isman, M. B. (2017). Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Industrial Crops and Products*, 110, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.012>
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061.
- Jazzar, C., & Hammad, E. A. F. (2003). The efficacy of enhanced aqueous extracts of *Melia azedarach* leaves and fruits integrated with the *Camptotylus reuteri* releases against the *sweetpotato whitefly* nymphs. *Bulletin of Insectology*, 56, 269-276.
- Karanth, N. G. K., Deo, P. G., & Veenanadig, N. K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, 116-126.
- Kaya, D., Inceboz, T., Kolatan, E., Güneli, E., & Yilmaz, O. (2010). Comparison of efficacy of ivermectin and doramectin against mange mite (*Sarcoptes scabiei*) in naturally infested rabbits in Turkey. *Veterinaria Italiana*, 46(1), 51-56.
- Khedher, S. B., Boukedi, H., Dammak, M., Kilani-Feki, O., Sellami-Boudawara, T., Abdelkefi-Mesrati, L., & Tounsi, S. (2017). Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of invertebrate pathology*, 144, 11-17.

- Khedher, S. B., Boukedi, H., Kilani-Feki, O., Chaib, I., Laarif, A., Abdelkefi-Mesrati, L., & Tounsi, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 42-47.
- Kim, S. K., Kim, Y. C., Lee, S., Kim, J. C., Yun, M. Y., & Kim, I. S. (2011). Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(3), 934-938.
- Krishnayaand, P. V., & Grewal, P. S. (2002). Effect of neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Biocontrol Science and Technology*, 12(2), 259-266.
- Kumar A, Singh SK, Kant C, Verma H, Kumar D, Singh PP, Modi A, Droby S, Kesawat MS, Alavilli H (2021) Microbial Biosurfactant: A New Frontier for Sustainable Agriculture and Pharmaceutical Industries. *Antioxidants* 10:1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>.
- Manolo Gouy, Stéphane Guindon, Olivier Gascuel, SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 27, Issue 2, February 2010, Pages 221–224,
- Manzanilla-López, R.H., Costilla, M.A., Doucet, M., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, L, Souza, R.M. and Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: *Pratylenchidae*): systematics, distribution, biology and management *Nematropica* 32, 149-227.
- Marro, N., Caccia, M., Doucet, M. E., Cabello, M., Becerra, A., and Lax, P. (2018). Mycorrhizas reduce tomato root penetration by false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Applied Soil Ecology*, 124, 262-265.
- Martínez-Trujillo, M. A., Membrillo Venegas, I., Viguera-Carmona, S. E., Zafra-Jiménez, G., & García-Rivero, M. (2015). Optimización de la producción de un biosurfactante bacteriano. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(2), 355-362.

- Méndez-Santiago, E. W., Gómez-Rodríguez, O., Sánchez-Cruz, R., Folch-Mallol, J. L., Hernández-Velázquez, V. M., Villar-Luna, E., ... & Wong-Villarreal, A. (2021). *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Archives of Microbiology*, 203, 549-559.
- Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., & Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of applied microbiology*, 127(1), 12-28.
- Navone, G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., y Zonta, M. L. (2017). CAPÍTULO 9. Phylum Nematoda. Macroparásitos: Diversidad y Biología, 128.
- Nielsen, C. J., Ferrin, D. M., & Stanghellini, M. E. (2006). Efficacy of biosurfactants in the management of *Phytophthora capsici* on pepper in recirculating hydroponic systems. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28(3), 450-460.
- Oliva Marín, A. (2022). Interacción de un diramnlípido biotensioactivo con membranas fosfolipídicas modelo y membranas biológicas. *Proyecto de investigación*.
- Patel, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Ashraf, S. A., & Adnan, M. (2021). Inhibition of Bacterial Adhesion and Antibiofilm Activities of a Glycolipid Biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with Its Physicochemical and Functional Properties. *Antibiotics*, 10(12), 1546.
- Pérez J., O. Anaya, C. Chang, I. Membrillo and G. Calva. 2010. Biosurfactants production by free-living bacteria nitrogen fixers growing on hydrocarbon (in Spanish). *Rev. CENIC Cienc. Quím.* 41: 1–9.
- Piedrahita, Ó. A. G., Zapata, J. C., y Estrada, B. V. (2012). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Estimación Histopatológica Del Grado De Infección Inducido Por *Stagonospora nodorum* (BERK.). *Castellani & germano* en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.), 38.

- Płaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkievicz, K., & Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 1023-1034.
- Prieto, L. M., Michelon, M., Burkert, J. F. M., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2008). The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere*, 71(9), 1781-1785.
- Pulido-Villamarín, A. D. P., Castañeda-Salazar, R., Ibarra-Ávila, H., Gómez-Méndez, L. D., y Barbosa-Buitrago, A. M. (2016). Microscopia y principales características morfológicas de algunos ectoparásitos de interés veterinario. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(1), 91-113.
- Rachna I. and A. Manoj. 2017. Damage potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae) in mushrooms. *Emer. Life Sci. Res.* 3(2): 6-15. <http://dx.doi.org/10.7324/ELSR.2017.32615>.
- Raiger lustman, L. J., & López, N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera.
- Riojas-González, H., Torres-Bustillos, L. G., Mondaca-Fernández, I. Balderas-Cortes, J., Gortáres-Moroyoqui, P. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*. 9:120-145
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, 154-162.
- Salager, J. L., & Fernández, A. (2004). *Surfactantes. Cuaderno de enseñanza en fenómenos interfaciales*, Universidad de los andes, facultad de ingeniería-escuela de ingeniería química, Mérida-Venezuela.
- Sanabria, D. J. C. (2019). *Panagrellus redivivus*, para la alimentación de peces ornamentales. *Zoociencia*, 6(1), 14-20.
- Sánchez-Ramos, I. I. (2000). Biología y control de " *Tyrophagus putrescentiae*" (Schrank, 1781) (Astigmata: Acaridae), plaga de productos almacenados.

- Sanz, A. (2015). La industria de los agentes tensioactivos. *Química Orgánica Industrial*, 123.
- Somoza-Coutiño, G., Wong-Villarreal, A., Blanco-González, C., Pérez-Sariñana, B., Mora-Herrera, M., Mora-Herrera, S. I., & Yañez-Ocampo, G. (2020). A bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with tolerance to changes of pH, salinity and temperature. *Microbial pathogenesis*, 139, 103869.
- Soto, A. T. (2014) Géneros y especies de importancia en la agricultura en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 32.
- Stanghellini, M. E., & Miller, R. M. (1997). Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant disease*, 81(1), 4-12.
- Tak, J. H., Kim, H. K., Lee, S. H., & Ahn, Y. J. (2006). Acaricidal activities of paeonol and benzoic acid from *Paeonia suffruticosa* root bark and monoterpenoids against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(6), 551-557.
- Thrane, C., Nielsen, T. H., Nielsen, M. N., Sørensen, J., & Olsson, S. (2000). Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 139-146.
- Tuleva B, Christova N, Jordanov B, Nikolova-Damyanova B, Petrov P (2005) Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Z Naturforsch C J Biosci* 60(7-8):577-82. doi: 10.1515/znc-2005-7-811.
- Ugaz-Hoyos, J., Vega-Cruz, H., Iglesias-Osores, S., & Carreño-Farfan, C. (2020). Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.
- Velasco-Azorsa, R., Cruz-Santiago, H., Cid del Prado-Vera, I., Ramirez-Mares, M. V., Gutiérrez-Ortiz, M. D. R., Santos-Sánchez, N. F., ... & Hernández-Carlos, B. (2021). Chemical characterization of plant extracts and evaluation of their nematocidal and phytotoxic potential. *Molecules*, 26(8), 2216.

- Villa-Briones, A., Zavaleta-Mejía, E., Vargas-Hernández, M., Gómez-Rodríguez, O., & Ramírez-Alarcón, S. (2008). Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3), 249-255.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martinez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., & Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, 143-155.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *J. Nematol.* 9(3): 249–251. <https://www.doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.006>.
- Weisburg GW, Barns MS, Pelletier AD, Lane JD (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol* 173: 697-03.
- Wong-Villarreal A., L. Reyes-López, H.C. González, C. B. González and G. Yáñez-Ocampo. 2016. Characterization of Bacteria Isolation of Bacteria from *Pinyon Rhizosphere*, Producing Biosurfactants from Agro-Industrial Waste. *Pol. J. Microbiol.* 7;65(2):183-189.
- Yáñez-Ocampo, G., y Wong-Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Bio Tecnología*, 17(3), 12-28.
- Yeates, G. W., and Bongers, T. (1999). Nematode diversity in agroecosystems. *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*, 113-135.
- Yu, H., Zhu, L., & Zhou, W. (2007). Enhanced desorption and biodegradation of phenanthrene in soil–water systems with the presence of anionic–nonionic mixed surfactants. *Journal of Hazardous Materials*, 142(1-2), 354-361.
- Yun, D. C., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Kim, I. S., & Kim, Y. H. (2013). Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 751-753.

CAPÍTULO 10. ANEXO

10.1 Votos y Artículo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO
PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS

C.c.p. Archivo



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

JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO | Fecha:2023-05-27 19:07:08 | Firmante

DsWro3QskMcqu4I/vhv0WRGc5i1f98R3v9ILCv5E4ATf/mXvWmXiKdvDdkrot59vuSM6+GyrrHGOIWb0ip0RcTFtGlpw+Bh3Pb+WbYZ0xC/h1tPI1wu6o+pAkNVK5R0lzFdcFas5e+UIRyxYf9e4TS0s6DYd67K0hg1ysulJPC1uv4HTKCMgpxzdBZApj74zKD1Gx5rL5qdlEAN4kqU1MFeDUWO1SkPR+cMlyHEqBZfc0RmzEp06epeniF27AxawusjgscRe1/kpt59UziQ NnQOOm+mx4TAX8aecQ7DbLWoTi91lySeZFLXYPbXcBWM1zSs5wzxKK4oddLNvkXspQ==

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



9BGnoSlhF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Hb7YHc4g1gYIA0VNAR6RypHqJn2INIjM>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. ARNOLDO WONG VILLAREAL
PROFESOR-INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE LA SELVA, OCOSINGO, CHIAPAS

C.c.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Centro de Investigaciones Biológicas
Tel. (777) 329 70 00 Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

ARNOLDO WONG VILLARREAL | Fecha:2023-05-28 22:49:53 | Firmante

F4/1ftmZgZzDC1YOsStnOhujPprG/AAPxXaTroM3umlcAdeYvzk+cSbgOtOnygQfHQHjqauxlzKLyl/jDOG9rTckamSZCsrGnxedWFYMrH/IraFbRxLjfuZw9n4TQoh5TllqsOs/ALDN
IQcPQ4m5kn717Mskzk6Z6hi5QHtNqXbE+J3Jf4BAa99ZBAk1oNG7rhg3zX4J9cDKdsRjfnknwRXf7epHLvus2v079hr1JCavqvbsEoHOt+tfF/xBjH8UapFor2He9ryLn9HmQKEhN+KI
nSUvt3bHlodtfasjzkS5Dwn+Kdv13rnWIC3P/bp+t/MolgS4G6p/cU0oZaqQ==

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



[Yb9dgBtJ6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DJPm0pETPx9sYLk4eZtOtQ5J2tcliJ71>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

**DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

**DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO
INVESTIGADORA TITULAR “C” DEL CENID SALUD
ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP.**

C.c.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Centro de Investigaciones Biológicas
Tel. (777) 329 70 00 Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2023-05-27 11:38:24 | Firmante

NOhyYGOBh4JYqOcVBhwvyE/IFFupJVzmRLtdmVkDe7kMQG6xwRnz6wDETKI7QQ980Ex/6JfGr+N7JzHzEos9ZgCkuySa/Discny93U3droYpwPNBpb6ol+7G2V+obQRykrHe4TaqYNDdNvhPuC+6WxH881PiDa4B0rjnrxXu5HUr7Z+vZuBqrmoha6dCYvGCByHoNUiDAFbWOpJQifQYqtSdFBoALyuGY4UUq+afrdHZTbttagGdxNT1Fh5PY2exHZjrvG+GUMSJ1KhH7mx5VDBUilOMy1vHq9oXDSwKEPdx/mlJqsv0IS8cJQSGzqlf5H+foo3nY0e/jzYZQkko2Q==

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



[xLekSV5ZK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/819mFEWpgRQC3QfF4qWAtydokU4cE2RM>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. ALEJANDRO GARCÍA FLORES
PROFESOR-INVESTIGADOR DEL CENTRO
DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

C.c.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Centro de Investigaciones Biológicas
Tel. (777) 329 70 00 Ext. 3511 / coord.posgradocib@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

ALEJANDRO GARCIA FLORES | Fecha:2023-05-27 07:09:47 | Firmante

ph6QX5+LF+LI9R/hLpH3EdFVYMTRqroSWoclcCHGHygzsWe1BmVD/mp5hWSS2vTSA2oXfWluMWG9m4skY555PqnPrtqrF9eKVEkcnqpWJ9KNjhKHvr7MygNlyrQkbVAMtm9NOZkCvT+RhPEhsTcd5R6+kQEegAFSNH59DjMEHAcOdRnqvW/8ton4jYI6ZT8nAllnwAzITjMEZSh78LLXPP8ksW97zer3iuqQcUp9m/o2fSaUVyt+O9Kr5zwJmmMah7aSYzazmQ3KXohYzjtVm3MSqVWiC+QizGzCFU2W98R6fHvOnvCCWIRbEP/8Bg53RgcLb4gHfPgXW9jQflvA==

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



tjILSIZGX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/xmXI5OtOuY77bk18Z3l0mMitJjgHo7vs>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DRA. IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA
PROFESORA INVESTIGADORA DEL CENTRO DE
INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

C.c.p. Archivo



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

IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA | Fecha:2023-05-29 10:17:24 | Firmante

tW+aViazQESJUX0ZaQJuMERKE7baTsVetqHavpiMLR0N5d0jJztsqQxDw8314niXEAUZygL3o7Xl3xO+G73EuaifAEqTwjhudzKqUMvOxs+bFE6ksRA2/jGWPQnjEE6is2d5d5A1f7MXTFx3M2BqqGN1y29iy2Vvmooou/ZD2WeV7pWiUYg5naiJ69ywQqqSivTMF8sJg19fntPC5U5iA7JuiSISav6k6CA+OImgrED7rav9BY7N1oF57vGDTQdK5RN4kUeQO2WNfsCSGbz+RInduTMNohxyUQ17hBAUu7/uilaY+IEdCQL1THRiZNajq/GR1vwj/B4d5G/PjkaxVA==

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



[bf7HR9KSs](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JqCFF3GtGdOjKabKJvHTym7AQwerKBup>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

POSGRADO

Cuernavaca, Mor., a 21 de abril de 2023

DR. RUBÉN CASTRO FRANCO
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Por este medio informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis intitulado: **“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD NEMATICIDA Y ACARICIDA DE BIOSURFACTANTES PRODUCIDOS POR DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS”**, que presenta el alumno **JAIME ADRIEL GÓMEZ GUTIÉRREZ**, mismo que constituye un requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES; lo encuentro satisfactorio por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA
PROFESOR- INVESTIGADOR DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

C.c.p. Archivo



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

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-05-27 15:29:58 | Firmante

amOYNjtXhFVvYn63hGC0CAqap/uvdb3sbxB9uMBE9D65Tz0GgQogOG4F01nxzTeUZhJCCsTKSuCKoMrL/btdGql172c6hoGMzNsyNET+NsUuOFAfo6obTDDh2FMD2G27FLA
Q+4otSFGK56wNqj2VvkKS0VeDqx9eMZT2ffTcwsqGwFeoo6xatad0ClcLpPfdC+TMuR3Exflz0fU/xQzlel/bAnxvFWUqCas5/h9UPIM6eJollzYiefAelgpKJbGOEreaC9nC1voiZtnGp
W/1QTIM1zR509HQtwiTSox1JteSoLvY7Ld1luCX3MW9W0npPZ+CGirNM/8T4eclTQ400w==

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



[WBcuSxjeO](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cfxd2XFZZEUuDuist1cYNAvcaScfjQ5K>





In vitro nematicidal and acaricidal effect of biosurfactants produced by *Bacillus* against the root-knot nematode *Nacobbus aberrans* and the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*

Jaime Adriel Gómez-Gutiérrez¹ · Arnoldo Wong-Villarreal² · Liliana Aguilar-Marcelino³ · Gustavo Yañez-Ocampo⁴ · Emanuel Hernández-Nuñez⁵ · Juan Manuel Caspeta-Mandujano¹ · Alejandro García-Flores¹ · Julio Cruz-Arévalo² · Patricia Vargas-Uriostegui³ · Olga Gomez-Rodríguez⁶

Received: 29 November 2022 / Accepted: 16 April 2023

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2023

Abstract

In the present study, the nematicidal and acaricidal activity of three biosurfactants (BS) produced by strains of the *Bacillus* genus was evaluated. The BS produced by the *Bacillus* ROSS2 strain presented a mortality of 39.29% in juveniles (J2) of *Nacobbus aberrans* at a concentration of 30 mg/mL, this same strain is the one that presented the highest mortality in *Tyrophagus putrescentiae*, which was 57.97% at a concentration of 39 mg/mL. The BS were qualitatively identified by thin layer chromatography and are lipid in nature based on the retention factor (Rf). While the GC-MS analysis identified two main compounds that are 4,7-Methano-1H-indene-2,6-dicarboxylic acid, 3a,4,7,7a-tetrahydro-1, and Methyl 4-(pyrrol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole-3-carboxylate1, which is the polar part indicated by the presence of dicarboxylic acid and carboxylate groups; while the non-polar portion can be interpreted as a hydrocarbon chain of variable length. Based on the present results, BS can be an alternative for the biocontrol of the root-knot nematode *N. aberrans* and the mite *T. putrescentiae*.

Keywords Biosurfactants · Phytonematodes · Dust mites · Sustainable alternatives · Agroecology

Responsible Editor: Enderson Ferreira

✉ Arnoldo Wong-Villarreal
wova79@hotmail.com

✉ Liliana Aguilar-Marcelino
aguilar.liliana@inifap.gob.mx

Jaime Adriel Gómez-Gutiérrez
jaimeadri98@gmail.com

Gustavo Yañez-Ocampo
yanez0206@gmail.com

Emanuel Hernández-Nuñez
emanuel.hernandez@cinvestav.mx

Juan Manuel Caspeta-Mandujano
caspeta@uaem.mx

Alejandro García-Flores
alejandro.garcia@uaem.mx

Julio Cruz-Arévalo
arevalo.julio@laselva.edu.mx

Patricia Vargas-Uriostegui
var-gas.patricia@inifap.gob.mx

Olga Gomez-Rodríguez
olgago@colpos.mx

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Cuernavaca, Cuernavaca, Morelos, C.P, 62209, México

² División Agroalimentaria, Universidad Tecnológica de la Selva, C.P, 29950 Ocosingo, Mexico

³ National Center for Disciplinary Research in Animal Health and Safety (INIFAP), Km 11 Federal Road Cuernavaca-Cuautla, 62550 Jiutepec, MR, Mexico

⁴ Laboratorio de edafología y ambiente. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma del estado de Mexico, Campus El Cerrillo, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, C.P, 50200 Toluca de Lerdo, México

⁵ Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida, Mérida, Yucatán, México

⁶ Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, Estado de México, México

Introduction

National and global agricultural pests caused by phytopathogenic nematodes and mites cause economic losses of 33 to 65% in economically important crops [1]. Among the phytopathogenic nematodes, there are extremely aggressive species, such as *Pratylenchus* spp., *Ditylenchus* spp. and *Psilenchus* spp., the root-knot *Meloidogyne* sp. and false root-knot *Nacobbus aberrans*. In Mexico, the false root-knot nematode *N. aberrans* causes important losses in the production of numerous crops, mainly potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Solanum lycopersicum*), chili peppers (*Capsicum annum*), and beans (*Phaseolus vulgaris*), to name a few. The nematode *N. aberrans* has a wide host range; it parasitizes 84 species of cultivated plants and weeds, belonging to 18 families [2].

Another organism that causes extensive damage and loss in food products of plant and animal origin is the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. Additionally, in the body they transport bacteria and fungi such as *Klebsiella* spp., *Staphylococcus*, and *Candida albicans* [3–7].

Studies relate the mite *T. putrescentiae* with the induction of anaphylactic reactions and asthmatic crisis, due to bronchospasm. The *T. putrescentiae* mite is classified as a vector of pathogenic bacteria of *Klebsiella* spp., *Candida albicans*, and the genus *Staphylococcus* [6, 7]. To control populations of pathogenic mites and parasitic nematodes, pesticides of synthetic origin are used, which cause damage to beneficial organisms to the soil, environment, and human health [8]. The chemicals used to control parasitic nematodes and pathogenic mites are Ivermectin, Chitosan (Poly-D-glucosamine equivalent to 78.3 g chitosan/l), Fenamiphos (ethyl 4-methylthio-m-tolyl isopropylphosphoramidate), Pyre-thrins: (Z)-(S)-2-methyl-4-oxo-3(penta-2,4dienyl)cyclopent-2-enyl(1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2methylprop-1-enyl) cyclopropanecarboxylate [9–11]. However, nematodes and mites have developed resistance to pesticides and anthelmintics, which has led to urgent interest in seeking sustainable actions to mitigate environmental impact.

Among the options is the use of secondary metabolites, which can be produced by different types of organisms and microorganisms. One of these alternatives is biosurfactants (BS), which have great potential for the biological control of phytopathogenic fungi.

The study of biosurfactants has increased considerably in the last 2 decades [12, 13]. The production of biosurfactants in freshwater and marine microorganisms has been reported [14, 15]. Patents on biosurfactants have since increased exponentially from around 250 in 2006 to more than 850 in 2019. However, the industrial production of these metabolites has a high cost in the bacterial

culture, production, purification, and recovery processes. Biosurfactants have been reported to have antifungal, antibacterial, algicidal, antiviral, and zoosporicidal activity [16].

Some BS formed by rhamnolipids alter the zoospore membrane, causing the lysis of phytopathogenic Oomycetes ([17–19]) [7, 20, 21]. Hussain et al. [22] reported that the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* HussainT-AMU presents a 90% mortality of J2 of *M. incognita* at 24 h, as well as a decrease in the number of galls in the roots of tomato plants. Biosurfactants such as rhamnolipids produced by *Pseudomonas* sp. EP-3, produce 80% mortality in *Myzus persicae* aphids through damage to the cuticle membrane [23] de Andrade et al. [8] reported that the biosurfactant produced by *Wickerhamomyces anomalus* has the ability to biocontrol *Aedes aegypti* larvae, a vector that causes the transmission of diseases of public health importance at the global and national levels, such as: dengue, zika, malaria, and chikungunya fever. The objective of this research was to evaluate the nematocidal effect on *N. aberrans* (J2) and the acaricidal effect on *T. putrescentiae* of BS produced by three strains of the genus *Bacillus*.

Materials and methods

Location

The present study was carried out at the National Center for Disciplinary Research in Animal Health and Safety (CENID-SAI) of INIFAP, located in Jiutepec, Morelos, Mexico, and at the Universidad Tecnológica de la Selva, located in Ocosingo, Chiapas, Mexico.

Isolation of microorganisms

The bacterial strains used in this study were isolated from a pilot-scale anaerobic reactor for the treatment of agro industrial waste in Tuxtla Gutierrez Chiapas, México. Bacterial strains were selected by culturing in blue methylene agar added with 2% waste cooking oil after an incubation period, bacteria showed whitish halo around colony growth as evidence of anionic biosurfactant production. The bacterial strains were stored on glycerol at -80°C .

Nacobbus aberrans

The inoculum of *N. aberrans* was obtained from the galled roots of tomato plants (*Solanum lycopersicum*). They were collected at the Colegio de Postgraduados, Campus de Montecillo, State of Mexico, Mexico, the population was established from a single mass of eggs, which were extracted

according to the method described by Vrain [24] and incubated at 27 °C in Petri dishes with sterile distilled water, until hatching and obtaining second stage juveniles (J2) according to [25].

Tyrophagus putrescentiae

Populations of the *T. putrescentiae* mite were used, whose breeding stock is found in the CENID-SAI, INIFAP. The specimens were isolated in 2013 in the town of San Juan Tlacotenco, Morelos, Mexico. Currently, they are kept incubated in Petri dishes with 5% agar-agar at room temperature. The mites feed on *P. redivivus* (Goodey) as their main food source to facilitate their reproduction and increase their populations. New specimens are transferred every 2 weeks to plates with sterile agar in order to obtain monocultures. Mite cultures were kept at room temperature (28 ± 2 °C) under dark conditions [26].

Panagrellus redivivus

The nematodes were cultivated on oatmeal-water medium contained in plastic containers covered with a porous cloth to allow aeration and prevent the entry of insects. The medium was prepared according to the method used by De Lara et al. [27]. The containers were kept at room temperature 28 ± 2 °C [26]. The *P. redivivus* nematodes were provided by the (CENID-SAI, INIFAP).

Production and extraction of biosurfactants

Bacillus ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS 2214 strains were grown in liquid mineral salt medium with 2% soybean oil as the only carbon source, for the production of BS. It was incubated for 8 days at 28 °C, with orbital shaking at 250 rpm. After this period, the cultures were centrifuged at 3500 × g for 20 min. in a SOLBAT j-40 centrifuge. BS extraction was performed by acid precipitation, for which cell-free supernatants were acidified to pH 2 with 2N HCl for 8 h at 4 °C. It was centrifuged at 3500 × g for 20 min. the precipitate obtained was stored until use.

Sequencing of the 16S rRNA gene

Molecular identification of the three BS-producing strains was performed. Genomic DNA from each BS-producing bacterial strain was extracted using the ZR Fungal/Bacterial DNA Kit™. The 16S ribosomal gene was amplified using oligonucleotides rD1 and fD1 and the conditions described by Weisburg et al. [28]. The amplification products were purified from the gel using the GeneJET kit (Thermo Scientific) and sequenced at the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University of Mexico (IBT, UNAM).

The sequences obtained were deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the access numbers: (1) ROSS2 (ON740901), (2) ROSS4 (ON740900), and (3) ROSS2214 (ON740899). 16S rDNA sequences were compared to 16S rDNA genes from the GenBank database using BlastN. The phylogenetic analysis of the matrix was carried out with the Kimura 2-parameter model with 1000 bootstrap in the seaview 4.6.1 program [29].

Thin-layer chromatography characterization of biosurfactant produced by bacterial strains

BS extracted from cell-free supernatants (CFS) were concentrated and analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (G60; Merck, Germany). Chromatograms were developed with chloroform: methanol: acetic acid (65:15:2, v/v) as mobile phase. Lipids detection was performed by exposure to iodine vapor, saccharides detection by exposure to the diphenylamine reagent. The reagents were sprayed, and the plates were heated at 105 °C for 10 to 20 min until the appearance of respective colors [30, 31]. The *R_f* values were calculated, which are the mean distance traveled by the biosurfactant, divided by the distance traveled by the solvent from the origin.

Biosurfactants characterization by GC-MS analysis

Analysis of gas-mass chromatography was performed on a Thermo Scientific brand TRACE GC with an ITQ900 ion trap mass detector (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy). The carrier gas was helium with a flow of 1 mL/min. The column used was TRACE-5MS (30 m, 0.25 µm of film, and 0.25 mm internal diameter). The GC was equipped with a split-splitless injector that was held at 270 °C. In method the oven was programmed as follows: initially 50 °C by 1 min, then the temperature was ramped in three steps: from 50 to 300 °C at 7 °C/min and finally held at 300 °C by 5 min, giving a total chromatographic time of 56 min. The mass spectra were acquired by electron impact ionization at 70 eV and the detector was set in TIC/Scan (Total Ion Current) mode from 50 to 650 m/z with 0.2 scan s⁻¹ (Dwell) of scanning rate. The transfer line and ion source temperatures were held at 270 and 200 °C respectively. The raw data were processed using Xcalibur™ software version 4.0 (Thermo Scientific, USA).

In vitro evaluation of biosurfactants against *Nacobbus aberrans* (J2)

The BS produced by the *Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS 2214 strains at different concentrations (10, 20, and 30 mg/mL) were evaluated. A control group (organic nematicide: Nematrol Plus at 6 mg/mL) was used. For the in vitro tests, 96-well microtiter plates were used,

in each well 50 μ L of distilled water containing 100 J2 and 50 μ L of each of the treatments (*Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS 2214) were mixed, each one of the control and treatment groups consisted of four repetitions, respectively. Subsequently, they were incubated in a humid chamber at 28 °C; after 72 h, the mortality of the J2 was evaluated, adding 10 μ L of NaOH at 1N to stimulate the larvae and the response to the chemical stimulus was observed under a 4X microscope, those nematodes that did not present motility were considered dead [32].

The percentage results of the different bioassays and mortality experiments were estimated based on the following formula [33]:

$$\% \text{ Mortality} = (\text{treated group} - \text{negative control}) / (100 - \text{negative control}) \times 100$$

In vitro evaluation of biosurfactants against the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*

BS obtained from *Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS 2214 were evaluated against *T. putrescentiae*. For each BS, the following concentrations were evaluated: 39, 40 and 60 mg/mL, with four repetitions respectively, in the same way, two control groups were established: (1) Ivermectin® at 5 mg/mL and (2) distilled water as a negative control. The in vitro test was performed in 24-well plates, ten mites with 50 μ L of BS were added to each well. Subsequently, they were incubated in a humid chamber at 28 °C; after 72 h, the readings were made with a stereoscope, the mites without activity were considered dead.

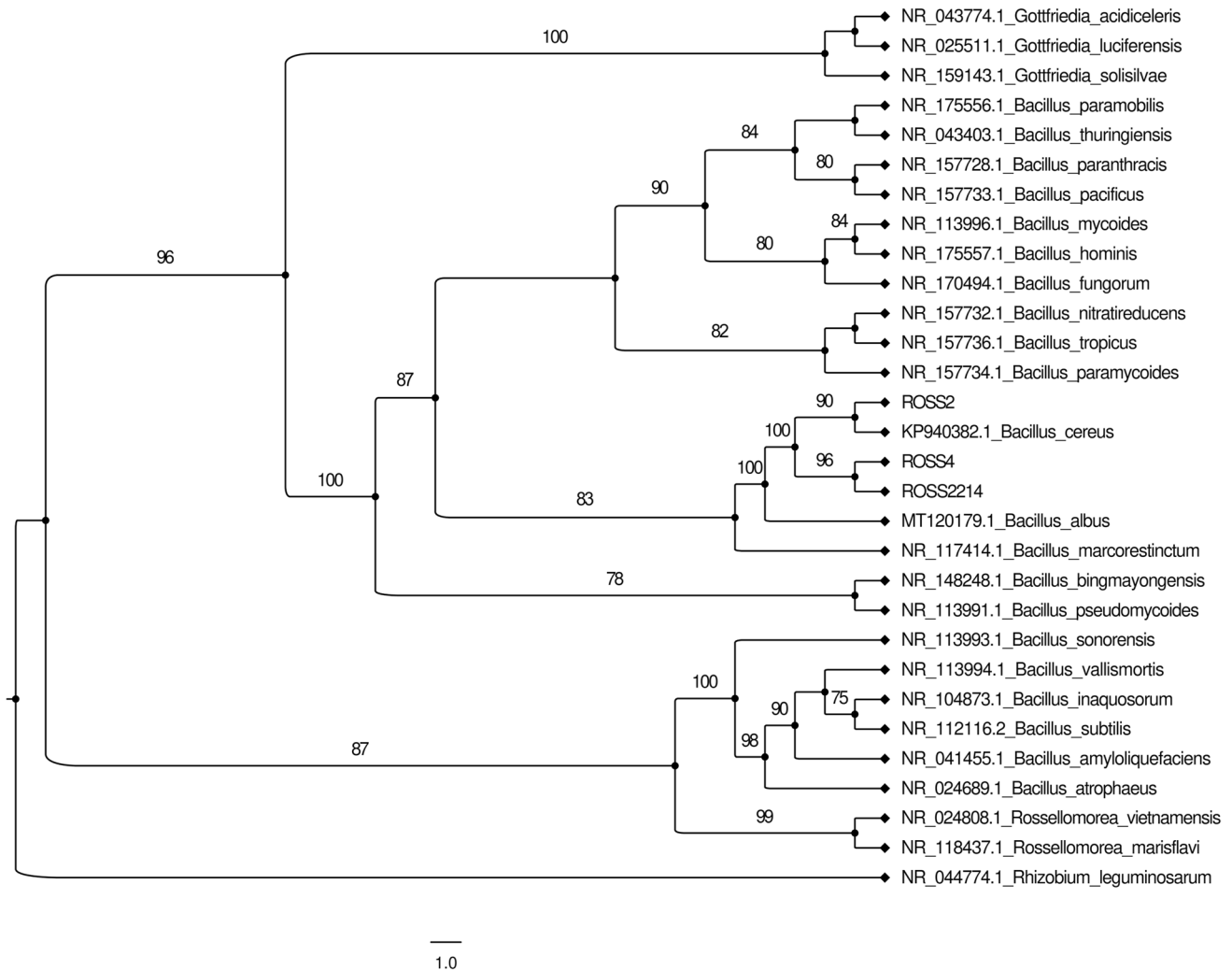


Fig. 1 Sequence-based phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene of isolates capable of producing biosurfactants. Accession numbers of reference sequences are shown before the species name

Statistical analysis

Mortality data for nematodes *N. aberrans* (J2) and mites *T. putrescentiae* were subjected to normalization using the square root of arcsine transformation and analyzed as a completely randomized design. The means were compared a posteriori using a Tukey test, considering a value of statistical significance of $\alpha = 0.05$. The tests were analyzed using R software version 4.1.1 [34].

Results

Identification molecular

The 16S ribosomal gene sequences of the three strains were analyzed by the Blast algorithm, where it was observed that the ROSS2, ROSS4, and ROSS2214 strains have a high similarity with species of the *Bacillus* genus (Fig. 1). The phylogenetic tree was constructed using fragments of the 16S ribosomal gene sequences to confirm the identity of the isolates at the genus level. The cladogram shows that ROSS2, ROSS4, and ROSS2214 strains are probably related to *Bacillus cereus* and *Bacillus albus* (Fig. 1).

In vitro evaluation of biosurfactants against *Nacobbus aberrans*

The results of the in vitro evaluation against *N. aberrans* (J2) are shown in Table 1. They present a range of 16.66% *Bacillus* (ROSS2214) to 39.29% *Bacillus* (ROSS2) from a concentration of 10 to 30 mg/mL, it is important to point out that the activity of BS depends on the concentration of the strains evaluated. We can also observe that at a concentration of 30 mg/mL, the BS produced by *Bacillus* (ROSS2) presented a J2 mortality of 39.29%, while the BS from *Bacillus* ROSS4 and *Bacillus* (ROSS2214) presented a mortality of 34.06 and 25.83%, respectively. As can be seen in Table 1, at concentrations of 10 and 20 mg/mL the BS of the three *Bacillus* strains were lower than the concentration of 30 mg/mL.

In vitro evaluation of biosurfactants against *T. putrescentiae*

In the in vitro evaluation against the dust mite *T. putrescentiae*, the concentration that presented the greatest activity in the three *Bacillus* strains was selected, in the bioassay against the nematode *N. aberrans* and the concentration of these strains was increased to 39, 40 and 60mg/mL. Table 2 shows that the BS produced by the *Bacillus* ROSS2 strain at a concentration of 39 mg/mL, a mortality of 57.97% was obtained, the BS of the *Bacillus* ROSS2214 strain at a concentration of 40 mg/mL was a mortality of 16.60% was obtained and the

Table 1 In vitro evaluation of the biosurfactants produced by the *Bacillus* strains at different concentrations against the root-knot nematode *Nacobbus aberrans* (J2)

Strains	Concentration mg/mL	% Mortality
<i>Bacillus</i> ROSS2	30	39.29 ± 18.36 ^b
<i>Bacillus</i> ROSS4		34.06 ± 10.92 ^{bc}
<i>Bacillus</i> ROSS2214		25.83 ± 4.38 ^{cd}
<i>Bacillus</i> ROSS2	20	33.35 ± 12.27 ^{bc}
<i>Bacillus</i> ROSS4		30.16 ± 8.95 ^{bcd}
<i>Bacillus</i> ROSS2214		25.43 ± 5.46 ^{cd}
<i>Bacillus</i> ROSS2	10	20.08 ± 5.71 ^{cd}
<i>Bacillus</i> ROSS4		16.76 ± 8.01 ^d
<i>Bacillus</i> ROSS2214		16.66 ± 11.02 ^d
Water	---	2.54 ± 0.77 ^e
Nematrol plus	6	90.24 ± 6.72 ^a

$n = 4$. Average with different letters indicates that there are significant differences (Tukey, $P < 0.05$)

BS produced by the *Bacillus* ROSS4 strain at a concentration of 60 mg/mL a mortality of 33.25% was obtained.

Thin-layer chromatography characterization of biosurfactant produced by bacterial strains

TLC is a study method for the qualitative determination biochemical composition of BS. TLC analysis of BS extracted from cell free supernatants of the four bacterial strains cultured in medium with soybean oil 2 % as only carbon source is shown in Fig. 2, spots detected have the same mobility for a positive lipids detection [35, 36], no pink spots were detected when the TLC plate was treated with diphenylamine, indicating lack of carbohydrates.

In Table 3, reported data on R_f are calculated for each BS extracted. The R_f value from BS produced by bacterial strain 4 is similar to R_f values (0.18, 0.39) reported by Kuyukina et al. [37], indicating presence of neutral and polar lipids in the crude biosurfactants composition produced by

Table 2 In vitro evaluation of biosurfactants produced by *Bacillus* strains against the dust mite *T. putrescentiae*

Strains	Concentration (mg/mL)	% Mortality
<i>Bacillus</i> ROSS2	39	57.95 ± 7.25 ^a
<i>Bacillus</i> ROSS4	60	33.25 ± 23.50 ^{ab}
<i>Bacillus</i> ROSS2214	40	16.60 ± 16.16 ^b
Water	---	2.20 ± 4.40 ^b
Ivermectin	5	95.0 ± 10 ^a

$n = 4$. Average with different letters indicates that there are significant differences (Tukey, $P < 0.05$)

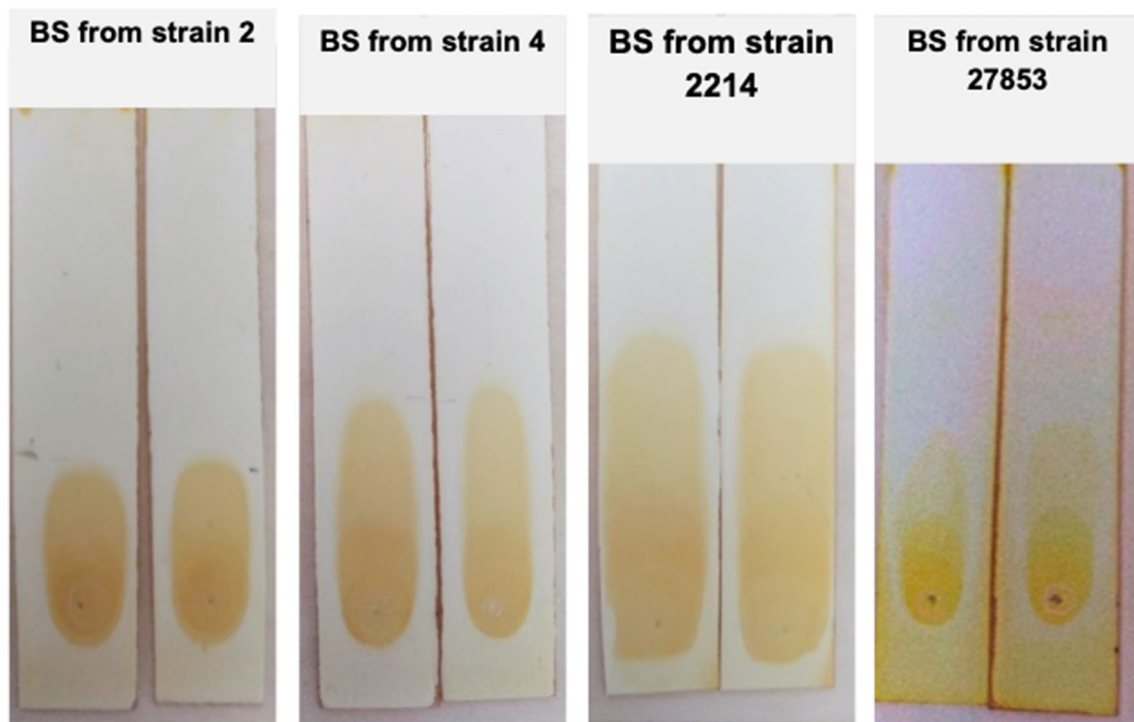


Fig. 2 TLC analysis of biosurfactants produced by *Bacillus* strains ROSS2, ROSS 4, ROSS 2214, and *P. aeruginosa* ATCC27853 as positive control

Rhodococcus ruber. The $R_f = 0.26$ correspond to di-rhamnolipid, while the $R_f = 0.47$ comes from phosphatidylethanolamines [38].

Biosurfactant characterization by GC-MS

The biosurfactants produced by the ROSS2, ROSS4, and ROSS2214 strains were extracted and analyzed by GC-MS. In Fig. 3, chromatograms of crude biosurfactant representative for each strain are presented. Two main signals with high abundance were detected at 7.6- and 10.4-min RT.

The isoform chemical of crude biosurfactants extracted from the cultures after 18 days of incubation is reported in Table 4, which revealed the presence of two metabolites having retention times at 10.4 and 7.5 min, molecular weight 220 and 193. The metabolite Methyl 4-(pyrrol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole-3-carboxylate, was found only in BS produced by bacterial strain ROSS2.

Discussion

In the present study, the nematocidal and acaricidal activity of BS produced by the *Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS2214 strains was evaluated. The strains were identified by 16S ribosomal gene sequence and are

related to *B. cereus* and *B. albus* species (Fig. 1). The BS produced by the strains are of a lipid nature, this can be established based on the results of the retardation factor (R_f) obtained in thin layer chromatography, this reference value corresponds to lipids, as reported by Ibrahim et al. [35]; Ismail et al. [36]. Tuleva et al. [39] reported the production of a BS by the *B. cereus* 28BN strain whose part of its structure contains a rhamnose. Durval et al. [40] also reported a BS of a lipopeptide chemical nature, produced by the *B. cereus* UCP1615 strain. The different biosurfactants that have been reported are mainly related to bioremediation processes.

Table 3 R_f calculated by thin layer chromatography (TLC) of the biosurfactants produced by the *Bacillus* strains

BS produced from bacterial strain	R_f
<i>Bacillus</i> ROSS2	0.29
<i>Bacillus</i> ROSS2	0.26
<i>Bacillus</i> ROSS4	0.36
<i>Bacillus</i> ROSS4	0.39
<i>Bacillus</i> ROSS2214	0.46
<i>Bacillus</i> ROSS2214	0.51
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0.45
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.42

Fig. 3 GC-MS chromatogram of the biosurfactants extracted from the three strains of *Bacillus*

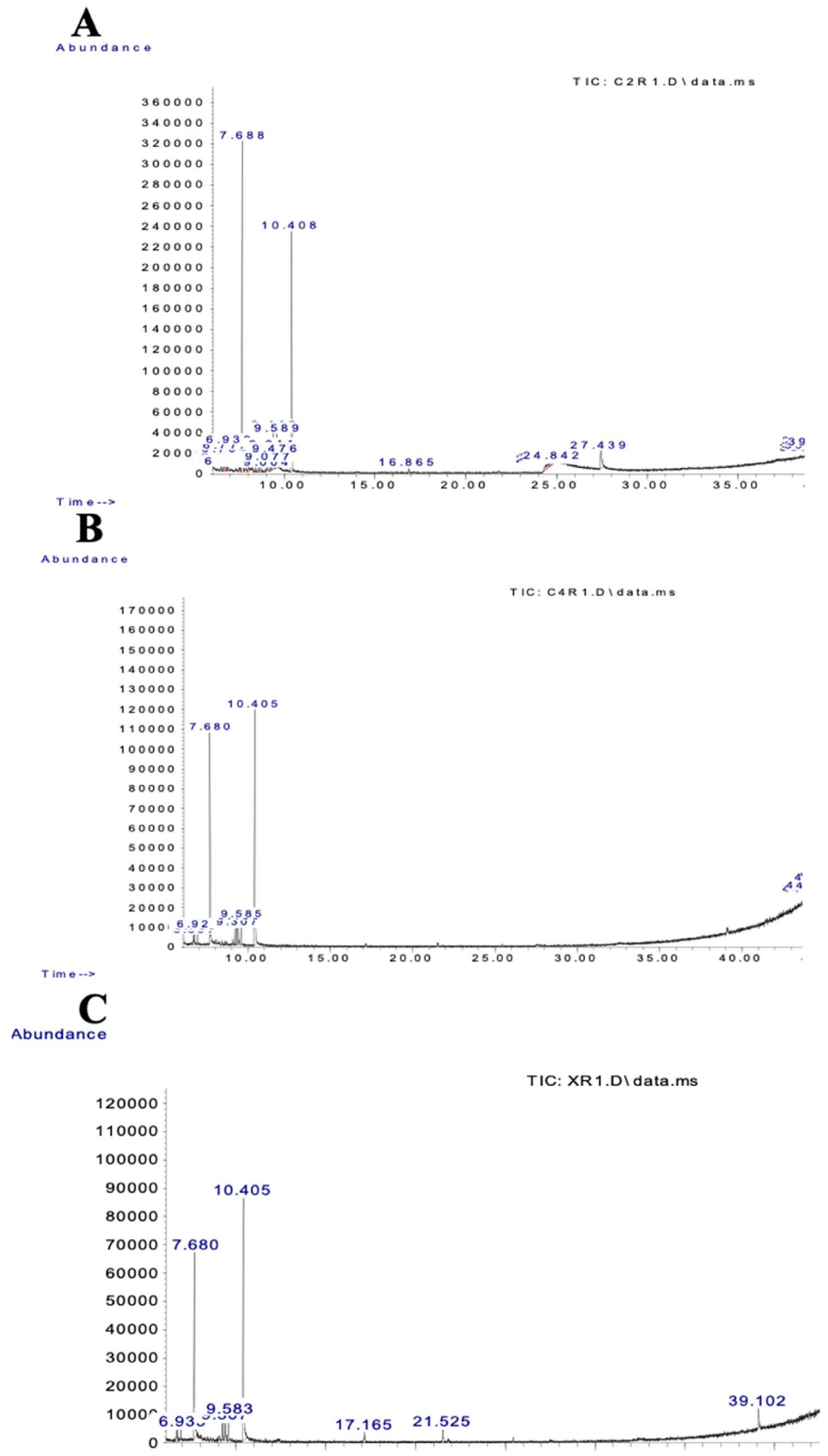


Table 4 Isoforms detected by GC-MS of crude biosurfactants extracted from bacterial strains ROSS2, ROSS4 and ROSS2214

Chemical name	RT (min)	MW	ROSS2	ROSS4	ROSS2214
4,7-Methano-1H-indene-2,6-dicarboxylic acid, 3a,4,7,7a-tetrahydro- ¹	7.68 and 10.4	220.074	Present	Present	Present
Methyl 4-(pyrrol-1-yl)-1,2,5-oxadiazole-3-carboxylate ¹	7.5	193.049	Present	Absent	Absent

¹National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 296887. Retrieved June 24, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/296887>

These metabolites have also been reported with antifungal and antibacterial, as an alternative against pathogens resistant to antibiotics and as well as in the protection of seeds against the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Fusarium verticillioides*. The mechanism used by biosurfactants for bactericidal activity is related to damaging the lipids of the cell membrane, which leads to the formation of pores. It has also been reported that they reduce bacterial growth in the exponential phase, affecting cell division [41–43].

The strains of *Bacillus* ROSS2, *Bacillus* ROSS4, and *Bacillus* ROSS2214 presented nematocidal activity against *N. aberrans* (J2), it is worth mentioning that this is the first report of BS with nematocidal activity against this species of false root-knot nematode. A similar effect of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* HussainT-AMU was reported by Hussain et al. [22] where 90% mortality of *M. incognita* J2 was obtained at 24 h, as well as a decrease in the number of galls in the roots of tomato plants. Similar effects have been reported from biosurfactants in organisms other than nematodes. In another study conducted by Fazaeli et al. [20], it was reported that the BS produced by *Staphylococcus epidermidis* presented mortality of 63.3% against larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*; the same effect was observed with ochrosin BS produced by the strain *Ochrobactrum* sp. BS-206 against *T. castaneum*, *Callosobruchus chinensis*, and *Sitophilus oryzae* was reported by Kumar et al. [44]. Franco et al. [21], also reported the production of a BS of a glycolipid nature with activity against larvae of the *A. aegypti* mosquito. Meanwhile, Geetha et al. [45] tested “surfactin” produced by *B. subtilis* against pupae of the *Anopheles stephensi* mosquito, as well as against *Culex quinquefasciatus* larvae.

As the different activities of BS against other pests have been mentioned, it had not been reported against plant pathogenic nematodes, for this reason it is important to highlight that the present investigation represents the first study on the notification of BS with activity against the false root-knot nematode *N. aberrans*, which represents an important alternative for sustainable control.

Another activity that was detected in the BS produced by these strains of the *Bacillus* genus is against mites. There is a report of this activity in the patent called

composition comprising recombinant *Bacillus* cells and lipopeptide [46]. The BS produced by *Bacillus* strains are lipopeptidic in nature and are not of high molecular weight. However, the chemical structure of the GC-MS analysis identifies the majority presence of polar portions, indicated by the dicarboxylic acid and carboxylate groups; while the non-polar portion can be interpreted as a hydrocarbon chain of variable length. With these GC-MS data we can say that possibly the biosurfactant produced by these strains of the *Bacillus* genus is a neutral or polar lipopeptide. Lipopeptides are biosurfactants with strong biocontrol properties with potential in agriculture, since they inhibit a wide range of fungal plant pathogens [47].

The best-known BS produced by species of the *Bacillus* genus are lipopeptides such as surfactin, Iturin, krustakin, lichenysin, bacillomycin, and fengycin [47]. According to Nawazish et al. [48], low-cost substrates or carbon sources are used for the production of lipopeptides, such as vegetable oils and agro-industrial residues. This study notifies the first report of BS with nematocidal activity against the nematode *N. aberrans*, for this reason BS represent a sustainable control alternative against pests of agricultural importance at the national and global levels.

Conclusion

The BS produced by the *Bacillus* ROSS2 strains presented a nematocidal effect against *N. aberrans* (J2), at a concentration of 30 mg/mL. The same strain also had acaricidal activity against *T. putrescentiae*. The nematocidal and acaricidal activity of this strain may be related to the production of biosurfactants. The use of this bacterial strain has potential in sustainable management for the biocontrol of the false root-knot nematode *N. aberrans* and the mite *T. putrescentiae*.

Acknowledgements The authors thank M.C. Susan Yaracet Páez-León and IBT. Angelita Morales-Morales for assisting with the research. This study was partially financed by the Fiscal Resources Project of INIFAP with the number: 139335341.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Manzanilla LRH, Costilla MA, Doucet M, Inserra RN, Lehman PS, Cid del PV, Souza RM, Evans K (2002) The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149–227
- Méndez SEW, Sánchez CR, Folch MJL, Aguilar ML, Hernández VVM, Gómez RO, Villar LE, Wong VA (2020) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth promoting characteristics. *Arch Microbiol* <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>
- Hughes AM (1976) The mites of stored food and houses her majesty's stationery office, London, UK
- Colloff MJ (2009) Dust mite allergens. In *Dust mites*, Springer, Dordrecht, p 209
- Duek L, Kaufman G, Palevsky E, Berdicevsky I (2001) Mites in fungal cultures. *Mycoses* 44(9-10):390–394. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00684.x>
- Erban T, Klimov PB, Smrz J, Phillips TW, Nesvorna M, Kopecky J, Hubert J (2016) Populations of stored product mite *Tyrophagus putrescentiae* differ in their bacterial communities. *Front Microbiol* 12(7):1046. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01046>
- Erban T, Ledvinka O, Nesvorna M, Hubert J (2017) Experimental manipulation shows a greater influence of population than dietary perturbation on the microbiome of *Tyrophagus putrescentiae*. *Appl Environ Microbiol* 83(9):e00128–e00117. <https://doi.org/10.1128/AEM.00128-17>
- de Andrade TFN, de Souza AC, Simões LA, Ferreira Dos RGM, Souza KT, Schwan RF, Dias DR (2020) Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiol Res* 241:126571. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126571>
- Al-Assiuty BA, Nenaah GE, Ageba ME (2019) Chemical profile, characterization and acaricidal activity of essential oils of three plant species and their nanoemulsions against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Exp Appl Acarol* 79(3-4):359–376. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00432-x>
- Kaya D, Inceboz T, Kolatan E, Güneli E, Yilmaz O (2010) Comparison of efficacy of ivermectin and doramectin against mange mite (*Sarcoptes scabiei*) in naturally infested rabbits in Turkey. *Vet Ital* 46(1):51–56
- Tak JH, Kim HK, Lee SH, Ahn YJ (2006) Acaricidal activities of paeonol and benzoic acid from *Paeonia suffruticosa* root bark and monoterpenoids against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Pest Manag Sci* 62(6):551–557. <https://doi.org/10.1002/ps.1212>
- Marcelino PRF, Gonçalves F, Jimenez IM, Carneiro BC, Santos BB, da Silva SS (2020) Sustainable production of biosurfactants and their applications. In: Ingle AP, Chandel AK, da Silva SS (eds) *Lignocellulosic Biorefining Technologies*. John Wiley & Sons Ltd, Pondicherry, India, pp 159–184
- Varjani SJ, Upasani VN (2017) Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour Technol* 232:389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Kubicki S, Bollinger A, Katzke N, Jaeger KE, Loeschke A, Thies S (2019) Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Mar Drugs* 17:1–30. <https://doi.org/10.3390/md17070408>
- Varjani SJ, Upasani VN (2019) Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour Technol* 288:121577. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121577>
- Markandev AR, Patel D, Varjani S (2021) A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresour Technol* 330:124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
- D'aes J, De Maeyer K, Pauwelyn E, Höfte M (2010) Biosurfactants in plant–*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ Microbiol Rep* 2(3):359–372
- Adnan M, Siddiqui AJ, Hamadou WS, Ashraf SA, Hassan MI, Snoussi M, Patel M (2021) Functional and structural characterization of *Pediococcus pentosaceus* derived biosurfactant and its biomedical potential against bacterial adhesion, quorum sensing, and biofilm formation. *Antibiot* 10(11):1371
- Patel M, Siddiqui AJ, Hamadou WS, Surti M, Awadelkareem AM, Ashraf SA, Adnan M (2021) Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties. *Antibiot* 10(12):1546
- Fazaeli N, Bahador N, Hesami S (2021) A study on larvicidal activity and phylogenetic analysis of *Staphylococcus epidermidis* as a biosurfactant-producing bacterium. *Pol J Environ Stud* 30(5):4511–4519. <https://doi.org/10.15244/pjoes/132807>
- Franco MPR, da Silva VL, Rodrigues PR, Von Zuben CJ, Contiero J, dos Santos JC (2017) Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. *PLoS One* 12(11):e0187125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187125>
- Hussain T, Haris M, Shakeel A (2020) Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root Galling caused by *Meloidogyne incognita*. *Vegetos* 33:229–238. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00099-5>
- Kim SK, Kim YC, Lee S, Kim JC, Yun MY, Kim IS (2011) Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). *J Agric Food Chem* 59(3):934–938. <https://doi.org/10.1021/jf104027x>
- Vrain TC (1997) A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inoculate. *J Nematol* 9:249–251. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.006>
- Villar LE, Reyes TB, Rojas MR, Gómez RO, Hernández AA, Zavaleta ME (2009) Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM.334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143–155
- Aguilar ML, Quintero MMT, De Gives PM, López AME, Liébrano HE, Torres HG, Del Prado IC (2014) Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Aracnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacteria feeding nematodes. *J Helminthol* 88(1):20–23
- De Lara R, Castro T, Castro J, Castro G (2007) Nematode culture of *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) with *Spirulina* sp., enriched oatmeal. *Rev Biol Mar Oceanogr* 42:29–36
- Weisburg GW, Barns MS, Pelletier AD, Lane JD (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–603
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27(2):221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Santos DK, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Salgueiro AA, Sarubbo LA (2013) Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *J Pet Sci Eng* 105:43–50
- Silva EJ, NMPR ES, Rufino RD, Luna JM, Silva RO, Sarubbo LA (2014) Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces* 117:36–41

32. Hahn MH, De Mio LLM, Kuhn OJ, Duarte HDSS (2019) Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. *Biol Control* 138:104024
33. Pineda AJA, Sánchez VJE, Gonzalez CM, Zamilpa A, López AME, Cuevas PEJ, Aguilar ML (2017) The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Med Food* 20(12):1184–1192
34. R Core Team (2021) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed 27 May 2022
35. Ibrahim ML, Ijah UJJ, Manga SB, Bilbis LS, Umar S (2013) Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Int Biodeter Biodegr* 81:28–34
36. Ismail W, Al-Rowaihi IS, Al-Humam AA, Hamza RY, El Nayal AM (2013) Bououdina, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. *Int Biodeter Biodegr* 84:168–178
37. Kuyukina MS, Ivshina IB, Philp JC, Christofi N, Dunbar SA, Ritchkova MI (2001) Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J Microbiol Methods* 46(2):149–156
38. Janek T, Łukaszewicz M, Krasowska A (2013) Identification and characterization of biosurfactants produced by the arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf B Biointerfaces* 110:379–386
39. Tuleva B, Christova N, Jordanov B, Nikolova-Damyanova B, Petrov P (2005) Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Z Naturforsch C J Biosci* 60(7-8):577–582. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-7-811>
40. Durval IJB, Mendonça AHR, Rocha IV, Luna JM, Rufino RD, Converti A, Sarubbo LA (2020) Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Mar Pollut Bull* 157:111357. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>
41. Bhawsar SD, Path SD, Chopade BA (2011) Antimicrobial activity of purified emulsifier of acinetobacter purified genospecies isolated from rhizosphere of wheat. *Agric Sci Dig* 31:239–246
42. Naughton PJ, Marchant R, Naughton V, Banat IM (2019) Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J Appl Microbiol* 127:12–28. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>
43. Shaikh S, Yadav N, Markande AR (2020) Interactive potential of *Pseudomonas* species with plants. *J Appl Biol Biotechnol* 8:101–111. <https://doi.org/10.7324/jabb.2020.80616>
44. Kumar A, Singh SK, Kant C, Verma H, Kumar D, Singh PP, Modi A, Droby S, Kesawat MS, Alavilli H (2021) Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants* 10:1472. <https://doi.org/10.3390/antiox10091472>
45. Geetha I, Manonmani AM (2010) Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. *Lett Appl Microbiol* 4:406–412. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02912.x>
46. Curtis D Thompson B (2016) Compositions comprising recombinant *Bacillus* cells and another biological control agent. International application published under the patent cooperation treaty (PCT) WO2016044529-A1.
47. Płaza G, Chojniak J, Rudnicka K, Paraszkiwicz K, Bernat P (2015) Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *J Appl Microbiol* 119(4):1023–1034. <https://doi.org/10.1111/jam.12893>
48. Nawazish A, Zhengjun P, Fenghuan W, Baocai X, Hesham R, El-S (2022) Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* spp.: types, production, biological activities, and applications in food. *J Food Qual.* <https://doi.org/10.1155/2022/3930112>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.