
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y
ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE BIOSURFACTANTES POR
CEPAS DE *Serratia marcescens*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

NASHBLY SARELA ROSAS GALVÁN

ASESOR: DRA. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CO-ASESOR: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. Ma. Del Refugio Trejo Hernández, esta investigación ha sido financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 218502 y con apoyo del proyecto: Fondo SENER-CONACYT Hidrocarburos Proyecto Número 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

COMITÉ TUTORAL:

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB-UAEM)

Director de Tesis

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB- UAEM)

Dra. Laura Álvarez Berber (CIQ-UAEM)

Mtra. Silvia Marquina Bahena (CIQ-UAEM)

Dr. Manases Gonzales Cortazar (CIBIS-IMSS)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM, CO-DIRECTOR)

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB)

Dr. Renato León Rodríguez (IIB-UNAM)

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento en el seno científico es para la Dra. Mary Trejo y el Dr, Fernando Martínez quienes por segunda ocasión decidieron aceptarme al doctorado, gracias por brindarme todo el conocimiento científico, su apoyo personal y sobre todo por haberme tenido toda la paciencia del mundo.

Mi agradecimiento va dirigido a los integrantes de mi comité tutorial con quienes trabaje de manera directa, gracias por compartir sus experiencias proyectadas en este trabajo, al Dr. Leobardo Serrano C. por el apoyo en el área estadística y las instalaciones a su cargo, al Mtro. Raunel Tinoco, de quien sin su ayuda la parte de diseños estadísticos no hubiera podido ser bien entendida. Al Dr, Renato León, a Doña José Guzmán, a los administrativos del CEIB como la Biol. Fernanda por tantas molestias, a Victor Martínez, a Ing. Jezer por dar sus vueltas, y a todos quienes han sido implicados en este trabajo.

Un agradecimiento se vuelve realidad cuando todo se alinea a favor de un objetivo cumplido. Es complicado traer a la mente todas aquellas personas quienes estuvieron involucradas de manera directa e indirecta en esta travesía, a todos aquellos a quienes conocí gracias a diversos trabajos e investigaciones a lo largo de casi 7 años gracias, muchas gracias. Algunos vienen a mi mente pero no quiero dejar a ninguno fuera.

En orden de agradecimientos y dedicatorias y no menos importante iniciaré con mi familia, quienes han estado allí apoyándome en toda decisión y proyecto sin reproche alguno y en algunos momentos con ciertos sacrificios, gracias por no desistir y creer en mí hasta el último momento, gracias a Dios por permitirme vivir estos momentos con mi núcleo familiar y aquí inician los nombres: Nashbly, Hirvin, mis Papas por su gran apoyo incondicional, en las buenas y en las malas, a mis hermanos y toda mi familia quienes han estado al pendiente de este momento en toda ocasión. A los amigos que he hecho en Cuerna y en el laboratorio, desde los inicios al doctorado y quienes se fueron sumando: Verónica Teymennet (Veruka), Nidya Curiel (Shotis), Brandt Bertrand (Braneishon), Ariana, Viry, Janet, Mony, Pilar, Lupita, Enrique, Rocío C, Dani, Liliana, Andrés y a todos a quienes en su momento les encargue alguna actividad, experimento relacionado a este proyecto. El orden es casi aleatorio, aclaro.



Con mucho amor y cariño para:

Nashbly Nayleth Díaz Rosas



ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

RESUMEN

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO I

1.1	Biosurfactantes.....	4
1.2	Concentración Micelar Crítica (CMC).....	5
1.3	Clasificación de Biosurfactantes.....	5
1.4	Propiedades de los Biosurfactantes.....	9
1.5	Factores que afectan la producción de Biosurfactantes.....	10
1.5.1	Fuente de Carbono.....	10
1.5.2	Fuente de Nitrógeno.....	11
1.6	Metabolismo Bacteriano.....	12
1.7	Rutas Metabólicas de Producción de Biosurfactantes.....	15
1.8	Sistema Quorum Sensing.....	17
1.9	Aplicación Potencial de los Biosurfactantes.....	19
1.10	Biodegradación.....	20

CAPITULO II

2.1	ANTECEDENTES.....	23
2.1.1	<i>Serratia marcescens</i>	23
2.1.2	Biosíntesis de Biosurfactantes en <i>Serratia marcescens</i>	24
2.2	ANTECEDENTES DIRECTOS.....	26

CAPITULO III

3.1	HIPÓTESIS.....	30
3.2	OBJETIVO GENERAL.....	30
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30

CAPITULO IV

4.1	ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	32
-----	------------------------------	----

CAPITULO V

5.1	ANTECEDENTES.....	34
5.1.1	Evaluación del efecto del medio de cultivo en la producción de Bs, caracterización y medición de la actividad Bs.....	34
5.1.1.1	Las herramientas estadísticas permiten incrementar la producción de Bs.....	34
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.2.1	Cepas Bacterianas.....	36
5.2.1	Medios de Cultivo para la producción de Bs.....	36
5.2.3	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SM3 y SMRG-5.....	36
5.2.4	Efecto del medio de cultivo en la producción de Bs por las cepas SM3 y mutante química SMRG-5.....	37
5.2.5	Actividad Biosurfactante.....	38
5.2.5.1	Medición de la reducción de la Tensión Superficial.....	38
5.2.5.2	Índice de Emulsión (IE ₂₄).....	39
5.2.5.3	Ensayo de Locomoción en "Swarming".....	39

5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.3.1	Producción de Bs por cepas de <i>S. marcescens</i> SM3 y mutante química SMRG-5, mediante diseños experimentales estadísticos.....	39
5.3.2	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SM3 en glucosa como fuente de carbono.....	40
5.3.2.1	Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ⁴ en glucosa	42
5.3.2.2	Análisis de varianza (ANOVA) del índice de emulsión (IE ₂₄) de SM3 en el diseño factorial 2 ⁴ en glucosa.....	48
5.3.3	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SMRG-5 en glucosa..	50
5.3.3.1	Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ⁴ en glucosa.....	52
5.3.3.2	Análisis de varianza (ANOVA<) del índice de emulsión (IE ₂₄) de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ⁴ en glucosa.....	56
5.3.4	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs, en el diseño factorial 2 ³ por la cepa SMRG-5 en glucosa.....	59
5.3.4.1	Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ³ en glucosa.....	61
5.3.4.2	Análisis de varianza (ANOVA) del IE ₂₄ en el diseño factorial 2 ³	63
5.3.5	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SM3 en glicerol.....	66
5.3.5.1	Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol.....	68
5.3.5.2	Análisis de varianza (ANOVA) del IE ₂₄ en el diseño factorial 2 ³ cepa SM3 en glicerol..	71
5.3.6	Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SMRG-5 en glicerol..	75
5.3.6.1	Análisis de varianza (ANOVA) de la TS en el diseño factorial 2 ³ , SMRG-5 en glicerol..	77
5.3.6.2	Análisis de varianza (ANOVA) del IE ₂₄ en el diseño factorial 2 ³ en glicerol (como fuente de carbono) cepa SMRG-5.....	80
5.3.7	Medición de la actividad Bs a las cepas SM3 y SMRG-5 por el método de la placa (Whilhelmy).....	84
5.3.7.1	Diseño factorial 2 ³ , medición de la TS en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy).....	84
5.3.7.2	Diseño factorial 2 ³ , medición del IE ₂₄ en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy)..	88
5.3.7.3	Diseño factorial 2 ³ , medición de la TS y análisis de varianza (ANOVA) en la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilheylmy).....	91
5.3.7.4	Diseño factorial 2 ³ , medición del IE ₂₄ y análisis de varianza (ANOVA), cepa SMRG-5, en glicerol método de la placa (Whilhelmy).....	95
5.3.8	Ensayos de locomoción en “Swarming” a las cepas SM3 y SMRG-5.....	99
5.3.9	CONCLUSIONES.....	100

CAPITULO VI

6.1	ANTECEDENTES.....	103
6.1.1	Caracterización de Bs producidos por las cepas SM3 y SMRG-5.....	103
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
6.2.1	Extracción de Bs de la cepa mutante SMRG-5.....	104
6.2.1.1	Sistema de extracción de Biosurfactante I.....	104
6.2.1.2	Sistema de extracción de Biosurfactante II.....	105
6.2.2	Caracterización del Biosurfactante.....	105
6.2.2.1	Gel Desnaturalizante de proteínas al 12% (SDS-PAGE).....	105
6.2.2.2	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de las cepas SM3 y SMRG-5.....	105
6.2.2.3	Sistema de solventes de las cepas SM3 y SMRG-5.....	106

6.2.2.4	Caracterización del extracto por cromatografía de HPLC.....	106
6.2.3	Ensayo de biodegradación	107
6.2.4	Ensayo de actividad hemolítica.....	107
6.2.5	Producción de Biosurfactante a escala fermentador de la cepa SM3.....	108
6.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
6.3.1	Etapa I. Producción de Bs de la cepa SM3 a escala reactor.....	109
6.3.2	Producción de Bs de la cepa SMRG-5 a escala reactor.....	111
6.3.3	Etapa II. Extracción de Bs por diferentes sistemas de solvente.....	112
6.3.3.1	Extracción de Bs de la cepa SM3.....	112
6.3.3.2	Extracción de Bs de la cepa SMRG-5.....	114
6.3.4	Perfil proteico a los extractos crudos de Bs de las cepas SM3 y SMRG-5.....	115
6.3.5	Etapa III. Caracterización del Bs de las cepas de <i>S. marcescens</i> SM3 y SMRG-5.....	116
6.3.5.1	Perfil Cromatográfico de los extractos crudos concentrados de la cepa SM3.....	116
6.3.5.2	Perfil Cromatográfico de los extractos crudos concentrados de la cepa SMRG-5.....	117
6.3.5.3	Perfil Cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 y un Bs comercial BDMO50.....	118
6.3.6	Concentración Micelar Crítica de los extractos crudos concentrados de la cepa SM3 y SMRG-5.....	121
6.3.7	ETAPA II. Caracterización del Bs a las cepas SM3 y SMRG-5.....	124
6.3.7.1	Determinación de la actividad hemolítica a los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 de <i>S. marcescens</i>	124
6.3.8	Cromatografía de Gases Acoplado a Masas a los extractos crudos concentrados de la cepa SM3 y SMRG-5.....	125
6.3.9	Remoción de Benzo [α] Pireno (BaP).....	127
6.3.10	Identificación molecular y polifásica de las cepas de <i>S. marcescens</i>	128
6.3.11	Secuenciación del genoma de cepas de <i>S. marcescens</i> SM3, SMRG-5, SMRG-4 y SMRG-3.....	129
6.3.12	Mutagénesis por Transposon mini-Tn5 de la cepa SM3.....	134
6.4	CONCLUSIONES.....	135
CAPITULO VII		
7.1	CONCLUSIONES FINALES.....	138
CAPITULO VIII		
8.1	BIBLIOGRAFÍA.....	140

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

1	Regiones en las cuales ocurre el ensamble de moléculas de Bs.....	5
2	Degradación de Glicerol en diversos productos metabólicos finales.....	14
3	Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs, carbohidratos empleados como sustrato.....	16
4	Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs empleando hidrocarburos como sustratos.....	17
5	Biosíntesis de Serrawetina W1 dependiente de las NRPSs.....	25
6	Caracterización de las cepas SM3 y SMRG-5 con respecto a la producción de biosurfactante.....	26
7	Ensayo de locomoción en swarming de las cepas SM3 y SMRG-5 de <i>Serratia marcescens</i> y como control negativo <i>E. coli</i> DH5 α	27
8	Electroforesis en gel del producto de PCR del gen <i>pswP</i> en la cepa SM3 y mutantes químicas.	27
9	Método de placa de Wilhelmy.....	38
10	Cinéticas de crecimientos de los 19 tratamientos evaluados para la producción de Bs en la cepa SM3 con glucosa en un diseño factorial 2 ⁴	40
11	Valores Reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ⁴ en glucosa	45
12	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3.	46
13	Cambio de Tensión Superficial con respecto al tiempo. Tratamientos 1 y 5.....	47
14	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el índice de emulsión (IE ₂₄) de la cepa SM3.....	49
15	Cinéticas de crecimientos de los 19 tratamientos evaluados para la producción de Bs en la cepa SMRG-5 con glucosa en un diseño factorial 2 ⁴	50
16	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5.	56
17	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE ₂₄ de la cepa SMRG-5.....	59
18	Cinéticas de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en la producción de Bs con glucosa en un diseño factorial 2 ³	60

19	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la TS en la cepa SMRG-5 en glucosa.....	63
20	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE ₂₄ en la cepa SMRG-5 en glucosa.	66
21	Cinéticas de crecimientos de los 11 tratamientos evaluados en la producción de Bs con glicerol en un diseño factorial 2 ³	67
22	Valores Reales y predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol.....	70
23	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3 en glicerol.	71
24	Valores Reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol.....	73
25	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el índice de IE ₂₄ en la cepa SM3 en glicerol.....	74
26	Perfil fisiológico de las cinéticas de crecimiento evaluado a los 11 medios de cultivo de la cepa SM3 en glicerol.....	74
27	Cinética de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados mediante el diseño factorial 2 ³ de la cepa mutante SMRG-5 en glicerol.....	76
28	Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol.....	79
29	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5.....	80
30	Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol con respecto al IE ₂₄	83
31	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE ₂₄ de la cepa SMRG-5.....	83
32	Valores reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ³ , en glicerol, Método de la placa (Whilhelmy).....	87
33	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy).....	87
34	Valores Reales y predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol con respecto al IE ₂₄ .Metodo de la placa (Whilhelmy).....	90
35	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE ₂₄ cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy).....	91
36	Valores reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol, método de la placa (Whilhelmy).....	94
37	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy).....	95

38	Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2 ³ en glicerol, con respecto al IE ₂₄ . Método de la placa (Whilhelmy).....	98
39	Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE ₂₄ de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy).....	98
40	Locomoción en Swarming de las cepas: a) SM3, b) SMRG-5 en medio LB.....	99
41	Locomoción en Swarming de las cepas a) SM3 y b) SMRG-5 en glicerol.....	100
42	Estructura química de la prodigiosina MAP y MBC. El Bs Serrawetina W1 es una dilactona compuesta de ácido D-3-hidroxidecanoico y L-Serina.....	104
43	Cinética de crecimiento de la cepa SM3 a escala reactor con volumen final 2L; 150 rpm, 27±2°C en Glicerol como fuente de carbono.....	110
44	Cinética de crecimiento de la cepa SMRG-5 a escala reactor 2L.....	112
45	Cromatografía en capa fina de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 de <i>S. marcescens</i>	113
46	Sistema de extracción de Bs de la cepa SMRG-5.....	114
47	Extracto concentrado de la cepa SMRG-5.....	115
48	Gel desnaturalizante de proteínas SDS-PAGE al 12.....	116
49	Perfil Cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SM3 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa.....	116
50	Perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado seco de la cepa SMRG-5 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa:	117
51	Perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa: Acetonitrilo- Agua (gradiente).....	118
52	Perfil cromatográfico y espectros de la cepa SMRG-5.....	119
53	Perfil cromatográfico de un Bs comercial BDM 050y 10% de glicerol. En un sistema de solvente orgánico: acetonitrilo – agua (gradiente) y su espectro.....	120
54	Perfil cromatográfico de un biosurfactante comercial BDM 050 en 70% de metanol. En un sistema de solvente orgánico: acetonitrilo – agua (gradiente).....	120
55	Perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado y seco de las cepas SM3 y SMRG-5 y un Bs comercial.....	121
56	Concentración Micelar Crítica de surfactantes sintéticos.....	122
57	Concentración Micelar Crítica, TS contra Bs crudo concentrado de las cepas SM3, SMRG-5.....	123

58	Ensayo de actividad hemolítica a los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5.	124
59	Espectros de Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG-EMS) de la fracción 3 de Bs en: a) cepa SM3 y b) cepa SMRG-5.....	125
60	Cinética de Remoción de Benzo [α] Pireno por la SM3 y SMRG-5.Control concentración de BaP	127
61	Análisis filogenético de las cepas SM3 y SMRG-5 usando la secuencia parcial del gen <i>gyrB</i> y su relación con otras cepas reportadas <i>S. marcescens</i>	129



ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

1	Principales clases de Bs y microorganismos productores.....	6
2	Tipos de Bs y su importancia económica.....	8
3	Patentes de Biosurfactantes comerciales.....	20
4	Variables estudiadas y sus niveles en un diseño factorial 2^4	37
5	Variables estudiadas y sus niveles en un diseño factorial 2^3	37
6	Velocidad de crecimiento de los 19 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^4 en glucosa.....	41
7	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^4 de la cepa SM3 con glucosa	42
8	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2^4 , glucosa de SM3.....	43
9	Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS en el diseño factorial 2^4 , glucosa.....	44
10	Valores Reales vs Predichos en el diseño factorial 2^4	45
11	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^4 de la cepa SM3 con glucosa.....	47
12	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE_{24}	48
13	Velocidad de crecimiento en la cepa SMRG-5 en los 19 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^4 en glucosa.....	51
14	Resultados de reducción de la TS en el diseño factorial 2^4 de la cepa SMRG-5 en glucosa	52
15	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^4 , glucosa.....	53
16	Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la reducción de la TS en la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^4 , glucosa.....	54
17	Valores Reales vs Predichos en el diseño factorial 2^4 , cepa SMRG-5.....	55
18	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^4 de la cepa SMRG-5 con glucosa.....	57
19	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE_{24} en la cepa SMRG-5.....	58
20	Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^3 en glucosa.....	60
21	Análisis de varianza del modelo seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^3 en glucosa.....	61
22	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 con glucosa.....	62
23	Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto a la TS en glucosa cepa SMRG-5.....	62
24	Análisis de varianza (ANOVA) del modelo factorial seleccionado con respecto a IE_{24} en la cepa SMRG-5 con glucosa.....	64

25	Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto al IE_{24} cepa SMRG-5 en glucosa.....	65
26	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glucosa.....	65
27	Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^3 en glicerol.....	67
28	Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS en el diseño factorial 2^3 , glicerol (fuente de carbono).....	68
29	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3 con glicerol como fuente de carbono.....	69
30	Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto a la TS en glicerol cepa SM3.....	70
31	Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado con respecto al IE_{24}	72
32	Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto al IE_{24} cepa SM3 en glicerol.....	72
33	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3 con glicerol.....	73
34	Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^3 en glicerol cepa SMRG-5.....	76
35	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glicerol.....	77
36	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5.....	78
37	Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glicerol.....	79
38	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE_{24} de la cepa SMRG-5 en glicerol.....	81
39	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5, glicerol.....	82
40	Resultados del IE_{24} valores reales vs predichos, en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5, glicerol.....	82
41	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3 en glicerol, método de placa (Whilhelmy).....	85
42	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy).....	85
43	Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3, método de la placa.....	86
44	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE_{24} de la cepa SM3 en glicerol, método de la placa (Whilhelmy).....	88
45	Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3.....	89
46	Resultados del IE_{24} valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3, método de placa (Whilhelmy).....	90
47	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy).....	92
48	Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5.....	93

49	Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glicerol, método de placa (Whilhelmy).....	94
50	Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE_{24} de la cepa SMRG-5 en glicerol Método de la placa (Whilhelmy).....	96
51	Resultados del IE_{24} en el 62diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy).....	97
52	Resultados del IE_{24} valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5.	97
53	Sistema de gradiente empleado en la inyección de muestra de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5.....	106
54	Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs a escala reactor, cepa SM3.....	111
55	Sistema de extracción de Bs vs g/L de extracto crudo concentrado de la cepa SM3.....	113
56	Actividad Bs de los picos colectados por HPLC del extracto crudo concentrado de la cepa SM3.....	117
57	TS medida a cada fracción colectada a partir del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5.....	118
58	Características microbiológicas de las cepas SM3 y SMRG-5.....	128
59	Vías identificadas en el genoma de las cepas SM3, SMRG-3, SMRG-4 y SMRG-5.....	130
60	Reducción de la tensión superficial de las cepas mutantes obtenidas por transposón mini-Tn5.....	134



RESUMEN

La producción y caracterización de Biosurfactantes por cepas de *Serratia marcescens* SM3 (silvestre pigmentada) y su mutante isogénica SMRG-5, fue evaluada mediante herramientas estadísticas. Diseños factoriales 2^3 , permitieron evaluar el efecto que ejercen las fuentes de carbono y nitrógeno con respecto a la actividad Bs. La cepa silvestre SM3, secreta al medio un biosurfactante a bajas concentraciones de fuente de carbono (Glicerol) y nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). La reducción de la tensión superficial en esta cepa alcanzó las 26.5 ± 0.28 dinas/cm durante las primeras 72 h de cultivo, mientras que el índice de emulsión fue de $79.9 \pm 0.2\%$, durante la misma cinética. Bajo estas condiciones, la purificación y elucidación parcial de este agente tensoactivo permitió identificar su naturaleza.

A partir de los medios de cultivo favorables a la producción de Bs, se realizó la extracción de fueron usados para su extracción, caracterización, purificación y elucidación de estructura. El análisis de cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS) reveló la presencia de ácido hexadecanoico como fracción hidrofílica. Esta cepa es capaz de remover el hidrocarburo policíclico aromático benzo [a] pireno en un 59% durante el mismo periodo de tiempo donde se secreta el biosurfactante. A la par, la cepa mutante no pigmentada SMRG-5 fue analizada bajo las mismas condiciones. Contrario a la cepa silvestre, bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno fueron requeridas para incrementar la producción de Bs. La reducción de la tensión superficial en esta cepa fue de 25.2 ± 0.2 dinas/cm, con un índice de emulsión del $89.7 \pm 0.28\%$ en las primeras 72 h de fermentación. Estos resultados, permitieron caracterizar los Bs en esta cepa. Las fracciones purificadas de Bs fueron analizadas por CG-MS, la presencia de ácido octadecanoico en estas muestras permitieron distinguir la diferencia de la fracción hidrofóbica, con respecto a la cepa silvestre. La capacidad de remoción de B[a]P en esta cepa fue igual a la silvestre (59% durante las primeras 72 horas de cultivo). Cabe señalar la diferencia entre ambas cepas en cuanto a caracterización, actividad Bs y composición molecular, lo cual se atribuye al efecto de la mutación en la cepa isogénica y la posible ausencia del pigmento.


INTRODUCCIÓN GENERAL

En la era de la industrialización global, la exploración y explotación de recursos naturales ha servido como fuente de experimentación en el área de investigación y tecnología, dando paso a la manufacturación de productos con alto valor agregado en el mercado mundial como lo son los agentes activos de superficie, también denominados Biosurfactantes (Bs). Estos compuestos de superficie activa son un grupo de moléculas con diversas estructuras, producidas por una gran variedad de microorganismos. Sus propiedades tensoactivas les permiten ser utilizados en diversidad de aplicaciones industriales [1].


La producción de estas moléculas multifuncionales en el mercado mundial ha sido valuada en 1.7 billones de dólares hasta el año 2011 y se espera que este año 2018 alcance 2.2 billones de dólares, con base a la tasa de crecimiento anual equivalente al 3.5%. El volumen del mercado global de los Bs se espera supere 476,512 toneladas para este 2018, debido al incremento en la demanda en países como Asia, África y América Latina, quienes consumen el 21% de dicho mercado [2]

Entre las aplicaciones más interesantes en la industria se encuentra la cosmética, farmacéutica, biomédica, agroindustrial y petrolera, en esta última, involucra la biodegradación de hidrocarburos y la recuperación mejorada de petróleo con microorganismos o sus productos. La producción de estas moléculas depende de las condiciones de fermentación, factores ambientales y disponibilidad de nutrientes.

Estudios previos de producción de Biosurfactantes realizados a cepas aisladas de sitios impregnados con hidrocarburos de *Serratia marcescens*, demuestran la presencia de agentes tensoactivos [3]. Sin embargo, dicha producción puede ser incrementada con respecto a los diversos factores nutricionales. Por lo que en este trabajo se analizaron diferentes factores nutricionales que permitieron incrementar, caracterizar y purificar dichos compuestos, para determinar el tipo de estructura que presentan.



CAPÍTULO I



1.1 Biosurfactantes

Los principales Bs son moléculas de origen biológico de tipo aniónico donde la carga negativa, se la confiere un grupo sulfonato o sulfuro, de tipo no iónico que involucra productos de polimerización, los de origen catiónico se caracterizan por tener un grupo amonio cuaternario o sweteriones y poseen la característica de ser compuestos con doble carga. Los Bs son sustancias anfífilas, es decir; presentan una fracción polar hidrofílica donde se engloba a los ácidos, carbohidratos, péptidos cíclicos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, fosfatos o alcoholes. Poseen una cadena apolar hidrofóbica constituida de cadenas hidrocarbonadas saturadas o insaturadas de ácidos grasos. La masa molar de los Bs generalmente oscila entre los 500 a 15000 Da [4]. La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interfase agua-aceite o aire agua con diferente polaridad. Estas estructuras le confieren un amplio rango de propiedades, incluyendo la disponibilidad de disminuir la tensión superficial e interfacial de líquidos, formar micelas y macroemulsiones entre dos fases diferentes. Los Bs poseen propiedades emulsificantes, su principal papel fisiológico es el de permitir crecer a los microorganismos en sustratos inmiscibles en agua mediante la reducción de la tensión superficial de la interfase [5]. Los Bs son metabolitos secundarios producidos en su mayoría en fase estacionaria de crecimiento biológico [6,7]

Con base en estos criterios, un Bs es una molécula orgánica con propiedades surfactantes o tensoactivas producidas sobre superficies vivas, principalmente superficies de células microbianas o secretados al medio extracelular. Las propiedades y usos de los Bs provienen de dos fuentes fundamentales, la primera de su capacidad de adsorberse a las interfases y de otra parte su tendencia a asociarse para formar estructuras organizadas. Con respecto a la adsorción, el grupo polar es en general un grupo funcional que contiene heteroátomos (O, S, N, P) mientras que el grupo apolar es en la mayoría de los casos un hidrocarburo parafínico o alquil-aromático. La característica dual de una molécula de surfactante (polar-apolar) hace que ésta pueda orientarse en una superficie gas-líquido o en una interfase líquido-líquido.

La tensión es responsable de la curvatura de las interfases, de la formación de gotas, de un gran número de inestabilidades capilares y de numerosos fenómenos de estabilización. Las fuerzas capilares involucradas pueden ser considerables y en consecuencia generar diversos tipos de aplicaciones como la fabricación de adhesivos, recuperación mejorada de petróleo, la colocación de una monocapa protectora, la contracción de capas de petróleo flotando, etc. El descenso de la tensión favorece la deformación y ruptura de una interfase, la formación de sistemas dispersos como las emulsiones o espumas, la movilización del petróleo residual, limpieza industrial, etc.

1.2 Concentración Micelar Crítica (CMC)

Con respecto a la asociación de un surfactante en una solución (acuosa por ejemplo) se le añade cada vez más surfactante, este comienza a adsorberse a las interfases disponibles y su concentración en forma mono-molecular aumenta hasta que se forman las primeras micelas. Una micela es un polímero de asociación en el cual, un surfactante alcanza una posición favorable respecto a la fase en la que se encuentre. Cuando se forma una micela en solución acuosa del tensoactivo se comporta como un medio microheterogéneo, la formación de micelas y concentración de un surfactante se mide mediante la Concentración Micelar Crítica (CMC). La CMC es la cantidad mínima necesaria de moléculas de Bs requeridas para el ensamble de una micela (Figura 1).

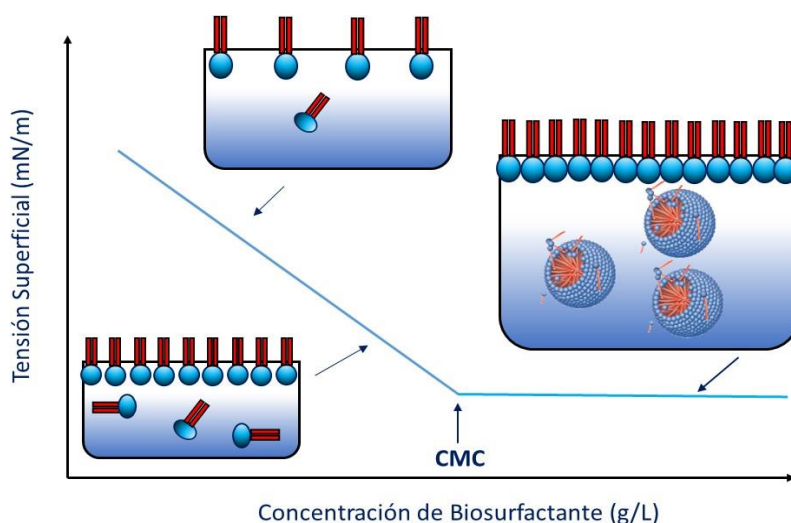


Figura 1. Relación entre Tensión Superficial y Concentración de un Bs (Concentración Micelar Crítica).

Los valores de CMC se determinan mediante cambios en las propiedades fisicoquímicas en solución en presencia de Bs; como un incremento de su concentración en el medio, una vez que es secretado a la fase acuosa el Bs, la reducción de la tensión superficial se mantiene constante [8].

1.3 Clasificación de Biosurfactantes

Las complejas moléculas que presentan los Bs, cubren un amplio rango de estructuras químicas y son clasificadas de acuerdo a la naturaleza de la carga o fracción polar individual. Diversos microorganismos secretan en algunos casos surfactantes que son combinaciones de estructuras; los Bs más reportados son los ramnolípidos, soforolípidos y trehalolípidos, estos exoproductos son una mezcla de α -L-ramnopiranosil α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y sus congéneros mono, di-ramnolípidos [9]. Los Bs han sido agrupadas en dos categorías; los de bajo peso

molecular, donde la mayor clase comprende a los glicolípidos (ramnolípidos, soforolípidos, lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos) [10], mientras que en la segunda categoría se encuentran los de alto peso molecular que engloba a los heteropolisacáridos, lipopolisacáridos polianiónicos que contienen tanto polisacáridos como proteínas; a estos se les llama comúnmente bioemulsificadores [11,12, 13]. El primer grupo incluye moléculas las cuales pueden reducir la tensión superficial e interfacial eficientemente, mientras que el último grupo son polímeros polifílicos y anfifílicos que usualmente son más efectivos estabilizando emulsiones de aceite en agua pero no reducen la tensión superficial [13]. Varios microorganismos son conocidos por producir Bs de tipo específico, esto depende principalmente de la composición molecular. En la tabla 1, se muestra la principal clasificación de Bs y los microorganismos específicos que lo producen.

Tabla 1. Principales clases de Bs y microorganismos productores

Clases de Biosurfactantes					
Glicolípidos	Bs poliméricos	Lipopeptidos	Acidos grasos	Bs particulados	Fosfolípidos
Microorganismos productores					
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					
<i>Alcanivorax borkumensis</i>					
<i>Arthrobacter paraffincus</i>					
<i>Arthrobacter sp</i>					
<i>Candida antartica</i>					
<i>Candida apicola</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
<i>Candida batistae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter sp</i>			
<i>Candida ishiwadae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Arthrobacter paraffineus</i>		
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Capnocytophaga sp</i>		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Corynebacterium</i>		
<i>Nocardia sp</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>	<i>Insidibasseosum</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>	<i>Cyanoobacteria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Halomonas eurihalina</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Nocardia erythropolis</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	<i>Penicillium spiculisporum</i>		
<i>Rhodotorula glutinus</i>	<i>Thermoautotrophium</i>	<i>Thiobacillus tiooxidans</i>	<i>Talaromyces trachyspermus</i>		
<i>Rhodotorula graminus</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>				
<i>Serratia marcescens</i>					
<i>Tsukamurella sp</i>					
<i>Ustilaga maydis</i>					

La producción de ramnolípidos a partir de especies de *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiada, siendo su aplicación una propuesta potencial como un fungicida en la agricultura, o como aditivos en el área de biorremediación. Así mismo, los trehalípidos son producidos por diversos microorganismos como *Mycobacterium*, *Nocardya* y *Corynebacterium*. Sin embargo, los más reportados en esta clase de Bs son las trehalosas dimicoladas producidas por *Rhodococcus erythropolis* [14]. Para el caso de los soforolípidos estos, son producidos principalmente por levaduras como *Candida bombicola* (también conocida como *Turolopsis bombícola*), *Centrolene petrophilum*, *Candida apícola* y *Rhodotorula bogoriensis*, estos glicolípidos tienen un carbohidrato dimérico de soforosa unido a cadenas de ácidos grasos a través de uniones glicosídicas [15,16]. Mientras que los

manosileritrolípidos son producidos por especies de levadura *Pseudozyma*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma antártica* y *Pseudozyma rugulosa* [17].

Los lipopéptidos cíclicos son producidos por un número de especies de *Bacillus* como moléculas antibióticas. Entre estos, el compuesto más importante es la surfactina producida por *Bacillus subtilis* por su alta actividad [11,18]. Una amplia variedad de microorganismos, incluyendo algunas *Archaea*, producen polímeros de alto peso molecular con actividad bioemulsionante, los cuales son sintetizados por especies de *Acinetobacter calcoaceticus*, siendo el primer compuesto estudiado el emulsan RAG-1 y se encuentra disponible comercialmente como un bioemulsificador de hidrocarburos en agua, empleándolo a bajas concentraciones entre 0.001% a 0.01% [19,20].

Diferentes bacterias y levaduras producen gran cantidad de ácidos grasos y Bs de tipo fosfolipídico durante su fermentación sobre sustratos como n-alcanos. Las vesículas ricas en fosfatidil etanolamina son producidas por especies de *Acinetobacter spp* dando paso a la formación de microemulsiones de alcanos en agua. Estos Bs son esenciales en aplicaciones médicas. La deficiencia del complejo de proteínas fosfolipídicas, es la principal causa de insuficiencia respiratoria en niños recién nacidos. Por lo que el aislamiento y clonación de genes ha sido una alternativa viable para la producción de Bs a gran escala [21,22].

La disimilitud de estructuras químicas, su naturaleza y cantidad depende del tipo de microorganismo productor, en la tabla 2 se representan algunos de los Bs de importancia económica, así como su aplicación.

Tabla 2. Tipos de Bs y su importancia económica

Biosurfactante	Microorganismo	Importancia Económica
Lípidos de celobiosa Serrawetina	<i>Ustilago maydis</i> <i>Serratia marcescens</i>	Compuestos antifúngicos Emulsificación de hidrocarburos
Poliolípidos Lípidos de trehalosa	<i>Rhodotorula glutinis</i> y <i>R. graminis</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> <i>sp</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Mycobacteriumsp</i>	Actividad anti-proliferativa Disolución de hidrocarburos
Lípidos de ornitina	<i>Pseudomonas sp</i> , <i>Thiobacillus</i> <i>thiooxidans</i> , <i>Agrobacterium sp.</i>	Bio-emulsificadores
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lipopéptidos activos de superficie
Ramrólpidos	<i>P. aeruginosa</i> <i>P.chlororaphis</i> <i>S.</i> <i>rubidea</i>	Bioremediación, antimicrobianos y propiedades de biocontrol
Lípido-Carbohidrato	<i>Debaryamyces polymorphus</i> <i>P.fluorescens</i>	Bioemulsificadores
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>	Bioemulsificadores
Diglicosil-diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bioremediación
Células completas	<i>Cyanobacteria</i>	Biofloculantes
Ácidos grasos/líp. Neutros	<i>Clavibacter michiganensis subsp</i> <i>insidiosus</i>	Bioemulsificadores
Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. antartica</i>	Antimicrobiológico, antiviral
Liposan	<i>Candida tropicalis</i>	Bioemulsan
Lip. Monosileritritol	<i>Kurtzmanomyces sp</i>	Compuestos antifúngicos
Surfactina/Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>	Propiedades antimicrobiológicas
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Propiedades antimicrobiológicas
Aminoácidos	<i>Bacillus sp</i>	Propiedades antimicrobiológicas
Lichenisina	<i>Bacillus licheniformi</i> , <i>B. subtilis</i>	Mejoramiento en la recuperación de aceites
Lípidos peptídicos	<i>Bacillus licheniformis</i>	Propiedades antimicrobiológicas
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter sp.</i>	Bioremediación
Vesículas & fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>P.</i> <i>maltophila</i>	Bioremediación
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Mejoramiento en la recuperación de aceites
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Biodegradación de compuestos poliaromáticos

Tomado de Saharan *et al.*, 2011

Microorganismos empleados en la industria e implementados en productos de desecho; han sido aislados de suelos contaminados, efluentes y aguas residuales. Por lo tanto, estos tienen la habilidad para crecer en sustratos considerados potencialmente nocivos para otros microorganismos no productores de Bs [23]. Debido a estas características, es necesario someter a diversos métodos de conservación a los Bs para evaluar la calidad y propiedades, ya sea calentamiento ó adición de sorbato de potasio, el cual es un conservador que inhibe el crecimiento, esto en el área de alimentos [24]. Así mismo, la eficiencia de un Bs es una característica esencial de un buen agente activo. Ésta, se mide con respecto a la CMC, una baja eficiencia está relacionada con la tensión interfacial. La CMC de un Bs tiene un rango entre 1 a 2000 mg/L, mientras que la tensión interfacial (aceite/agua) y superficial se encuentra entre 1 y 30 mN/m. Los Bs categorizados como buenos son capaz de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 24 mN/m y la tensión interfacial de n-hexadecano de 40 a 1 mN/m. La tolerancia a diferentes rangos de temperatura, concentración de sales por arriba del 10% o un 2% de NaCl es suficiente para inactivar surfactantes sintéticos [25]. Estas son algunas de las pruebas de eficiencia a las que son sometidas las moléculas de Bs.

1.4 Propiedades de los Biosurfactantes

Las propiedades únicas que poseen los Bs con respecto a su contra parte, los surfactantes de origen sintético es que pueden llegar a cubrir todas las necesidades de estos últimos en un gran número de operaciones industriales. Los surfactantes sintéticos son implementados en diversas áreas del sector industrial lo que trae consigo la generación de residuos altamente contaminantes y persistentes al ambiente, por lo que el potencial de aplicación de los Bs en la industria es una realidad debido a las ventajas que presentan en comparación con su contraparte los surfactantes químicos, algunas de estas ventajas son:

- **Biodegradables**

Los Bs son fácilmente degradados por microorganismos ya sea en agua o suelo, siendo compuestos viables en tratamiento de aguas o biorremediación ambiental.

- **Menos tóxicos**

El bajo grado de toxicidad permite a estas moléculas emplearlas en la industria de alimentos como aditivos funcionales, cosméticos y farmacéutica. Esta propiedad es fundamental para aplicación ambiental.

- **Biocompatibles**

La producción es a partir de materia prima barata, la fuente de carbono y nitrógeno empleada, sustratos insolubles como hidrocarburos, carbohidratos, aceites o residuos industriales le confiere a estas biomoléculas diversidad estructural, producción económica.

➤ Control Ambiental

Pueden ser eficientemente usados en el manejo industrial de emulsiones, control de derrames petroleros, la detoxificación de efluentes industriales y biorremediación de suelos contaminados.

La gran demanda del mercado de los surfactantes ha provocado un incremento en su producción por síntesis química y en consecuencia la generación de residuos altamente tóxicos y persistentes. Por otra parte, las necesidades de protección al medio ambiente promueven la producción de surfactantes biológicos económicamente sustentables que no conducen a la formación de residuos tóxicos siendo altamente biodegradables [26].

1.5 Factores que Afectan la Producción de los Bs.

La producción de estas moléculas multifuncionales puede ser espontánea o de manera inducida en presencia de compuestos lipofílicos, variaciones en el pH, temperatura, aireación, velocidad de agitación, o cuando el crecimiento celular se encuentra bajo condiciones de estrés, así como la baja concentración de nitrógeno. Los factores fisicoquímicos son indispensables en la evaluación de dicha producción [27].

1.5.1 Fuente de Carbono

La fuente de carbono juega un papel sumamente importante en el crecimiento y producción de Bs a partir de cada microorganismo y especialmente entre especies o cepas. Se han reportado bajos rendimientos en cuanto a la producción de Bs, a partir de una misma cepa de *Turolopsis bombicola* empleando glucosa o aceite vegetal. Sin embargo, el emplear ambas fuentes en conjunto incrementa dicha producción [28]. Especies de levaduras como *Candida bombicola* han sido suplementadas con dos fuentes de carbono diferentes como lo es azúcar y aceite incrementando la producción de Bs en un periodo de una semana [29]. Diversas especies de *Pseudomonas* ampliamente reportadas han sido caracterizadas por utilizar diversas fuentes de carbono para la producción de Bs como: glicerol, aceites vegetales, glucosa o n-alcanos con gran potencial e influencia [30]. Células en reposo de *Pseudozyma (C. antártica)* han convertido n-alcanos de C12 A C18 en lípidos de manosileritol (MEL); registrando un rendimiento de 140 g/L después de un mes de fermentación y el Bs secretado es capaz de emulsificar el aceite de soya [31]. Por lo que un cambio en la constitución de ácidos grasos de un Bs final ocurre cuando la composición de los ácidos grasos es alterada durante la fermentación en un medio que contiene *C. ingens* [32]. El uso de sustratos renovables para procesos biotecnológicos es una propuesta alternativa para una economía viable, en cuanto a costos y

producción en conjunto con el uso de productos agroindustriales. Diferentes sustratos provenientes de residuos han sido empleados como fuentes de carbono para la producción de Bs, alguna de estas son: ácidos grasos provenientes de aceite de soya, residuos de refinerías, glicerinas a partir de residuos de biodiesel, residuos de refinerías productoras de aceite de girasol, glucosa, glicerol, queroseno, etc.[33].

1.5.2 Fuente de Nitrógeno

Este segundo suplemento con naturaleza no menos importante ha sido pieza fundamental en los procesos fermentativos. La relación C/N afecta la generación de metabolitos. Altos niveles de concentración de C y N bajos niveles de nitrógeno limitan el crecimiento bacteriano, favoreciendo el metabolismo celular en conjunto con la producción de metabolitos. En contraste, el exceso de nitrógeno conlleva a la síntesis de material celular y limita la generación de productos [34]. Diversas fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas han sido empleadas para la producción de Bs en cepas de *P. aeruginosa*, donde el NaNO_3 proporciona mayor efectividad que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, las condiciones limitantes nutricionales dirigen el metabolismo celular a la formación de productos, Los nitratos, amonio y aminoácidos han sido empleados como fuentes de nitrógeno importantes en el incremento y eficiencia de los Bs [35]. Los nitratos son los primeros en reducirse a nitritos dando paso a la formación de amonio. El amonio es asimilado por la glutamato deshidrogenasa dando paso a la formación de glutamato o glutamina sintetasa para formar glutamina. La glutamina y el α -cetoglutarato son convertidos a L-glutamina por la 2-oxoglutarato aminotransferasa. Sin embargo, la formación de lípidos en lugar de azúcares, es el factor determinante en la biosíntesis de ramnolípidos y la limitación de nitrógeno permite la acumulación de lípidos. En comparación al amonio, la asimilación de nitrato es más lenta y simula la limitación de nitrógeno, lo cual es favorable a la producción de Bs de tipo ramnolipídico. Extracto de levadura ha sido usado como fuente de nitrógeno para la producción de lípidos de soforosa en *T bombicola* y *C bombicola* [36].

Uno de los grandes retos a resolver en esta área, es disminuir los costos de producción a gran escala. Este problema se puede solucionar a partir del acoplamiento de procesos como la utilización de sustratos económicos, Por otro lado, la dificultad para obtener Bs puros ha sido un problema de suma importancia a resolver en el área de alimentos, farmacéutica e industria cosmética. Así mismo, las cepas productoras de estos compuestos, presentan una baja productividad, su regulación y biosíntesis ha sido deliberada en algunas cepas. La producción de estos metabolitos secundarios inicia cuando el cultivo está bajo condiciones de estrés debido a los nutrientes limitantes. Este

fenómeno esta correlacionado con la baja velocidad de crecimiento del cultivo, trayendo consigo cambios morfológicos implicados en esta fase.

1.6 Metabolismo bacteriano

El conocimiento de la fisiología y del metabolismo bacteriano permite conocer el modo de vida y el hábitat de diferentes especies bacterianas. El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que se producen en la célula y tiene tres funciones específicas. La primera es obtener energía química del entorno y almacenarla, para luego usarla en diferentes funciones celulares. La segunda es convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana. Y la tercera función es formar y degradar moléculas necesarias para cumplir funciones celulares específicas, por ejemplo: movilidad y captación de nutrientes. El metabolismo se produce por secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente y se divide en anabolismo y catabolismo. El proceso por el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes se conoce como anabolismo y resulta en la producción de nuevo material celular; también se denomina biosíntesis. La biosíntesis es el proceso que requiere energía, por lo tanto las bacterias deben ser capaces de obtenerla de su entorno para crecer y, eventualmente, multiplicarse. El conjunto de reacciones degradativas de los nutrientes para obtener energía o convertirlos en unidades precursoras de la biosíntesis, se conoce como catabolismo. Por lo tanto, el metabolismo es el resultado colectivo de ambas reacciones.

La reacción catabólica resulta en la liberación de la energía química contenida en los nutrientes, mientras que las anabólicas la consumen. Por lo tanto, la energía liberada como resultado de las reacciones de oxidación reducción del catabolismo, debe ser almacenada y transportada de alguna manera. El compuesto fosfato de alta energía más importante en los seres vivos es el trifosfato de adenosina (ATP). Éste se genera en la célula bacteriana por dos procesos diferentes: fosforilación a nivel del sustrato y fosforilación oxidativa.

Durante la fermentación, los electrones pasan del dador, un intermediario formado durante la degradación del sustrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico también generado durante el catabolismo del sustrato inicial. Por lo tanto, este proceso de oxidación reducción no requiere el aporte exógeno de un aceptor final de electrones. Aunque hay distintos tipos de fermentaciones, todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial y liberan, por lo tanto una pequeña parte de la energía potencial contenida. En las bacterias se encuentran las tres vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono: la glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas, la de pentosa fosfato o shunt de las pentosas y la de

Entner-Doudoroff. La vía glucolítica que degrada la glucosa es preparativa, con reacciones que no son de oxidación reducción, sin liberación de energía y con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. En la segunda etapa, sí ocurren reacciones de oxidación reducción con liberación de energía, formación de ATP por fosforilación a nivel del sustrato (el ATP se genera en un paso enzimático específico) y producción de dos moléculas de piruvato. En la tercera etapa, nuevamente ocurren reacciones de oxidación reducción y se generan los productos finales de la fermentación, que varían según la bacteria en cuestión [37].

La fermentación de butanodiol en distintos géneros de bacterias como *Enterobacter*, *Serratia* y *Bacillus* producen 2,3-butanodiol durante la fermentación de la glucosa. Este deriva de la condensación de dos moléculas de piruvato en una molécula neutra de acetoína que luego es reducida a 2,3-butanodiol (figura 2)

Cada reacción metabólica está regulada no solo con respecto a otras reacciones, sino también con respecto a la concentración de nutrientes en el medio. La regulación se realiza a diferentes niveles: en la actividad enzimática y en la síntesis de las enzimas. En la primera, regulación de la actividad enzimática, se produce: la activación de enzimas alostéricas, inhibición por retroalimentación, activación alostérica y cooperatividad. La inducción enzimática y la represión por productos finales, son mecanismos de regulación de la síntesis de enzimas.

El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Las condiciones físicas y químicas del medio afectan sus actividades. Las bacterias como grupo, son extremadamente versátiles y tienen gran capacidad para utilizar una amplia gama de nutrientes que van desde compuestos inorgánicos simples, a compuestos orgánicos más complejos. Los nutrientes se pueden dividir en dos clases: esenciales, sin los cuales la célula no puede crecer y no esenciales, se usan cuando están presentes pero no son indispensables. El carbono es el mayor constituyente de la célula bacteriana, por lo tanto no llama la atención que requiera más carbono que cualquier otro nutriente.

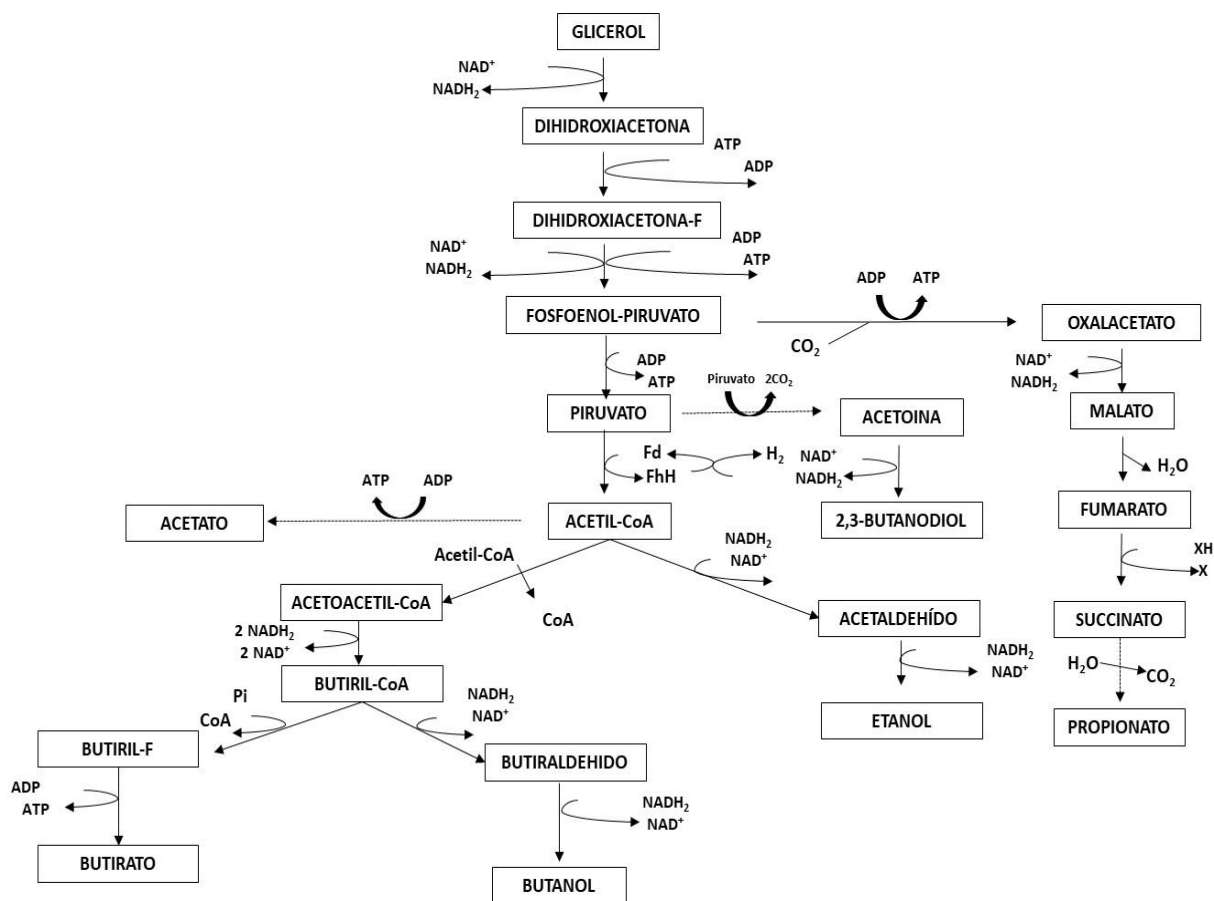


Figura 2. Degradación de glicerol en diversos productos metabólicos finales.

El glicerol es considerado como materia prima en fermentaciones industriales y microbiológicas dada su abundancia y bioconversión, ofrece la oportunidad de obtener sustancias químicas con valor agregado en la reducción de azúcares dando paso a la formación de moléculas reducidas, como succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrógeno, etc (figura 2). El glicerol alcohol en su forma simple (1,2,3-propanotriol) es el producto principal obtenido durante la transesterificación de aceites vegetales, es responsable de disminuir la actividad del agua extracelularmente durante la osmoregulación en levaduras. La comparación entre glucosa y glicerol como sustrato y rendimiento se ve favorecida en la vía D-glucosa, principalmente porque es más barata. Sin embargo, con el abundante excedente de glicerol a partir de la producción de biodiesel, la ruta de la glucosa es probablemente más cara. Por lo que esta última, es competitiva en la producción de alimentos, lo cual no es el caso del glicerol.

La fermentación de glicerol en las familias enterobacteriaceae resulta en la acumulación de dos productos principales; 1,3-propanodiol y acetato, mientras que los productos secundarios lactato, formato succinato y etanol son producidos en cantidades variables dependiendo de las condiciones

de cultivo [38, 39] (Homann et al, 1990; Barbirato et al., 1998). El consumo de glicerol puede ser a través de la membrana citoplasmática mediante difusión pasiva. Sin embargo, las células están limitadas en el consumo pasivo y tienen una gran desventaja en el crecimiento a bajas concentraciones de sustrato. El consumo de glicerol es comúnmente citado como transporte mediado por la difusión facilitada través de la membrana interna. La difusión facilitada se lleva a cabo mediante una proteína de membrana integral GlpF. El glicerol intracelular es convertido a glicerol 3-fosfato por glicerol cinasa (GlpF). El glicerol 3-fosfato permanece atrapado en la célula hasta ser metabolizado [40, 41, 42] (Voegelé et al., 1993; Darbon et al., 1999; Braun et al., 2000). La GlpF actúa como un canal selectivo y conduce también a la formación de alcoholes y derivados de urea, por lo cual es estéreo-selectiva y enantio-selectiva, todos estos canales son estrictamente selectivo para compuestos no iónicos, incluyendo iones hidróxido e hidronio.

1.7 Rutas Metabólicas de Producción de Biosurfactantes

Los sustratos hidrofílicos son sintetizados principalmente por los microorganismos para el metabolismo celular y la síntesis de la fracción polar de los Bs, mientras que los sustratos hidrofóbicos son empleados exclusivamente para la producción de la fracción de hidrocarburo de los Bs [11, 43]. Diversas vías metabólicas están involucradas en la síntesis de precursores de producción de agentes activos de superficie y dependen principalmente de la naturaleza de la fuente de carbono usada en los medios de cultivo. En primera instancia, cuando los carbohidratos son la única fuente de carbono para producir Bs de tipo glicolipídico, el flujo de carbono es regulado de tal manera que se emplean ambas vías, la lipogénica (formación de lípidos) y la glicolítica para la formación de la fracción hidrofílica, suprimidas por el metabolismo microbiano como se ilustra en la figura 3 [44].

Un sustrato hidrofílico, como la glucosa o glicerol; es degradado hasta formar intermediarios en la vía glicolítica, como la glucosa 6-fosfato, el cual es uno de los principales precursores de carbohidratos localizado en la fracción hidrofílica de un Bs. Para la producción de lípidos, la glucosa es oxidada a piruvato a través de la glicolisis y el piruvato es convertido en acetil-CoA, el cual da paso a la generación de malonil-CoA cuando se une a oxalacetato, enseguida es convertido en ácidos grasos, este último, es uno de los precursores de la síntesis de lípidos [45].

Cuando un hidrocarburo es usado como fuente de carbono, el mecanismo microbiano es direccionado principalmente hacia la vía lipolítica y gluconeogénesis (formación de glucosa a través de diferentes precursores como hexosas), de este modo, permite su asimilación para la producción de ácidos grasos o azúcares. La vía de la gluconeogénesis es activada por la producción de azúcares. Esta vía consiste en la oxidación de ácidos grasos a través de la β -oxidación hasta acetil- CoA (ó propionil-

CoA en el caso de cadenas de ácidos grasos impares). Iniciando con la formación de acetil-CoA, las reacciones involucradas en la síntesis de precursores de polisacáridos, como lo glucosa-6-fosfato, son esencialmente la inversa a la glucólisis. Sin embargo, las reacciones catalizadas por la enzima piruvato cinasa y fosfofructocinasa-1 son pasos irreversibles. Otras enzimas exclusivas a los procesos de gluconeogénesis son requeridas para evitar cada reacción. En la figura 4 esquematiza las principales reacciones involucradas en la formación de glucosa 6-fosfato, el cual; es el principal precursor de polisacáridos y disacáridos formados por la producción de la fracción hidrofílica de glicolípidos [46].

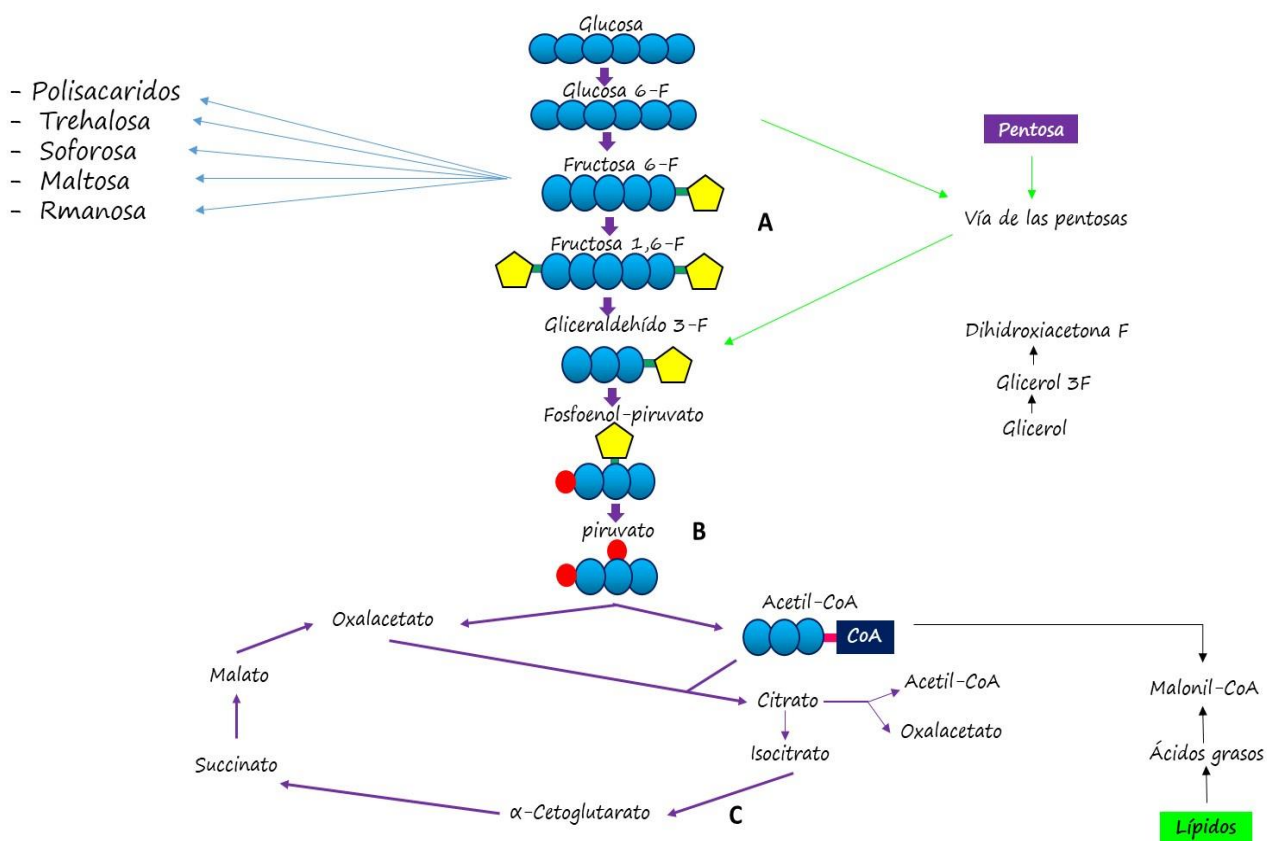


Figura 3. Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs, empleando carbohidratos como sustrato. Las enzimas clave para el control de flujo de carbono: (A) Fosfofructocinasa; (B) Piruvato cinasa; (C) Isocitrato deshidrogenasa.

La biosíntesis de Bs ocurre a través de 4 diferentes rutas: a) Síntesis de carbohidratos y lípidos; b) una fracción en síntesis de carbohidratos, mientras que la otra mitad que es la síntesis de lípidos depende de la longitud de la cadena del sustrato empleado como fuente de carbono; c) una mitad es síntesis de lípidos y la fracción restante perteneciente a la síntesis de carbono depende del sustrato empleado y d) la mitad corresponde a la síntesis de carbono y la otra pertenece a la síntesis de lípidos,

ambas dependientes del sustrato empleado. Por lo tanto, la longitud de la cadena de n-alcanos usada como fuente de carbono altera la biosíntesis del surfactante.

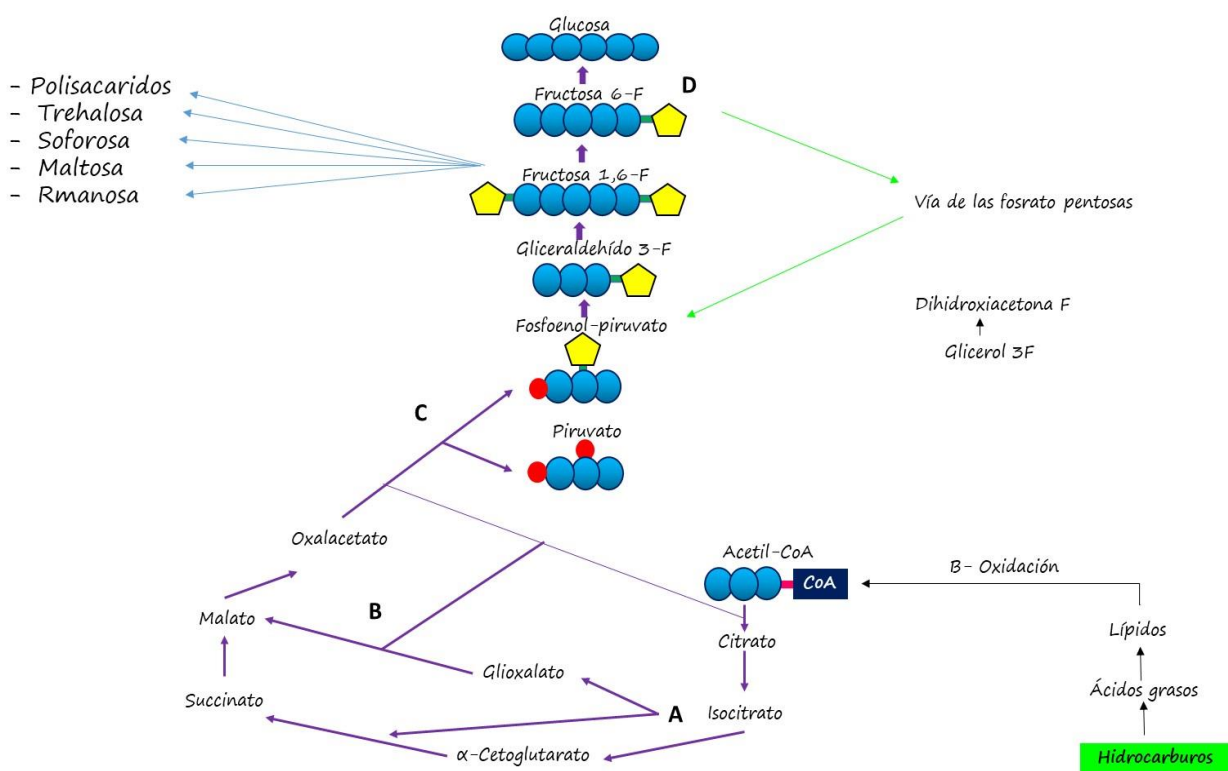


Figura 4. Metabolismo intermediario relacionado con la síntesis de precursores de Bs empleando hidrocarburos como sustratos. Enzimas clave: (A) Isocitrato liasa, (B) malato sintasa, (C) Fosfoenolpiruvato; (D) Fructosa-1.

1.8 Sistema Quorum Sensing

El sistema quorum sensing (QS), es un sistema de comunicación bacteriana y se caracteriza por la secreción y detección de moléculas de señalización –autoinductores- sin una población bacteriana. Cuando se alcanza la población “Quorum”, en el cual se alcanza el umbral de autoinductores, la población bacteriana coordina sus respuestas a los insumos ambientales. El QS es un sistema de regulación global que se encuentra en muchas especies controlando varias y diversas funciones biológicas como virulencia, formación de biopelículas, bioluminiscencia y conjugación bacteriana [47]. Los principales componentes del sistema quorum sensing son las señales QS sintetadas, el receptor de señales (proteína reguladora), y la señal molecular. El complejo proteína autoinductor/regulatorio modula la actividad de los genes regulados por QS. Hay dos sistemas QS convencionales conocidos en *P. aeruginosa*, las y rhl. Los autoinductores sintetada LasI y RhII producen la homoserine lactona 3OC12-HSL y C3-HSL, respectivamente, cualquier complejo con su correspondiente regulador transcripcional, LasR y RhIR, modula la transcripción de 5 a 10% de todo el genoma de *P. aeruginosa*

[48]. Un tercer sistema de QS distinto está formado por el factor transcripcional PqsR (también llamado MvfR), responsable de la activación del cluster de genes pqsABCDE y phnAB ambos requeridos para la producción de señales de quinolonas (PQS) en *Pseudomonas* y 4 hidroxí-2-alquilquinolonas (HAQs), respectivamente, los cuales son conocidos por su influencia en la producción de factores dependientes de QS, como elastasa, piocianinas, lectina PA-1L y ramnolípidos [49].

En bacterias gram negativas se ha reportado la producción de Bs de tipo lipopeptídico. El cluster de genes que codifica para el complejo multi-modular de proteínas péptido sintetasa no ribosomales (siglas en inglés NRPSs) han sido clonadas y caracterizadas en dos géneros, demostrando su diferente linaje evolutivo. La organización modular sistemática de NRPSs pertenece a una alteración estructural de lipopéptidos por un dominio de intercambio o módulo de NRPSs para generar nuevos lipopéptidos [50,51]. Especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* producen un amplio rango de Bs de tipo lipopéptido. Estos lipopéptidos comparten estructuras anfipáticas semejantes que contienen en una porción péptidos hidrofílicos, mientras que en la porción restante contienen ácidos grasos hidrofóbicos. La mayoría de los Bs de tipo lipopeptídico tienen una estructura cíclica mediada por la unión entre un residuo de péptido C-terminal y un β -hidroxiácido graso ó grupo hidroxil del residuo peptídico o un β -aminoácido. Las NRPSs son enzimas multimodulares que reconocen, activan, modifican y unen un aminoácido intermediario al péptido producto [52]. Estas, son capaz de sintetizar péptidos que contienen aminoácidos inusuales incluyendo D-aminoácidos, β -aa y aminoácidos –hidroxí o N-metilados. La biosíntesis de péptido sintetasa no ribosomal ocurre en función de la unidad catalítica, referenciada a un módulo. El orden de los módulos es usualmente co-lineal a la secuencia del péptido producto. Cada módulo está compuesto de dominios específicos que son responsables de catalizar diferentes actividades enzimáticas.

El dominio de Adenilación (**A**) es responsable del reconocimiento de aa y adenilación a expensas de ATP para formar un intermediario acil-adenilado. El aa adenilado se une covalentemente a un acarreador fosfopanteteína adyacente a la tiolación. (**T**), o dominio proteína acarreadora del grupo peptídico (PCP). La formación de enlaces peptídicos de dos aa unidos consecutivamente es catalizada por el dominio de condensación (**C**). Los dominios de Modificación así como los de epimerización (**E**), catalizan la conversión de L- aa a D-isómeros y están asociados con el modulo que incorpora los D-aa. Finalmente, la ciclación y lanzamiento del péptido producto son llevados a cabo por el dominio tioesterasa C-terminal (**Te**), este último, está asociado con el módulo de terminación. Un número de cluster de genes que codifican las NRPSs para la biosíntesis de lipopéptidos en *Bacillus* y

Pseudomonas han sido clonados y caracterizados. Ambos cluster de genes muestran sorprendentes similitudes en su arquitectura modular las cuales también han sido identificadas [53].

1.9 Aplicación Potencial de los Biosurfactantes

Los Bs son moléculas complejas con grupos funcionales específicos y por lo tanto tienen una acción específica. En muchos casos, la contaminación ambiental causada por la actividad industrial es debido a accidentes o liberación intencional o presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en el ambiente. Diversos estudios relacionados con biorremediación sugieren que los surfactantes como aditivos pueden aumentar drásticamente la solubilidad de compuestos lipofílicos (Hidrocarburos policíclico aromáticos, HPA's) y además incrementar la velocidad de biorremediación en tratamientos de suelos contaminados con hidrocarburos [54]. La aplicación de Bs con respecto a la remediación de compuestos inorgánicos como metales pesados o en otro sentido, están dirigidos a agentes quelantes y remoción de iones durante etapas de lavados facilitados por las interacciones químicas entre los anfífilos y los metales iónicos [23].

Los biosurfactantes tienen diversas aplicaciones tanto en el sector ambiental, alimenticio, farmacéutico, polimerización, emulsión de pinturas, minería, textiles, agroquímico, tratamiento de residuos, formulación de asfaltos, cementos, manufacturación de fibras, preservativos de maderas, cosméticos, en la agricultura como diluyentes y dispersantes de fertilizantes y pesticidas [55, 56,26]. También en el mejoramiento de la penetración de compuestos activos dentro de plantas, otra de las aplicaciones no menos importantes es en la biorremediación y dispersión de derrames petroleros y movilización de petróleo pegado en el interior de los tanques y también en la recuperación mejorada de petróleo. La gran diversidad de aplicaciones depende de las características y tipo de función que presenten los agentes activos de superficie [57,58, 59]. Hoy en día en la industria del petróleo, hay un gran interés en el uso de Bs en la movilización del crudo pesado, transporte en tuberías y remoción de pozos atascados, administración de derrames petroleros, control de contaminación de crudo, limpieza de lodos impregnados con petróleo almacenados y recuperación microbiana mejorada de petróleo (siglas en inglés: MEOR) [60]. Diversos procesos de producción y optimización de Bs han sido patentados y comercializados, algunas de las patentes disponibles en el mercado se presentan en la tabla 3, [61]. Cabe destacar que hoy en día existe un sin número de patentes disponibles comercialmente.

En este contexto, la matriz biológica ha tomado auge en el ámbito de producción de compuestos con aplicación biotecnológica. Hoy en día, el interés por emplear estas moléculas es por su compatibilidad

con el ambiente, ya que son sustancias no tóxicas y altamente biodegradables. Además de las propiedades estructurales únicas y particulares que le confieren multi-facetadas, en el área de biotecnológica, su aplicación se ha enfocado de manera específica en la limpieza ambiental [62].

Tabla 3. Patentes de Biosurfactantes comerciales.

Biosurfactantes	Origen	Proveedor	Aplicación
Biofuture	Ramnolípido	Biofuture Ltd, Irlanda	Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos
EC-601	Ramnolípido	Ecochem Ltd, Canada	Agentes dispersantes de hidrocarburos insolubles en agua
EC-1800	Consorcio bacteriano	Ecochem Ltd, Canada	Limpiador de derrames de petróleo en suelo
EC-2100W	Consorcio bacteriano	Ecochem Ltd, Canada	Degradador de hidrocarburos en plantas de tratamiento de aguas residuales
JBR-products	Ramnolípido	Jeneil Biosurfactant Co, LTC USA	Industria de alimentos y agroindustriales
Petrosolv	Desconocido	Enzyme Technologies inc, USA.	Remoción de petróleo, recuperación y procesamiento
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma-Aldrich Co, LLC, USA	Actividad antifúngica, antibacteriana y antitumoral
Serratamolide	<i>Serratia marcescens</i>	1717 CheMall Co, USA	Actividad antimicrobiana

En este contexto, las moléculas de Bs actúan como mediadores, los cuales incrementan la velocidad de transferencia de masa a partir de matrices contaminadas haciendo biodisponibles los sustratos hidrofóbicos para los microorganismos [63, 64]. Los Bs pueden inducir cambios en las propiedades de membrana celular, dando como resultado un incremento en la adherencia microbiológica. Este mecanismo es de vital importancia cuando dos fases inmiscibles (aceite y agua) están presentes en el consumo directo de sustrato [65, 66], Otra notable característica de aplicación ambiental de estos compuestos, está basada en su habilidad al complejo de iones metálicos pesados, los cuales pueden mejorar la remoción y extracción en tratamientos biológicos [67].

1.10 Biodegradación

La biorremediación involucra el uso de microorganismos, bacterias u hongos para detoxificar o remover contaminantes orgánicos, es la principal estrategia implementada para la remediación de

suelos/agua impregnados con hidrocarburos mediante biodegradación, biotransformación y/o mineralización, preferentemente *in situ*. Ha sido propuesta como una tecnología efectiva para el control de hidrocarburos [68], los procesos de biodegradación han sido reconocidos como una poderosa alternativa en métodos convencionales para resolver problemas que conciernen al medio ambiente, incluyendo tratamientos fisicoquímicos. Hoy en día, la gran variedad de bacterias que usan como sustrato hidrocarburos se han visto limitadas por numerosos factores como lo son: sustratos recalcitrantes y la baja solubilidad y la baja solubilidad de compuestos orgánicos en sistemas acuosos lo cual limita su biodisponibilidad para su biodegradación [69].

Los hidrocarburos derivados de petróleo son materia prima esencial en nuestra sociedad hoy en día, pero también son un factor principal de contaminación ambiental lo que entorpece los procesos de biorremediación. El petróleo crudo tiene muy baja solubilidad en agua, una alta adsorción en mezcla de suelos y una velocidad limitada de transferencia de masa para la biodegradación [26]. La adición de compuestos activos de superficie pueden promover la solubilidad de los hidrocarburos haciéndolos disponibles y aumentando la biodegradación. En este contexto, muchos estudios han demostrado que la adición de surfactantes sintéticos, incrementa la solubilidad de ciertos hidrocarburos haciéndolo más disponible y mejorando así su biodegradación. Los Bs son ampliamente utilizados para incrementar la degradación de compuestos hidrofóbicos. No obstante, la adición de emulsificadores sintéticos persistentes, podrían ser altamente nocivos para el medio ambiente y organismos vivos. Además, estos pueden inhibir la vía de degradación a través de interacciones tóxicas y la encapsulación de hidrocarburos por medio de micelas de surfactante. Por el contrario, los compuestos activos de superficie de origen microbiológico, se caracterizan por ser respetuosos con el medio ambiente, reduciendo la toxicidad y biodegradabilidad, por lo que estos podrían ser considerados como las mejores alternativas con respecto a su contra parte química aumentando la solubilidad, biodisponibilidad y biodegradación [70].

CAPÍTULO II

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens es un bacilo gram negativo de naturaleza libre, pertenece a la familia enterobacteriaceae, es una bacteria multi-resistente, produce pigmentos a temperatura ambiente, secreta antibióticos de tipo carbapem. Algunas cepas de origen clínico se ha demostrado son patógeno-oportunistas y causan repercusiones en el sistema nervioso. Muchas especies de *Serratia* expresan fimbrias que incluyen aquellas que exhiben hemaglutinación sensible a manosa, aunque se desconoce la especificidad tisular de estas adhesinas. Algunas cepas expresan componentes de la superficie celular que los hacen altamente hidrofóbicas, y esto puede estar involucrado en la adhesión a superficies de células eucariotas. Especies de *Serratia* secretan diversas enzimas involucradas en factores de virulencia como las proteasas, beta-lactamasas, DNAasas, lipasas, quitinasas, gelatinasas, cloroperoxidasas, isoenzimas múltiples de fosfatasa alcalina, hemolisinas reguladas por hierro, las cuales se sabe, expresan un sistema de absorción de hierro de alta afinidad mediado por enterobactina y algunos pueden adquirir iones férricos mediados por aerobactina. Presentan diversos fenotipos como formación de biopelículas que permiten a los microorganismos patógenos la defensa contra antibióticos, la locomoción en swarming que involucra la diferenciación celular en respuesta al crecimiento, con células en swarm hiperflageladas y elongadas asociado a la secreción de surfactantes que tienen como objetivo desplazarse sobre superficies. El sistema sensor de quimiotaxis juega un papel crucial en la motilidad en swarming [71].

En la biosíntesis de FlhDC-RssAB-ShlBA se produce una hemolisina, ShlA que funciona como una toxina, la cual forma poros en conjunto con la proteína ShlB, causando citotoxicidad en los globulos rojos y en otras células eucariotas, como las epiteliales y los fibroblastos. Dependen del contacto y no se liberan como productos extracelulares. Sin la presencia de ShlB, ShlA se inactiva. ShlB es una proteína de membrana externa y activa. La activación de ShlA también depende de fosfatidiletanolamina, un componente principal de la membrana externa de *S. marcescens*. Además de la actividad citotóxica, ShlA también media en la liberación de moléculas inflamatorias y contribuye a la uropatogenicidad. Dado que ShlA y ShlB están asociados a células, la capacidad de estas proteínas para causar daño generalmente depende de la capacidad de *S. marcescens* para adherirse.

Así mismo, el sistema de dos componentes RssAB, inhibe la locomoción en swarming. De igual forma, el sistema FlhDC controla la expresión del flagelo y regula positivamente la producción de hemolisinas, y está involucrado en la producción de biopelículas y swarming en *Serratia marcescens*.

2.1.2 Biosíntesis de Bs en *Serratia marcescens*

Los Bs de *Serratia marcescens* son ciclodepsipéptidos (Serrawetina W1 (cadenas simples de dilactonas)) con actividad humectante. Poseen diversas características como la expansión independiente del flagelo, son aceleradores de swarming, secretan antibióticos y secretan al medio otro tipo de Bs de cadena hidrocarbonada con grupos acilo y aminoácidos cíclicos (D-3-hidroxi-decanoil-L-seril) que han sido identificados en las cepas W2 y W3, comparten la biosíntesis a través de la condensación de dos moléculas de ácido serratámico (D-3-hidroxi-decanoil-L-serina) sintetizado por la 4'fosfopanteteneil transferasa (Siglas en ingles PPTase). Esta proteína acarreadora de grupos peptidilo, es el dominio de fosfopanteteinilación por la *PswP* (PPTase codificada por el gen *pswP* de *S. marcescens* 274). Los pasos predichos para la biosíntesis de Serrawetinas involucra como primer término, el dominio de adenilación por la adenilato L-Serina, entonces esta enzima activada se une también como tioéster al dominio de tiolación que ha sido fosfopanteinilado antes de por el *PswP* (PPTase). Para el grupo amino de la L-serina anclada en el dominio de tiolación, la fracción restante de 3-D-hidroxi-decanoil unido a la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) reaccionará para formar un enlace amida por el desprendimiento de una ACP. Entonces, el ácido serratámico será formado por el dominio de tiolación. Mutantes deficientes en la formación de ACP y las Acil-ACP no han sido identificadas, Entonces el papel de ACP es pura especulación. Esta situación es similar a la estudiada en la biosíntesis de surfactina en *Bacillus subtilis*. Si la ACP requerida para la biosíntesis de serrawetinas es idéntica a la proteína que actúa en el metabolismo general de los ácidos grasos, los defectos en un proceso tan fundamental en la biosíntesis de lípidos pueden ser letales [71]

El dominio de tiolación se liberará transfiriendo el primer ácido serratámico al dominio tioesterasa. El siguiente paso para anclar el segundo ácido serratámico al dominio de tiolación fosfopanteteinilado libre. Entonces un ácido serratámico será anclado a un dominio de tiolación y el segundo al de tioesterificación. Después de esto, un proceso similar al propuesto para la biosíntesis de gramicidina se lleva a cabo. El cual consiste en que dos ácidos serratámicos, están unidos por un enlace éster y enseguida se da la formación de un enlace éster intramolecular, el cual; dará como resultado la liberación del producto, simétrico una Serrawetina W1. Excepto por el dominio ACP que porta la fracción 3-D-hidroxi-decanoilo, el presunto producto SwrW contiene todos los dominios funcionales

para los pasos de biosíntesis anteriores. En contraste, a otros ciclodepsipéptidos formados por las proteínas multi-modulares NRPSs, la Serrawetina W1 no presenta uniones peptídicas pero parece estar ensamblada por las NRPSs uni-modulares. Presuntamente, SwrW podría ser una enzima simple en la familia de las NRPSs (Figura 5) [71].

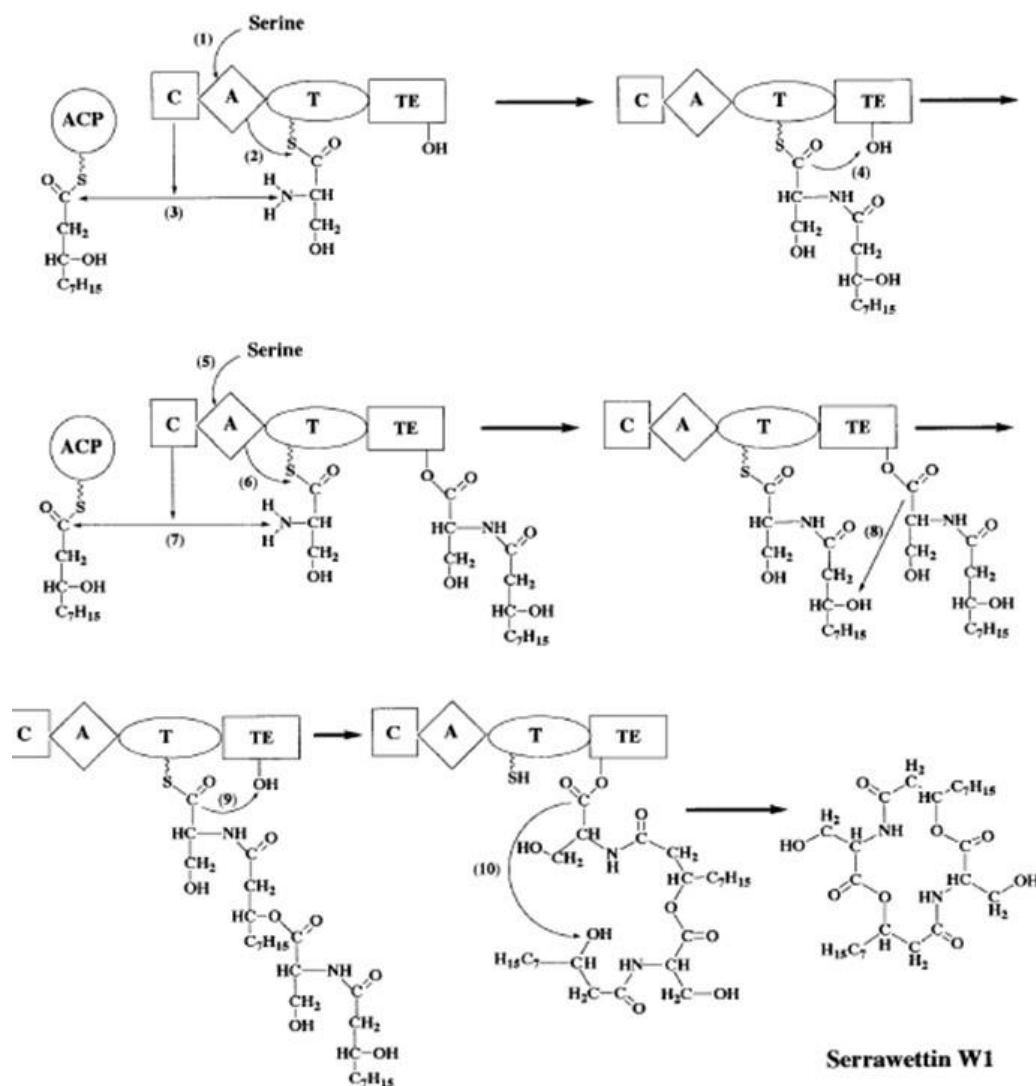


Figura 5. Biosíntesis de Serrawetina W1 dependiente de las NRPSs. Los presuntos pasos, están indicados en números secuenciales (1-10). ACP, proteínas acarreadoras de grupos acilo; C, dominio de condensación; A, dominio de adenilación; T, dominio de tiolación; TE, dominio de tioesterasa. La línea en zig-zag extendida desde las ACPs hasta el dominio T representa parte de la fracción fosfopanteteinilo.

2.2 ANTECEDENTE DIRECTOS

En el laboratorio de Biotecnología Ambiental se cuenta con una cepa pigmentada de *Serratia marcescens* (SM3) aislada de suelos contaminados con hidrocarburos. Estudios previos de caracterización y producción de Bs en medio rico Luria Bertani (LB) demuestran que reduce la tensión superficial de 54 a 33.9 dinas/cm a las 72 h de fermentación, presentando un índice de emulsión con queroseno del 69%. Así mismo, en los ensayos de locomoción en “swarming” se demuestra que esta cepa secreta al medio algún tipo de Bs [3]. Dado estos resultados, se decidió emprender la búsqueda de cepas isogénicas con capacidad de producir algún agente tenso-activo, con la característica de no presentar pigmento que afectase la purificación y actividad Bs. En este mismo trabajo se obtuvieron 6 mutantes blancas con el agente químico etil-metanosulfonato (EMS) de un total aproximado de 1750 mutantes de estas, únicamente se demostró que la cepa SMRG-5 es capaz de reducir la tensión superficial a 35.6 dinas/cm y presenta un índice de emulsión de 51.9% en el mismo medio de cultivo, presentando características de actividad Bs similares a la cepa silvestre SM3 (figura 6).

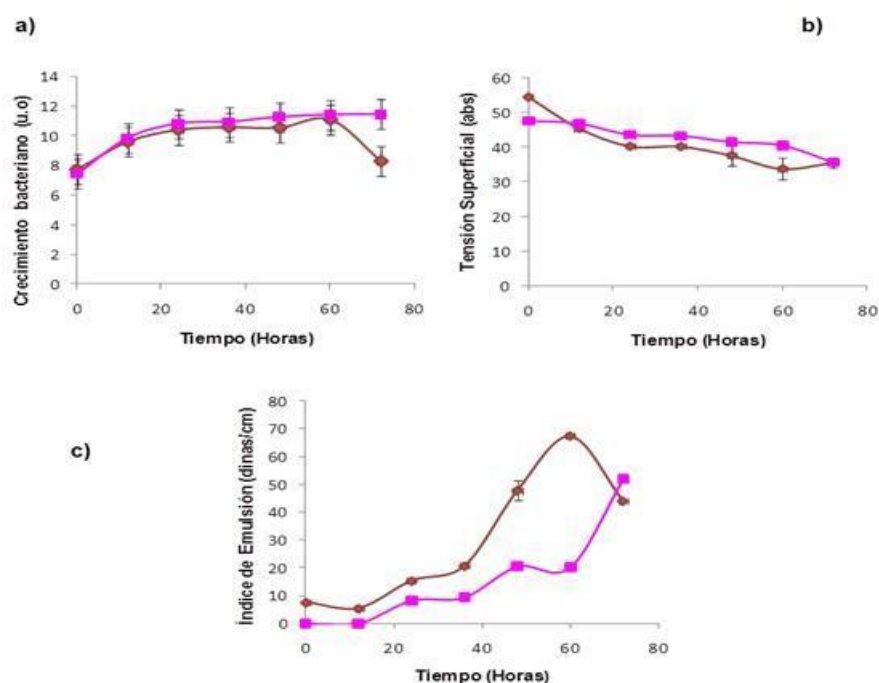


Figura 6. Caracterización de las cepas SM3 y SMRG-5 con respecto a la producción de biosurfactante. a) Perfil de crecimiento bacteriano de las cepas SM3 (♦) y SMRG-5 (■). b) Reducción de la tensión superficial de las cepas SM3 y SMRG-5. c) Índice de Emulsión de las cepas SM3 y SMRG-5.

Asimismo, presenta un patrón de locomoción en “swarming” similar a la cepa SM3 (figura 7).

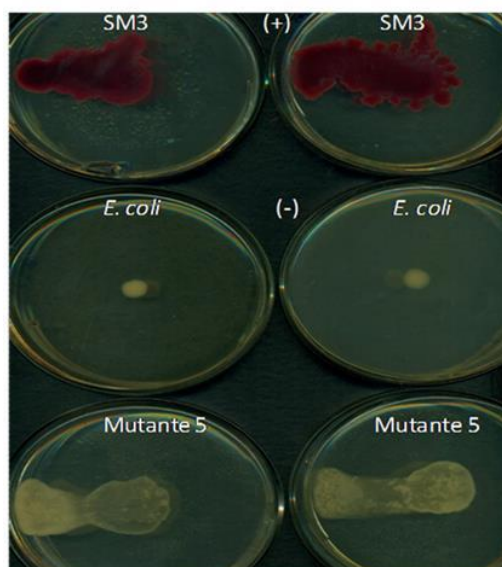


Figura 7. Ensayo de locomoción en swarming de las cepas SM3 y SMRG-5 de *Serratia marcescens* y como control negativo *E. coli* DH5 α .

Así mismo, a nivel molecular; se sabe que el gen que codifica para la producción en paralelo para la producción de Bs y prodigiosina *pswP* fue identificado en ambas cepas como productos de reacción en cadena de la polimerasa “PCR”, al amplificar el gen se corroboró que en estas cepas SM3 y SMRG-5 también se encuentra dicho gen (figura 8).

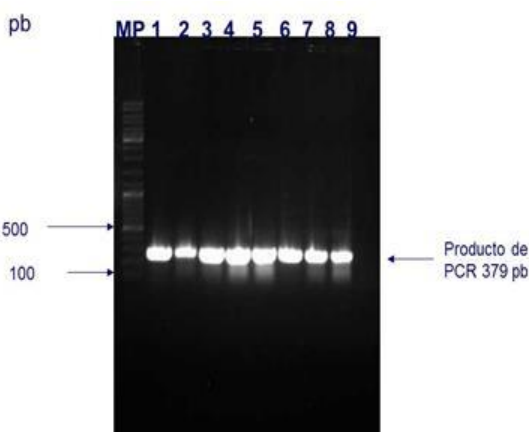


Figura 8. Electroforesis en gel del producto de PCR del gen *pswP* en la cepa SM3 y mutantes químicas. Gel de Agarosa 1%. Marcador de Peso Molecular (1kb ladder N3232S NE *Biolabs*). Carril 1 cepa SM3, Carril 2, cepa SM4 (cepa blanca de *Serratia marcescens*). Carriles 3-8 cepas mutantes químicas 1-6. Carril 9, *E.coli* DH5 α .

Lo anterior demuestra que la cepa SMRG-5 conserva los niveles de producción de Bs con la característica de no secretar pigmento durante su metabolismo [3]. En los reportes de Sunaga *et al.*, [72] demuestran que la producción de prodigiosina y biosurfactante están asociados en la ruta de biosíntesis lo que dificulta su separación. Por lo tanto, es de gran interés purificar y caracterizar el surfactante de la cepa mutante SMRG-5 no pigmentada a la par de la cepa silvestre SM3. Así como realizar estudios próximos en la degradación de hidrocarburos, haciendo una comparación entre ambas cepas, explorando diferentes condiciones fisicoquímicas y nutricionales que delimiten la mejor condición de producción en ambas cepas.

Con base en los antecedentes previamente mencionados con respecto a la producción de Bs en ambas cepas de *Serratia marcescens* (SM3 y SMRG-5), en este trabajo se planteó producir, caracterizar e identificar la estructura del Bs de cada cepa. Así como también, obtener cepas mutantes productoras de Bs a partir de mutagénesis dirigida (Mini-Tn 5) con el objetivo de seguir en la búsqueda de cepas blancas isogénicas identificando y ubicando donde se sitúa la mutación.

CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS

Las cepas SM3 y mutante SMRG-5 secretan al medio un tipo de biosurfactante, el cual posiblemente difiere en su estructura y característica como consecuencia de la mutación química. Por lo que su aplicación en la biodegradación de hidrocarburos se vea favorecida ya que incrementan su biodisponibilidad y por ende su biodegradabilidad.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Producir, purificar y caracterizar el biosurfactante producido por las cepas SM3 y SMRG-5 de *Serratia marcescens* y la biodegradación de benzo [α] pireno por ambas cepas.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producción y caracterización de los Bs producidos por las cepas SM3 y SMRG-5.
- Extracción y purificación de los Bs de las cepa SM3 y SMRG-5.
- Elucidación de la estructura del Bs producido por las cepas SM3 y SMRG-5
- Remoción de benzo [α] pireno en los medios de cultivo favorables a la producción de biosurfactantes en las cepas SM3 y SMRG-5
- Búsqueda de mutantes productoras de biosurfactante blancas mediante mutagénesis con transposon mini-Tn 5

CAPÍTULO IV

La estrategia experimental propuesta, fue modificada conforme se desarrolló este proyecto de acuerdo a los resultados obtenidos en cada etapa. Por lo que en esta página se presenta la estrategia final implementada.



CAPÍTULO V

5.1. ANTECEDENTES

5.1.1 Evaluación del Efecto del Medio de Cultivo en la Producción de Bs, Caracterización y Medición de la Actividad Bs

Las cepas usadas en este trabajo son conservadas y preservadas bajo distintos métodos. La evaluación del efecto del medio de cultivo y sus factores ejercen un papel de suma importancia en este trabajo, ya que se busca incrementar y mejorar la producción de estos agentes activos de superficie aunado a la actividad Bs medida en cada paso a evaluar. Por ello se hace uso de las herramientas estadísticas. En este contexto, un diseño experimental permite establecer diferencias o relaciones entre las variables de un problema a través de métodos científicos, busca a través de una serie de herramientas estadísticas sistematizar los ensayos de prueba y error para encontrar la mejor combinación de variables independientes que optimice una variable de respuesta en unas circunstancias determinadas.

El análisis experimental se basa en la comprensión de la variación que presentan los datos de salida de un problema. Las ventajas de producción de surfactantes de origen biológico incluye mayor producción, velocidad de crecimiento específico, medios de cultivo económicos, así como optimizar distintos parámetros que involucran reducción en tiempo, desarrollo de procesos. La metodología de diseño experimental estadístico es una alternativa eficiente en sistemas de cultivos microbiológicos, un ejemplo de ello; es la metodología de superficie de respuesta (MSR) la cual consiste en emplear una técnica estadística basada en el análisis de regresión múltiple lineal. La MSR ha sido empleada en el máximo rendimiento de producción del biosurfactante Emulsan, producción de biomasa, optimización de la conversión de aceite vegetal y fermentación alcohólica a partir de *Lactobacillus casei* [73].

5.1.1.1 Las herramientas estadísticas permiten incrementar la producción de Bs

La producción de los Bs a partir de distintos medios de cultivo económicos y con diferentes fuentes de carbono es hoy en día una alternativa sustentable. Ejemplo de ello son los aceites vegetales usados o aceites para motor, residuos sólidos y líquidos de papa y almidón suplementados con sales minerales, melaza de azúcar, suero de leche y residuos de las destilerías, los microorganismos capaces de crecer en estos sustratos demuestran tener resultados favorables en cuanto a reducción de la tensión superficial y actividad emulsionante [74, 75, 26].

Debido a la gran diversidad de factores asociados a la producción de Bs incluyendo pH, temperatura, fuente de carbono, concentraciones de nitrógeno fósforos y sales inorgánicas (por ejemplo: hierro magnesio y calcio) han traído consigo hacer uso de herramientas bioestadísticas con enfoques eficientes para la selección óptima de sistemas de medios de cultivo mediante metodologías de diseños experimentales estadísticos.

Un experimento diseñado es una prueba o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. El diseño experimental puede ser considerado como parte del proceso científico y tiene como objetivo determinar cuáles son las variables que tienen mayor influencia en la variable de respuesta, determinar el mejor valor de las variables controlables que influyen en la respuesta, determinar la mejor combinación de las variables controlables que ayuden a reducir la variabilidad de la respuesta. Establecer la combinación óptima de las variables controlables con el objetivo de minimizar los efectos de las variables incontrolables. Su aplicación en fase temprana de la evolución de un proceso puede dar como resultado: mejorar el rendimiento del proceso, reducción de variabilidad, menor tiempo de desarrollo y minimizar costos. Para analizar un experimento de manera correcta, es necesario que se tenga una idea clara sobre el problema a estudiar, la metodología a seguir es comprender y plantear el problema, elegir los factores y niveles, así como seleccionar la variable de respuesta, en cuanto a la elección del diseño experimental, se debe considerar el tamaño muestral, seleccionar un orden adecuado para los ensayos y determinar si está implicado un bloqueo u otras restricciones, una vez implementado el experimento este debe ser monitoreado y asegurar que se haga conforme a lo planteado [76]

Con respecto a la producción de Bs se emplearon como herramienta estadísticas los diseños factoriales que nos permiten evaluar varios factores en el experimento, el tipo más simple de experimento factorial involucra solo dos factores digamos que A y B. Hay a niveles del factor A y b niveles del factor B. En este diseño se consideran n réplicas del experimento y que cada una de ellas contiene todas las ab combinaciones de tratamiento. Al coleccionar los datos, las observaciones ab...n correrían en orden aleatorio, por lo que se considera un factorial de dos factores completamente aleatorizado [76].

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este estudio son SM3 y mutante SMRG-5 de *Serratia marcescens* las cuales son preservadas en medio de cultivo Luria Bertani que contiene: Bacto-peptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L e incubadas a 30°C durante 16 horas. Así mismo, la conservación de ambas cepas se lleva a cabo en glicerol al 80% y almacenadas a -20°C.

5.2.2 Medios de cultivo para la producción de Biosurfactante

Las cepas SM3 y SMRG-5 fueron evaluadas en cuanto a producción de biosurfactante con distintos medios de cultivo, señalados a continuación (Gramos por litro de agua destilada):

1. Peptona-glicerol (PG). Glicerol 12-14, peptona de caseína 2-4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75-1.50.
2. Glucosa 10-30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1-10, Solución salina (composición g/L: KCl 1.1, NaCl 1.1, KH_2PO_4 3.4, K_2HPO_4 4.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y extracto de levadura 2-10.

Cada experimento se lleva a cabo por triplicado, bajo condiciones de esterilidad (120°C, 15 lib, 15 min).

Pre-inóculo e inóculo

Una colonia de ambas cepas proveniente de medio sólido debe ser inoculada en un matraz de 200 mL con 50 mL de medio de cultivo Luria Bertani (Bacto-Peptona 10 g/L, extracto de levadura 5, NaCl 10 g/L) deben incubarse durante 12 h a 30°C y 150 rpm. En un matraz de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo previamente esterilizado se debe inocular con el 10% de su volumen e incubar a 30°C, 150 rpm durante 72h. Posterior a su producción en el mejor medio de cultivo se escalará a nivel fermentador (3L) con volumen final de 1L.

5.2.3 Efecto del medio de cultivo para la producción de Biosurfactante por la cepa SM3 y SMRG-5

Se empleó un diseño factorial 2^4 con cuatro variables a analizar, con el objeto de evaluar la combinación óptima de variables en respuesta a la producción de Bs en las cepas SM3 y SMRG-5. Las variables en estudio fueron: glucosa (fuente de carbono), extracto de levadura y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fuente de nitrógeno) y medio mineral como suplemento al medio de cultivo y para la producción de Bs, se evaluaron a dos niveles -1 y 1 (mínimo y máximo) incluyendo puntos al centro (tabla 4). Los factores

temperatura, pH inicial, y porcentaje de inóculo se manejaron como valores constantes. El diseño factorial 2^4 proporciona 16 tratamientos diferentes a analizar con 3 puntos al centro que consideran la varianza del error experimental.

Tabla 4. Variables estudiadas y sus niveles en un diseño factorial 2^4

Variables	Nivel	Puntos al	Nivel
	Bajo	centro	alto
	-1	0	+1
F. de Carbono: Glucosa (g/L)	10	20	30
F. de Nitrógeno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	1	5.5	10
F. de Nitrógeno: Ext. de Levadura	2	6	10
Medio Mineral	0.5	1	1.5

5.2.4 Efecto del medio de cultivo en la producción de Biosurfactante por las cepas SM3 y mutante química SMRG-5

Un diseño factorial 2^3 fue utilizado para estudiar el patrón de respuesta del efecto de las variables con respecto a la cantidad de: glicerol como fuente de carbono y fuente de nitrógeno para determinar la combinación óptima de variables que aumenten la producción de Bs en ambas cepas. Las variables optimizadas se muestran en la tabla 5 con dos niveles (valor codificado -1, +1). Los factores temperatura, pH inicial, y porcentaje de inóculo se mantienen como valores constantes. Por lo tanto, el diseño factorial 2^3 proporciona 11 tratamientos diferentes a analizar con 3 puntos al centro que consideran la varianza del error experimental.

Tabla 5. Variables estudiadas y sus niveles en un diseño factorial 2^3

Variables	Nivel	Puntos al	Nivel
	bajo	centro	alto
	-1	0	+1
F. de Carbono: Glicerol (g/L)	12	13	14
F. de Nitrógeno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	0.75	1.12	1.5
F. de Nitrógeno: Peptona de Caseína (g/L)	2	3	4

5.2.5 Actividad Biosurfactante

La actividad Bs involucra someter al sobrenadante libre de células, (producto de cada fermentación) a distintos ensayos como la locomoción en swarming, reducción de la tensión superficial e índice de emulsión. Por lo que a continuación se describe cada prueba:

5.2.5.1 Medición de la reducción de la Tensión Superficial (TS)

Para medir la tensión superficial se toma una muestra al sobrenadante libre de células (6mL) y se filtra (filtro Whatman 0.45 μm) previa la medición. La muestra se coloca en cajas Petri (35 x 10 mm) y con la ayuda de un tensiómetro de superficie (Fisher Modelo 20 previamente calibrado se lleva a cabo la medición. La tensión superficial consiste en medir la fuerza necesaria para mover el anillo inmerso en la solución que contiene el Bs hacia arriba a través de la superficie del líquido en el aire (Método del anillo de du Nouy). Se usaron como controles agua, medio de cultivo LB y PG, así como los solventes orgánicos como acetato de etilo fase en la que se extrae el Bs.

Además, cada muestra fue medida por el método de placa (Wilhelmy), En el cual, una placa de geometría rectangular perfectamente conocida suspendida verticalmente a una balanza de precisión. El lado inferior de la placa se pone en contacto (horizontalmente) con la superficie del líquido para que se moje. Luego se ejerce una fuerza vertical sobre la placa para levantarla. La placa se levanta poco a poco, y de cada lado se forma una interfase curva; se levanta la placa hasta que se produzca el arranque. Usualmente la placa es de platino levemente rugoso, de tal forma que el ángulo de contacto sea lo más pequeño posible, y se pueda suponer igual a cero. La placa mide típicamente 29,9 mm de largo (L) y 0,1 mm de espesor, en cuyo caso el perímetro completo es de 60 mm. La balanza es en general una balanza de torsión es un motor que asegura el levantamiento, y un sistema registrador monitorea la fuerza. (Figura 9) [77].

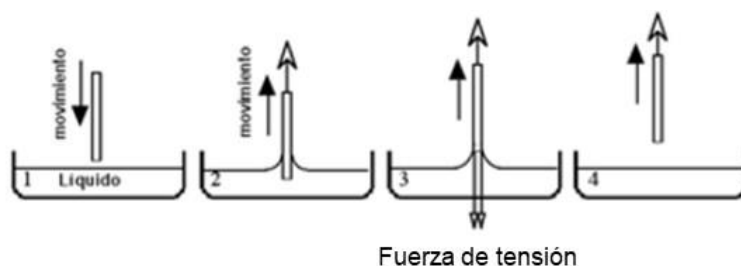


Figura 9. Método de placa de Wilhelmy

5.2.5.2 Índice de Emulsión (IE_{24})

La técnica se lleva a cabo en base en el protocolo de Cooper y Goldenberg, [78]. Consiste en formar una mezcla de solución en un tubo de ensaye de 10 mL con 6 mL de queroseno y 4 mL de sobrenadante de un cultivo filtrado a analizar, las muestras deben tomarse directamente de las cinéticas. de crecimiento. La solución se mezcla vigorosamente en un vortex (Baxter) durante 2 min a 14 000 rpm completamente homogénea. La emulsión se mide 24 h después de haber preparado la mezcla según la fórmula siguiente:

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

La fórmula consiste en medir la altura de la zona que emulsionó, es decir, el sobrenadante completamente mezclado con el hidrocarburo (queroseno) entre la altura del líquido total (hidrocarburo más la zona emulsionada) y este resultado es multiplicado por el factor de porcentaje.

5.2.5.3 Ensayo de Locomoción en “Swarming”

Para determinar la locomoción tipo “swarming” a las cepas de *S. marcescens* se prepara un cultivo en medio líquido LB por 6 h (fase de crecimiento exponencial). Posteriormente con la ayuda de un palillo se deposita una alícuota de este cultivo sobre la superficie de una placa de medio LB al 0.8% de agar. Las placas se incuban a 30 °C durante 24 h y se observa el nado. [79]. La locomoción en swarming, en ambas cepas fueron probadas en los medios favorables a la producción de Bs.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de Bs por cepas de *S. marcescens* SM3 y mutante química blanca SMRG-5, mediante las herramientas estadísticas en este caso los diseños experimentales, se presentan a continuación donde los factores evaluados son la fuente de carbono y nitrógeno con respecto a la reducción de la TS y IE_{24} .

5.3.1 Producción de Bs por cepas de *S. marcescens* SM3 y mutante química SMRG-5, mediante diseños experimentales estadísticos.

En la presente etapa se utilizaron diseños experimentales estadísticos para evaluar diferentes fuentes nutricionales sobre la producción de Bs por ambas cepas.

Debido a la importancia y factores que involucra el uso de las herramientas estadísticas, en este trabajo se presentan los resultados del efecto que ejerce el medio de cultivo en la producción de Bs por cepas de *S. marcescens* (SM3 y SMRG-5).

5.3.2 Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SM3 en glucosa como fuente de carbono

Un diseño factorial 2^4 fue usado para evaluar la producción de biosurfactante de la cepa SM3 en función de la glucosa (fuente de carbono), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura (fuente de nitrógeno) y el medio mineral. Los valores de respuesta fueron: la reducción de la tensión superficial (TS) e índice de emulsión (IE_{24}). En la figura 10 se presentan las cinéticas de crecimiento de la cepa SM3 en los diferentes medios de cultivo evaluados. Se observa que a niveles altos de extracto de levadura (fuente de nitrógeno) el crecimiento está por debajo de 1.5 abs (figura 10a-b), mientras que a bajas concentraciones de esta misma fuente de carbono, el crecimiento aumenta registrando como máximo 2.0 unidades ópticas de abosorbancia.

Con respecto, a la tasa específica de crecimiento de cada medio de cultivo evaluado se presentan en la tabla 6, se observa que a bajo crecimiento (densidad óptica DO, bajo), la producción de Bs aumenta en la mayoría de los medios de cultivo evaluados, sin embargo, los medios de cultivo que presentan menor concentración de fuente de nitrógeno presentan mayor Bs en menor tiempo de incubación (tabla 6 medios de cultivo 3, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

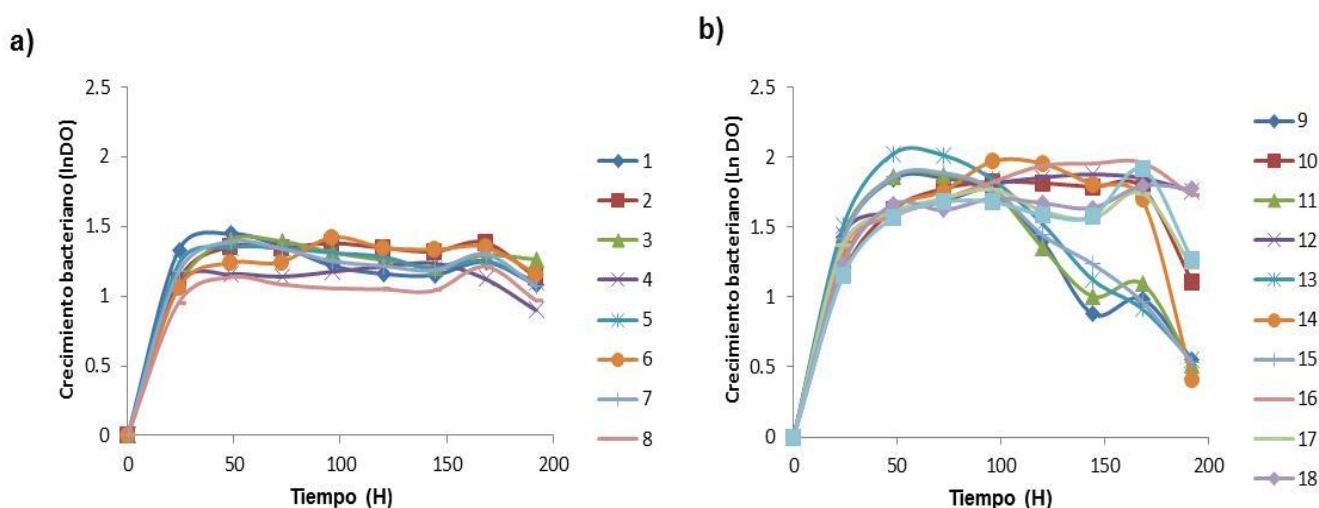


Figura 10. Cinéticas de crecimientos de los 19 tratamientos evaluados para la producción de Bs en la cepa SM3 con glucosa como fuente de carbono en un diseño factorial 2^4 .

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de los 19 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2⁴ en glucosa (fuente de carbono).

Medio de Cultivo	Velocidad de crecimiento (μ)	Densidad Óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.01283*	2.95	192
2	0.01361	3.11	192
3	0.02776	4.03	72
4	0.05364	2.45	192
5	0.01725	3.3	144
6	0.01303	3.19	192
7	0.01197	2.91	192
8	0.01208	2.63	192
9	0.00836	1.73	192
10	0.01162	6.2	96
11	0.04001	6.49	72
12	0.01459	6.06	72
13	0.06419	7.57	48
14	0.03946	5.8	72
15	0.04035	6.6	72
16	0.03001	6.2	96
17	0.03913	5.86	96
18	0.01503	6.02	192
19	0.01349	3.55	192

*Medio de cultivo con mayor producción de Bs.

En la tabla 7 se presentan los resultados de reducción de la TS de los 19 tratamientos (medios de cultivo) evaluados por el diseño factorial 2⁴. Los niveles más bajos de TS fueron obtenidos a las 192 y 144 h en los tratamientos marcados con los números 1, 2 y 5 con una velocidad de crecimiento similar entre ellos de $\mu = 0.012$, $\mu = 0.013$, $\mu = 0.017$ respectivamente.

$$TS = 46.46 + 3.73A + 4.41B + 3.59D + 2.95AB - 2.13AD - 2.44BD - 2.07ABD \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

TS = Tensión superficial

A = Glucosa

B = (NH₄)₂SO₄

C = Solución salina

D = Extracto de levadura

Tabla 7. Resultados de la TS en el diseño factorial 2^4 de la cepa SM3 con glucosa como fuente de carbono.

Medio de Cultivo	Tensión Superficial* (dinas/cm)
1	33.7±0.2
2	36.6±0.2
3	40.5±0.1
4	66.7±0.5
5	36.7±0.1
6	37.1±0.1
7	37.2±0.1
8	54.5±0.5
9	47.8±0.4
10	49.7±0.2
11	50.4±0.2
12	55.3±0.3
13	46.9±0.2
14	47.9±0.4
15	48.7±0.2
16	53.7±0.2
17	45.1±0.5
18	45.7±0.5
19	43.6±0.5

*Promedio de tres observaciones, nueve replicas

El ANOVA del modelo factorial de primer orden demuestra que la ecuación fue significativa a partir del análisis de Fisher ($F_{\text{modelo}} = 17.39$) fue más alto que el valor de tablas F_{tab} ($F_{0.05} = 9.53$). Por lo tanto, $F_{\text{modelo}} > F_{\text{tab}}$. La prueba de Fisher tiene un 95% de confiabilidad, por lo que el modelo indica una variación significativa en los valores de respuesta.

5.3.2.1 Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SM3 en el diseño factorial 2^4 en glucosa (fuente de carbono)

En la tabla 8, se presenta los ANOVAS de los parámetros de regresión del modelo lineal de superficie de respuesta, los datos demuestran que el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. Los valores de TS de cada tratamiento muestran una variación de 66.7 a 33.7 dinas/cm. El valor de F del modelo de 18.96 implica que el modelo es significativo. Hay solo un 0.01% de probabilidad de que el valor de F del modelo pueda ocurrir debido al error. Los valores de probabilidad $\text{Prob} > F$ es menor a 0.05 lo que indica que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, D, AB, AD, BD, ABD son términos del modelo

significativos. Los valores mayores a 0.1000, indican que los términos del modelo no son significativos. El valor de la curvatura con 0.93 implica que hay un 36% de probabilidad de que se deba al ruido. El Lack of Fit (falta de ajuste) de 7.96 implica que no es significativo con respecto al error puro, hay un 11.61% de probabilidad de que el valor del Lack of Fit sea debido al error, Por lo tanto, si la falta de ajuste debida al modelo no es significativo, indica que el modelo se ajusta a los datos experimentales con una $R^2 = 0.9440$ y hay un efecto de los factores y sus interacciones sobre la producción de agentes activos de superficie.

Tabla 8. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2^4 , glucosa (fuente de carbono) de SM3

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	1204.14	15	80.28	68.61	0.0145*	significativo
A-Glucosa	222.01	1	222.01	189.75	0.0052*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	311.52	1	311.52	266.26	0.0037*	
C-Sol. Salina	20.53	1	20.25	17.31	0.0532	
D-Ext. Levadura	205.92	1	205.92	176	0.0056*	
AB	139.24	1	139.24	119.01	0.0083*	
AC	9.3	1	9.3	7.95	0.1061	
AD	72.25	1	72.25	61.75	0.0158*	
BC	24.01	1	24.01	20.52	0.0454*	
BD	95.06	1	95.06	81.25	0.0121*	
CD	2.25	1	2.25	1.92	0.2999	
ABC	1.82	1	1.82	1.56	0.3383	
ABD	68.89	1	68.89	58.88	0.0166*	
ACD	7.02	1	7.02	6	0.1339	
BCD	21.16	1	21.16	18.09	0.0511	
ABCD	3.42	1	3.42	2.93	0.2293	
Curvature	6.98	1	6.98	5.97	0.1346	no significativo
Error puro	2.34	2	1.17			
Total	1213.46	18				

D. estand= 1.08, $R^2= 0.9981$, Media= 46.20, Adj, $R^2= 0.9835$, C.V%=2.34 Pred $R^2=N/A$, PRESS=N/A,

Adeq Presicion=32.253

Debido a que el modelo es significativo, y la curvatura no es significativa, en la tabla 9 se muestran aquellos factores que tienen efecto en la producción de Bs (factores marcados con *). Por lo tanto, el modelo es significativo con una R^2 de 0.9981. La ecuación final en términos de factores codificados se reduce a (Ec. 2).

Tabla 9. Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS en el diseño factorial 2⁴, glucosa (fuente de carbono).

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	1136.06	8	142.01	18.15	0.0001	Significativo
A-Glucosa	222.06	1	222.01	28.37	0.0005*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	311.52	1	311.52	39.81	0.0001*	
C-Sol. Salina	205.92	1	205.92	26.32	0.0006*	
AB	139.24	1	139.24	17.8	0.0022*	
AD	72.25	1	72.25	9.23	0.014*	
BD	95.06	1	95.06	12.15	0.0069*	
ABD	68.89	1	68.89	8.8	0.0158*	
BCD	21.16	1	21.16	2.7	0.1345	
Curvature	6.98	1	6.98	0.89	0.3695	no significativo
Residual	70.42	9	7.82			
Lack of Fit	68.08	7	9.73	8.31	0.1116	no significativo
Error puro	2.34	2	1.17			
Total	1213.46	18				

D. estand= 1.08, R²= 0.9981, Media= 46.20, Adj,R²= 0.9835, C.V%=2.34 Pred R²=N/A,

PRESS=N/A,

Adeq Presicion=32.253

$$TS = 46.46+3.72A+4.41B+3.59D+2.95AB-2.12AD-1.22BC-2.44BD-2.08ABD \quad (\text{Ec.2})$$

DONDE:

A = Glucosa

B = (NH₄)₂SO₄

D = Extracto de Levadura

En este ajuste, los factores fuente de carbono y nitrógeno ejercen un efecto positivo sobre la producción de Bs. Sin embargo, el resto de las interacciones, especialmente en presencia de sol. Salina. No hay un efecto favorable sobre la producción de estos agentes activos de superficie.

En la tabla 10 se presentan los valores reales con respecto a los predichos del modelo. Cuando son seleccionados los factores que tienen efecto (Ecuación 2) sobre la producción de Bs, se observa que en ambos resultados hay similitud. También se presenta la gráfica de valores reales vs predichos (figura 11).

Tabla 10. Valores Reales vs Predichos en el diseño factorial 2⁴.

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	33.7	33.99
2	36.6	35.61
3	40.5	40.07
4	66.7	61.81
5	36.7	36.43
6	37.1	38.05
7	37.2	37.63
8	54.5	59.37
9	47.8	46.13
10	49.7	47.59
11	50.4	50.77
12	55.3	55.71
13	46.9	48.57
14	47.9	50.03
15	48.7	48.33
16	53.7	53.27
17	45.1	46.46
18	45.7	46.46
19	45.6	46.46

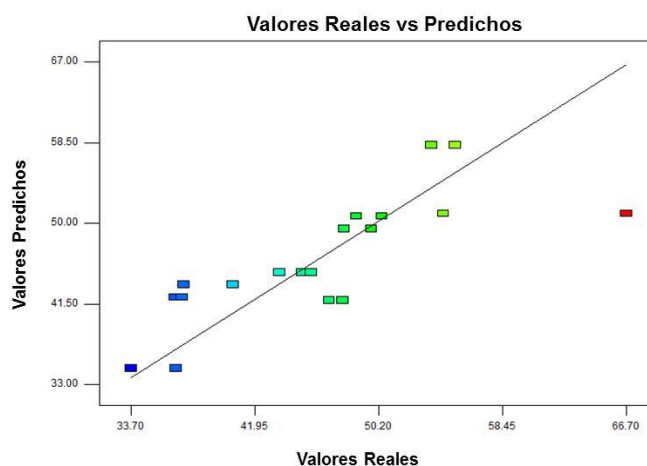


Figura 11. Valores Reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2⁴ en glucosa (fuente de carbono).

El análisis de superficie de respuesta basado en las variables de interés y su influencia con otras, muestran los valores de respuesta optimizada con respecto a cada variable analizada, con el fin de entender el efecto de los factores, es necesario deducir la naturaleza de las interacciones. La figura

12 muestra los resultados de los distintos tratamientos analizados con respecto a la mejor respuesta de reducción de la tensión superficial, así como las gráficas de interacciones entre dos factores.

En el panel a de la figura 11, se observa la superficie de respuesta de la reducción de TS como función de la fuente de carbono y nitrógeno, cuando el medio de cultivo contiene bajas concentraciones de glucosa (10 g l^{-1}) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g l^{-1}) donde los factores: solución salina y extracto de levadura permanecen constantes, lo cual promueve la producción de Bs de la cepa SM3. La gráfica de interacciones entre glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ muestra el significado de los valores (desviación estándar) de respuesta (TS) a niveles altos y bajos de cada factor involucrado (panel b). Ambas gráficas correlacionan donde la reducción de la TS se ve afectada por la alta concentración de glucosa (30 g/L), si la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 g/L) también es alta. Sin embargo cuando las concentraciones de ambos factores son bajas, la reducción de la TS se ve favorecida, es decir hay mayor reducción de la TS y por tanto mayor producción de Bs.

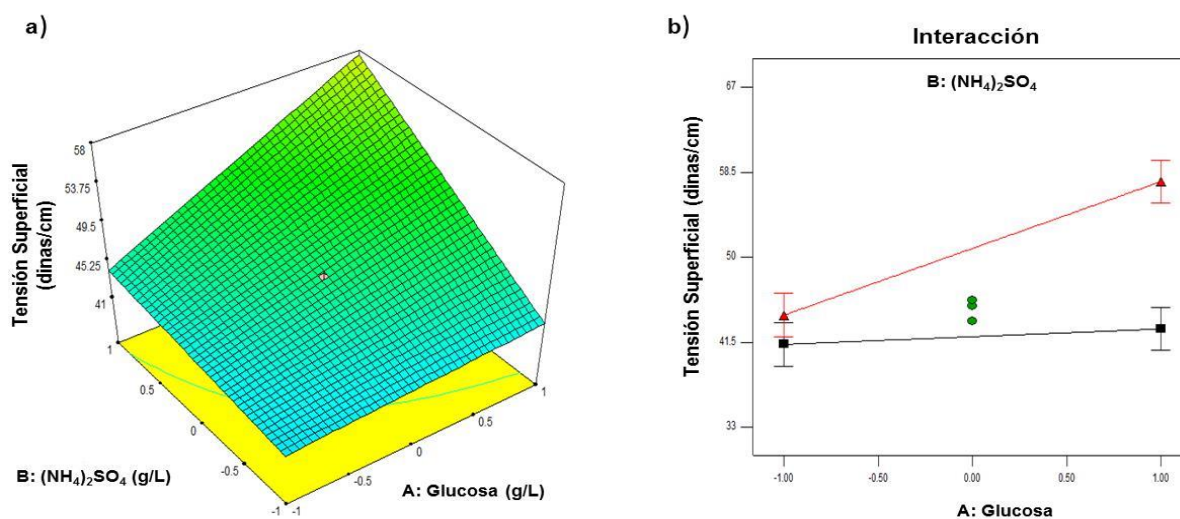


Figura 12. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3. **a** superficie de respuesta máxima de reducción de TS con respecto a glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **b**. Interacción de Glucosa - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

En cuanto al efecto en la reducción de TS se observó que los tratamientos marcados con el número 1 y 5 son los que presentan mayor efecto (Figura 13). Roldán-Carrillo *et al.* [80], Reportan el efecto del medio de cultivo para la producción de Bs a partir de *S. marcescens* (cepa SmSA) en un medio que contiene como fuente de carbono glucosa (30 g/L) e interacciones de ratios de C/N, C/Mg y C/Fe con un máximo de reducción en la TS de 33 dinas/cm empleando un diseño Box-Behnken.

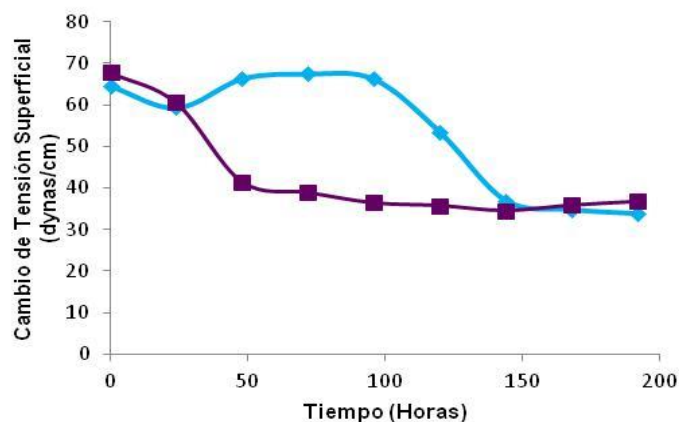


Figura 13. Cambio de Tensión Superficial con respecto al tiempo. Tratamientos 1(◆) y 5(■).

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos con respecto al índice de emulsión (IE_{24}) de los 19 medios de cultivo evaluados, muestran una variación de 2 a 79.9 %, estos resultados presentan una correlación, es decir a valores bajos de TS hay un porcentaje de emulsión alto.

Tabla 11. Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^4 de la cepa SM3 con glucosa

Número de Tratamientos	Índice de Emulsión * IE_{24} (%)
1	79.7 ± 0.6
2	69.2 ± 0.5
3	12.11 ± 0.2
4	2 ± 0.2
5	69.2 ± 0.3
6	56.7 ± 0.3
7	56.4 ± 0.4
8	5 ± 0.4
9	9 ± 0.5
10	6 ± 0.5
11	6 ± 0.5
12	5 ± 0.5
13	8 ± 0.5
14	9 ± 0.5
15	9 ± 0.4
16	5 ± 0.5
17	10 ± 0.5
18	10.5 ± 0.5
19	10.3 ± 0.5

*Promedio de seis observaciones.

5.3.2.2 Análisis de varianza (ANOVA) del índice de emulsión (IE₂₄) de SM3 en el diseño factorial 2⁴ en glucosa (fuente de carbono)

Con respecto al E₂₄, en la tabla 12 se muestra el análisis de varianza para el modelo factorial seleccionado con respecto al E₂₄, los datos muestran que este modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue mayor a 0.05. Los valores de los coeficientes de correlación obtenidos en el presente estudio fué de 0.31. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección es decir, los factores estudiados tienen un efecto sobre la generación de emulsiones y los factores indicados con un asterisco, tienen un efecto sobre la producción de Bs.

Tabla 12. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE₂₄

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	11734.17	15	782.28	12351.76	<0.0001	significativo
A-Glucosa	56.63	1	56.63	894.09	0.0011*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	3896.88	1	3896.88	61529.69	<0.0001*	
C-Sol. Salina	16.2	1	16.2	255.8	0.0039*	
D-Ext.						
Levadura	3779.18	1	3779.18	59671.19	<0.0001*	
AB	15.8	1	15.8	249.48	0.004*	
AC	1.63	1	1.63	25.67	0.0368*	
AD	49.35	1	49.35	779.22	0.0013*	
BC	20.03	1	20.03	316.19	0.0031*	
BD	3711.86	1	3711.86	58608.25	<0.0001*	
CD	56.63	1	56.63	894.09	0.0011*	
ABC	5.18	1	5.18	81.72	0.012*	
ABD	20.03	1	20.03	316.19	0.0031*	
ACD	22.8	1	22.8	360.01	0.0028*	
BCD	48.65	1	48.65	768.17	0.0013*	
ABCD	33.35	1	33.35	526.59	0.0019*	
Curvature	377.69	1	377.69	5963.5	0.0002	significativo
Error puro	0.13	2	0.063			
Total	12111.98	18				

D. estand= 0.25, R²= 1.0000, Media= 20.56, Adj,R²= 0.9999, C.V%=1.22 Pred R²=N/A, PRESS=N/A,

Adeq Presicion=326.405

Con respecto al modelo y seleccionando todos los valores que ejercen un efecto sobre la formación de la emulsión, la ecuación 3 representa dichos valores. .

$$IE_{24} = 22.49 - 1.88A - 15.61B - 1.01C - 15.37D + 0.99AB + 0.32AC + 1.76AD + 1.12BC + 15.23BD + 1.88CD + 0.57ABC - 1.12ABD - 1.19ACD - 1.74BCD - 1.44ABCD \quad (\text{Ec. 3})$$

Así mismo, la superficie de respuesta con respecto al índice de emulsión y la gráfica de interacciones se muestra en la figura 14 en función de la glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con valores mínimos. De acuerdo al modelo, el medio de cultivo marcado como el tratamiento número 1 (glucosa 10g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L, solución salina 0.50, extracto de levadura 2 g/L) fue el mejor medio para la producción de Bs y que reduce la TS a 33.7 dinas/cm y presenta mayor porcentaje de emulsión 79.7 % (tabla 7 y 11).

Roldán-Carrillo *et al.*, [80] reportan una reducción de la TS a 33 dinas/cm por cepas de *S. marcescens* (SmSA), empleando un diseño experimental Box-Behnken en relación a nutrientes empleando glucosa como fuente de carbono.

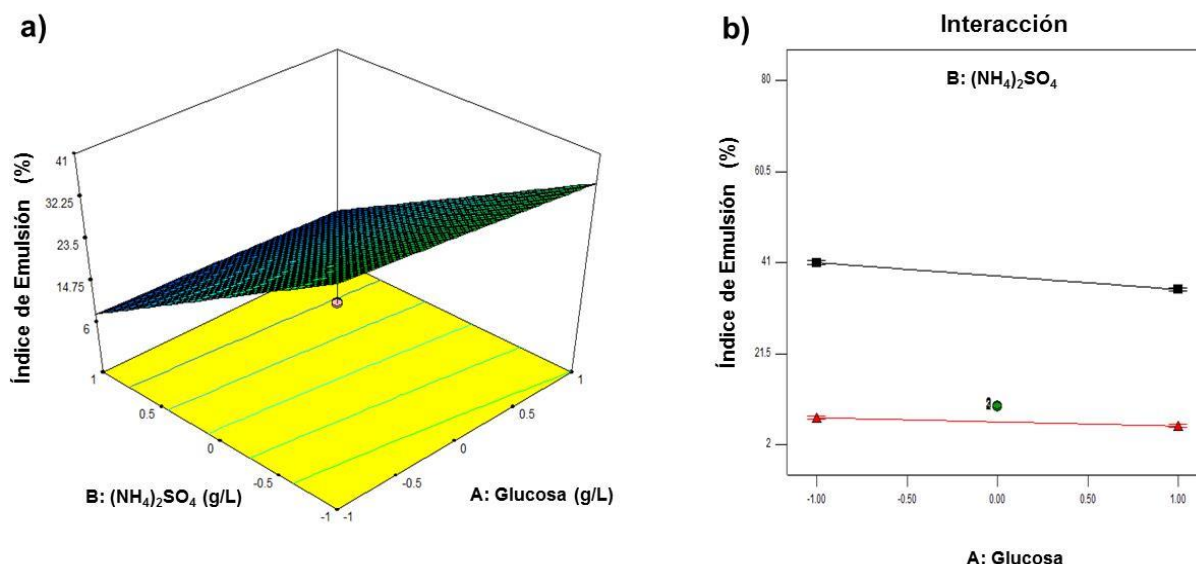


Figura 14. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el índice de emulsión (E_{24}) de la cepa SM3. **a)** superficie de respuesta máxima de IE_{24} con respecto a glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **b).** Interacción de glucosa - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fuentes de carbono empleadas para la producción de Bs es muy amplia y versátil dependiendo del microorganismo a estudiar. Por lo tanto, en este trabajo, se empleó una segunda fuente de carbono para la producción de Bs por las cepas SM3 y SMRG-5. El glicerol es un compuesto utilizado en la producción de Bs por distintas especies de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y en especial cepas de *Serratia marcescens* (DT-1P) [81].

5.3.3 Efecto del medio de cultivo para la producción de biosurfactantes por la cepa SMRG-5 en glucosa como fuente de carbono

Un diseño factorial 2^4 fue empleado para evaluar la producción de Bs de la cepa SMRG-5 en función de la glucosa (fuente de carbono), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura (fuente de nitrógeno) y el medio mineral en complementación a la cepa silvestre previamente evaluada. Los valores de respuesta analizados fueron: la reducción de la tensión superficial (TS) e índice de emulsión (IE_{24}). En la figura 14 se presentan las cinéticas de crecimiento de la cepa SMRG-5 en los diferentes medios de cultivo evaluados. Se observa que a niveles bajos de fuente de carbono y nitrógeno con excepción de extracto de levadura, el crecimiento está por arriba de 1.7 lnDO (figura 15a), mientras que a altas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno, el crecimiento se ve afectado registrando 0.57 lnDO.

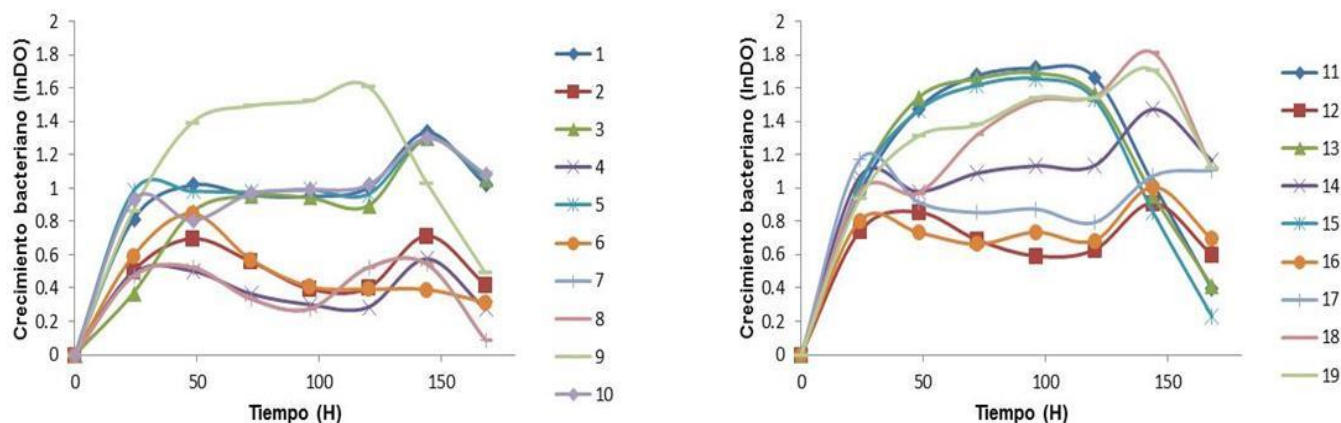


Figura 15. Cinéticas de crecimientos de los 19 tratamientos evaluados para la producción de Bs en la cepa SMRG-5 con glucosa como fuente de carbono en un diseño factorial 2^4

La velocidad de crecimiento de cada medio de cultivo evaluado en este diseño estadístico, se presentan en la tabla 13, contrario a los resultados analizados en la cepa silvestre SM3, se observa que a mayor crecimiento (densidad óptica, DO), la producción de Bs aumenta en la mayoría de los medios de cultivo evaluados, sin embargo, los medios de cultivo que presentan mayor concentración de fuente de carbono y nitrógeno se ven afectados en cuanto a la producción de Bs en un tiempo de incubación menor (tabla 13 medios de cultivo 2, 4, 6, 8, 10, 13, 14, 15 y 16).

Tabla 13. Velocidad de crecimiento en la cepa SMRG-5 en los 19 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2⁴ en glucosa (fuente de carbono).

Medio de Cultivo	Velocidad de crecimiento (μ)	Densidad Óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.01753	3.79	144
2	0.01364	2.04	144
3	0.01782	3.65	144
4	0.01318	1.77	144
5	0.01254	2.69	96
6	0.04468	2.33	48
7	0.01792	3.61	144
8	0.01495	1.72	144
9	0.04992	5.02*	120
10	0.01589	3.66	144
11	0.02836	5.57	96
12	0.01417	2.48	144
13	0.02935	5.42	96
14	0.01493	4.36	144
15	0.02774	5.23	96
16	0.01383	2.2	24
17	0.1062	3.2	24
18	0.02187	6.11	144
19	0.01984	5.51	144

*Medio de cultivo con mayor producción de Bs

En la tabla 14 se presentan los resultados de reducción de la TS de los 19 medios de cultivo evaluados en este diseño factorial 2⁴. Los niveles más bajos de TS fueron obtenidos a las 96 y 120 h en los tratamientos marcados con los números 1 y 3 con una velocidad de crecimiento similar entre ellos de $\mu = 0.0175$ y $\mu = 0.0178$ μ , respectivamente.

$$TS = 46.00 + 6.52A - 2.33B - 0.25C + 1.19D - 0.72AB - 1.80AC - 0.56 AD - 0.50BC - 1.24BD - 0.63 ABC - 0.41 ACD - 0.79 ABCD \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde:

TS = Tensión superficial

A = Glucosa

B = (NH₄)₂SO₄

C = Solución salina

D = Extracto de levadura

Tabla 14. Resultados de reducción de la TS en el diseño factorial 2⁴ de la cepa SMRG-5 en glucosa

Medio de Cultivo	Reducción de la Tensión Superficial (dinas/cm)
1	36.5
2	53.4
3	36.2
4	51.3
5	38.4
6	52
7	36.9
8	48.3
9	42.8
10	46.5
11	37.3
12	51.5
13	44.5
14	56.4
15	40.7
16	44.3
17	45.6
18	45.1
19	45.2

5.3.3.1 Análisis de varianza (ANOVA) de la tensión superficial de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2⁴ en glucosa (fuente de carbono)

En la tabla 15, se esquematizan los ANOVAS de los parámetros de regresión del modelo lineal de superficie de respuesta, los datos demuestran que el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. Los valores de TS de cada tratamiento muestran una variación de 56.4 a 36.2 dinas/cm. El valor de F del modelo de 1202.70 implica que el modelo es significativo. Hay solo un 0.01% de probabilidad de que el valor de F del modelo pueda ocurrir debido al error. Los valores de probabilidad Prob> F es menor a 0.05 lo que indica que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, C, D, AB, AC, AD, BC, BD, ABC, ABD, ACD, ABCD son términos del modelo significativos. Los valores mayores a 0.1000, indican que los términos del modelo no son significativos. El valor de la curvatura con 1240.74 implica que son

significativos. El Lack of Fit (falta de ajuste) de 7.69 muestra no ser significativo con respecto al error puro, hay un 11.51% de probabilidad de que el valor del Lack of Fit sea debido al error, Por lo tanto, si la falta de ajuste debida al modelo no es significativo, indica que el modelo se ajusta a los datos experimentales con una $R^2 = 0.9997$ y hay un efecto de los factores y sus interacciones sobre la producción de Bs.

Tabla 15. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la Tensión Superficial de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^4 , glucosa (fuente de carbono)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor F	Prob > F	Observaciones
Modelo	905.74	15	60.38	4528.7	0.0002*	Significativo
A-Glucosa	681.21	1	681.21	51090.75	<0.0001	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	86.49	1	86.49	6486.75	0.0002	
C-Ext Levadura	1	1	1	75	0.0131	
D- Sol. Salina	22.56	1	22.56	1692.19	0.0006	
AB	8.41	1	8.41	630.75	0.0016	
AC	51.84	1	51.84	3888	0.0003	
AD	5.06	1	5.06	379.69	0.0026	
BC	4	1	4	300	0.0033	
BD	24.5	1	24.5	1837.69	0.0005	
CD	2.50E-03	1	2.50E-03	0.19	0.7072	
ABC	6.25	1	6.25	468.75	0.0021	
ABD	2.72	1	2.72	204.19	0.0049	
ACD	1.56	1	1.56	117.19	0.0084	
BCD	0.2	1	0.2	15.19	0.06	
ABCD	9.92	1	9.92	744.19	0.0013	
Curvatura	71.86	1	71.86	5389.47	0.0002*	Significativo
Error Puro	0.027	2	0.013			
Total	977.63	18				

D. estand= 0.24, $R^2= 0.9997$, Media= 46.84, Adj, $R^2= 0.9989$, C.V%=0.51 Pred $R^2=0.9865$, PRESS=13.18,

Debido a que el modelo es significativo, y la curvatura no lo es, en la tabla 16 se muestran aquellos factores que tienen efecto en la producción de Bs (factores marcados con *). Por lo tanto, el modelo es significativo con una R^2 de 0.9997. La ecuación final en términos de factores codificados se reduce (Ec. 5).

Tabla 16. Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la reducción de la TS en la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2⁴, glucosa (fuente de carbono).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor F	Prob > F	Observaciones
Modelo	905.54	13	69.66	1202.7	<0.0001*	significativo
A-Glucosa	681.21	1	681.21	11761.9	<0.0001	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	86.49	1	86.49	1493.35	<0.0001	
C-Ext Levadura	1	1	1	17.27	0.0142	
D- Sol. Salina	22.56	1	22.56	389.57	<0.0001	
AB	8.41	1	8.41	145.21	0.0003	
AC	51.84	1	51.84	895.08	<0.0001	
AD	5.06	1	5.06	87.41	0.0007	
BC	4	1	4	69.06	0.0011	
BD	24.5	1	24.5	423.06	<0.0001	
ABC	6.25	1	6.25	107.91	0.0005	
ABD	2.72	1	2.72	47.01	0.0024	
ACD	1.56	1	1.56	26.98	0.0065	
ABCD	9.92	1	9.92	171.32	0.0002	
Curvatura	71.86	1	71.86	1240.74	<0.0001	significativo
Residual	0.23	4	0.058			
Lack of Fit	0.2	2	0.1	7.69	0.1151*	no significativo
Error Puro	0.027	2	0.013			
Total	977.63	18				

D. estand= 0.24, R²= 0.9997, Media= 46.84, Adj,R²= 0.9989, C.V%=0.51 Pred R²=0.9865, PRESS=13.18,

$$TS = 46 + 6.52A - 2.33B - 0.25C + 1.19D - 0.722AB - 1.80AC - 0.56AD - 0.50BC - 1.24 BD - 0.63 \\ ABC - 0.41 ABD - 0.31 ACD - 0.79ABCD \quad (\text{Ec.5})$$

DONDE:

A = Glucosa

B = (NH₄)₂SO₄

D = Extracto de Levadura

La tabla 17 presenta los valores reales con respecto a los predichos del modelo. Cuando son seleccionados los factores que tienen efecto (Ecuación 5) sobre la producción de Bs, se observa que en ambos resultados hay similitud.

Tabla 17. Valores Reales vs Predichos en el diseño factorial 2⁴, cepa SMRG-5

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	36.5	47.19
2	53.4	48.38
3	36.2	49.57
4	51.3	50.76
5	38.4	51.95
6	52	53.14
7	36.9	54.33
8	48.3	55.52
9	42.8	56.71
10	46.5	57.9
11	37.3	59.09
12	51.5	60.28
13	44.5	61.47
14	56.4	62.66
15	40.7	63.85
16	44.3	65.04
17	45.6	66.23
18	45.1	67.42
19	45.2	68.61

La superficie de respuesta basada en las variables de interés y su interacción con otras, muestra una respuesta e inclinación hacia la optimización con respecto a cada variable analizada. Con el fin de entender el efecto que ejerce cada factor sobre la respuesta, en este caso aumento en la producción de Bs, es necesario delimitar la naturaleza de cada interacción. En la figura 16 se presentan los resultados de los 19 medios de cultivo analizados con respecto a la mejor respuesta de reducción de la TS, así como la gráfica de interacción entre dos factores como lo son glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El panel a) de la figura 15, muestra la superficie de respuesta con respecto a la reducción de la TS en función de la fuente de carbono y nitrógeno. A bajas concentraciones de glucosa (10gL^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1gL^{-1}), Sol. Salina, y extracto de levadura (2gL^{-1}), donde los factores sol. Salina y extracto de levadura permanecen constantes, la producción de Bs se ve favorecida en esta cepa mutante. La gráfica de interacciones entre glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ muestra el significado de los valores (desviación estándar) de respuesta (TS) a niveles altos y bajos de cada factor involucrado (panel b). La correlación entre ambas gráficas con respecto a la reducción de la TS se ve afectada por las altas

concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, las mejores respuestas de reducción de la TS se obtienen a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno aumentando así la producción de Bs.

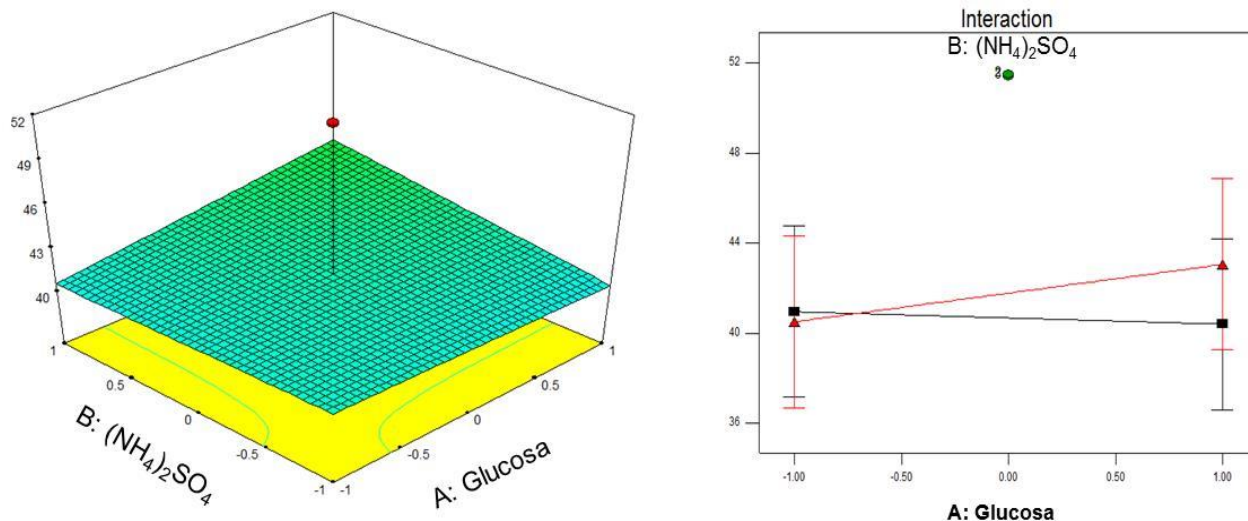


Figura 16. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5. **a** superficie de respuesta máxima de reducción de TS con respecto a glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **b** Interacción de glucosa - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.3.3.2 Análisis de varianza (ANOVA) del índice de emulsión (IE_{24}) de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^4 en glucosa (fuente de carbono)

La segunda respuesta, el índice de emulsión IE_{24} también fue analizada en este diseño experimental en los 19 medios de cultivo, como se observa en la tabla 18. La glucosa como fuente de carbono empleada, no favorece el IE_{24} , a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno el IE_{24} es de solo 15%, este resultado es bajo con respecto a los porcentajes registrados en la cepa silvestre SM3 en el mismo medio de cultivo.

Tabla 18. Resultados del IE_{24} en el diseño factorial 2^4 de la cepa SMRG-5 con glucosa

Medio de Cultivo	Índice de Emulsión (%)
1	15±0.14
2	0±0.20
3	15±0.14
4	0±0.11
5	0±0.12
6	0±0.12
7	10±0.13
8	0±0.11
9	0±0.12
10	0±0.13
11	15±0.14
12	0±0.11
13	0±0.15
14	0±0.13
15	0±0.12
16	0±0.14
17	0±0.11
18	0±0.11
19	0±0.11

En la tabla 19, se indica el análisis de varianza en el diseño factorial 2^4 de la cepa SMRG-5, con respecto al IE_{24} . El análisis demuestra que el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad del 0.05%. El valor de t para el modelo implica que es significativamente relevante a esta elección; es decir, los factores analizados tienen efecto inverso a la formación de emulsiones. La ecuación generada es la siguiente:

$$IE_{24} = 3.44 - 3.44A + 1.56B - 2.19 - 1.56D - 1.56AB + 2.19AC + 1.56AD - 0.31BC + 0.31CD + 0.31ABC - 0.31ABD - 0.31ACD - 1.56BCD + 1.56ABCD \quad (\text{Ec. 6})$$

Tabla 19. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE₂₄ en la cepa SMRG-5

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor F	Prob > F	Observaciones
Modelo	585.94	15	39.06	6.366E + 007	<0.0001*	Significativo
A-Glucosa	189.06	1	189.06	6.366E + 008	<0.0001*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	39.06	1	39.06	6.366E + 009	<0.0001*	
C-Ext Levadura	76.56	1	76.56	6.366E + 010	<0.0001*	
D- Sol. Salina	39.06	1	39.06	6.366E + 011	<0.0001*	
AB	39.06	1	39.06	6.366E + 012	<0.0001*	
AC	76.56	1	76.56	6.366E + 013	<0.0001*	
AD	39.06	1	39.06	6.366E + 014	<0.0001*	
BC	1.56	1	1.56	6.366E + 015	<0.0001*	
BD	1.56	1	1.56	6.366E + 016	<0.0001*	
CD	1.56	1	1.56	6.366E + 017	<0.0001*	
ABC	1.56	1	1.56	6.366E + 018	<0.0001*	
ABD	1.56	1	1.56	6.366E + 019	<0.0001*	
ACD	1.56	1	1.56	6.366E + 020	<0.0001*	
BCD	39.06	1	39.06	6.366E + 021	<0.0001*	
ABCD	39.06	1	39.06	6.366E + 022	<0.0001*	
Curvatura	29.85	1	29.85	6.366E + 023	0.0001*	Significativo
Error Puro	0	2	0			
Total	615.79	18				

D. estand= 0.0, R²= 1.000, Media= 2.89, Adj,R²= 1.000, C.V%=0.0 Pred R²=N/A,

La superficie de respuesta para el IE₂₄ y su gráfica de interacciones mostrada en la figura 17 en función de glucosa y (NH₄)₂SO₄. De acuerdo al modelo, los medios de cultivo que presentan el máximo de emulsión son el 1 y 3, ambos a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno con excepción de la peptona de caseína a un nivel alto en el medio de cultivo 3. Los resultados de esta cepa SMRG-5 en glucosa no favorecen la producción de Bs con respecto a la cepa silvestre, la cual generó un patrón de reducción de la TS e IE₂₄ variado con respecto a esta.

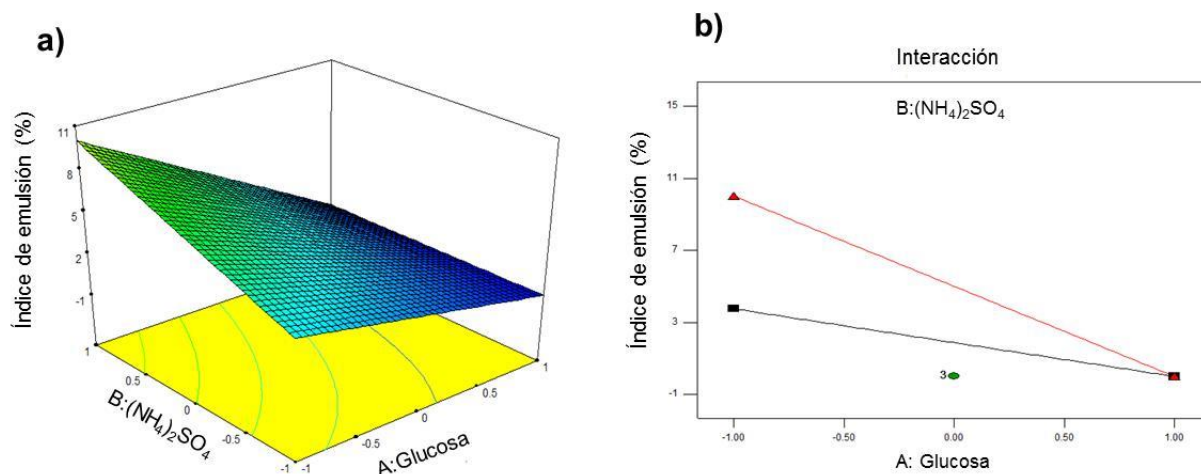


Figura 17. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE₂₄ de la cepa SMRG-5. **a** Superficie de respuesta máxima de IE₂₄ con respecto a glucosa y (NH₄)₂SO₄, **b**. Interacción de Glucosa – ((NH₄)₂SO₄)).

Los resultados de ambas cepas SM3 y SMRG-5, muestran que a pesar de ser la misma especie, esta última cepa ha sido alterada de manera favorable con respecto a la producción de Bs, delimitando así su naturaleza.

5.3.4 Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs, en el diseño factorial 2³ por la cepa SMRG-5 en glucosa

Las cepas SM3 y SMRG-5 en glucosa bajo los diseños experimentales factoriales 2⁴, permitieron delimitar el nivel de concentración de fuente de carbono y nitrógeno a usar para aumentar la producción de Bs. Con base en lo anterior, se empleó un diseño experimental factorial 2³ para evaluar la producción de Bs a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (Glucosa 12 – 14 g/L, (NH₄)₂SO₄, 0.75 – 1.5 g/L y Peptona de caseína 2 – 4 g/L). Los valores de respuesta se basan en la reducción de la TS e IE₂₄. La figura 18 se muestra, las cinéticas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo evaluados a la cepa SMRG-5. El mejor crecimiento lo presentan los medios de cultivo que presentan bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (5, 6, 7 y 8).

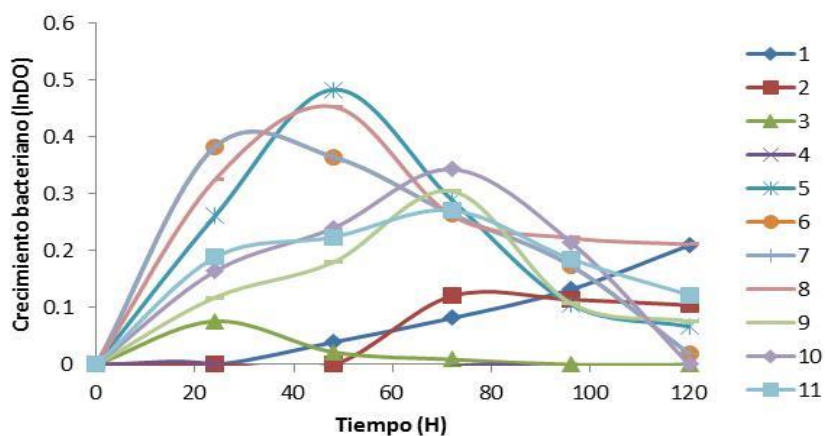


Figura 18. Cinéticas de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en la producción de Bs con glucosa como fuente de carbono en un diseño factorial 2³.

La velocidad específica de crecimiento para los medios de cultivo evaluados se muestra en la tabla 20. Existe una correlación entre el crecimiento microbiano y la reducción de la TS en un periodo de 72 h, los valores de μ oscilan entre 0.010 y 0.052. La glucosa como fuente de carbono, permite un crecimiento bacteriano máximo de 0.05 μ en el medio de cultivo 7. Sin embargo, no está asociado a la producción de Bs ya que el medio marcado con el número 5 es el que mejor producción registró.

Tabla 20. Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2³ en glucosa

Medio de Cultivo	Velocidad de crecimiento (μ)	Densidad óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.01025	1.233	120
2	0.01597	1.128	72
3	0.02292	1.07	48
4	0.01452	0.996	72
5	0.02863	1.621	48
6	0.0266	1.47	48
7	0.05298	1.3	24
8	0.02751	1.57	48
9	0.01921	1.356	72
10	0.0197	1.409	72
11	0.01866	1.311	72

5.3.4.1 Análisis de varianza (ANOVA) de la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2³ en glucosa.

El ANOVA en los parámetros de regresión del modelo lineal de tensión superficial se presenta en la tabla 21. El modelo es significativo a un nivel de confiabilidad de 0.05%, dado que el valor de Prob>F fue menor a 0.05. Los factores usados se ajustan al modelo y ejercen un efecto sobre la producción de Bs.

Tabla 21. Análisis de varianza del modelo seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2³ en glucosa

Medio de Cultivo	Velocidad de crecimiento (μ)	Densidad óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.01025	1.233	120
2	0.01597	1.128	72
3	0.02292	1.07	48
4	0.01452	0.996	72
5	0.02863	1.621	48
6	0.0266	1.47	48
7	0.05298	1.3	24
8	0.02751	1.57	48
9	0.01921	1.356	72
10	0.0197	1.409	72
11	0.01866	1.311	72

D. estand= 0.058, R²= 1.000, Media= 44.02, Adj,R²= 0.9998,
C.V%=0.13 Pred R2=N/A, PRESS=290.420,

El efecto de los factores analizados fueron diferentes a cero (F, P< 0.05). La ecuación de primer orden generada, en términos de factores codificados se presenta a continuación con respecto a la TS. Los valores se correlacionan con los parámetros obtenidos experimentalmente (R² = 1.000) y sus efectos sobre la producción de Bs. No obstante, las concentraciones evaluadas en este diseño también se ajustan al modelo con respecto a la TS.

$$TS = 41.23 + 0.50A + 0.55B - 4.10C + 0.78AB - 1.27AC + 0.18BC - 1.55 ABC \quad (\text{Ec. 7})$$

Dónde:

TS= Tensión Superficial

A= Glucosa

B= (NH₄)₂SO₄

C= Peptona de Caseína

Los resultados de reducción de la TS en los 11 medios de cultivo evaluados se muestran en la tabla 22. Los niveles más bajos de TS se obtienen a las 48h en los medios de cultivo marcados con los números 5, 6 y 8 con 36.4, 36.4 y 36.3 dinas/cm, respectivamente. Cabe señalar que en cada medio de cultivo, únicamente la peptona de caseína (fuente de nitrógeno) se encuentra a un nivel alto (4 g/L).

Tabla 22. Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 con glucosa.

Medio de cultivo	Tensión Superficial (dinas/cm)
1	45.1±0.31
2	44.4±0.26
3	41.6±0.23
4	49.8±0.24
5	36.4±0.30
6	36.4±0.30
7	39.4±0.3
8	36.3±0.26
9	45.3±0.26
10	51.5±0.15
11	51.2±0.2

Los valores reales con respecto a los predichos en el modelo estadístico se presentan en la tabla 23. Con respecto al ANOVA de TS, los valores predichos por el modelo contra los reales no difieren y son significativos.

Tabla 23. Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto a la TS en glucosa cepa SMRG-5

Medio de cultivo	Valores Reales	Valores predichos
1	45.1	45.52
2	44.4	44.4
3	41.6	41.6
4	49.8	49.8
5	36.4	36.4
6	36.4	36.4
7	39.4	39.4
8	36.3	36.32
9	45.3	41.23
10	51.5	41.23
11	51.2	41.23

La superficie de respuesta con base en las variables de interés y su influencia con otras, muestran el efecto de cada variable con respecto a las interacciones que ejerce cada factor. La reducción de la TS con respecto a la superficie de respuesta del modelo se presenta en la figura 19. El panel a muestra el efecto de los factores y su gráfica de interacciones entre los factores glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cuando la peptona de caseína se mantiene constante. El efecto de los factores parece imparcial sobre la gráfica. Sin embargo, un ligero declive se observa a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno promoviendo la producción de Bs, puesto que en estos rangos de concentración se encuentran los niveles de optimización. Así mismo, la gráfica de interacciones entre glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ muestra el significado de los valores (desviación estándar) de respuesta TS a niveles altos y bajos de cada factor involucrado (panel b). Por lo tanto, ambas gráficas presentan una correlación de reducción de TS promovida por las bajas concentraciones de cada factor analizado.

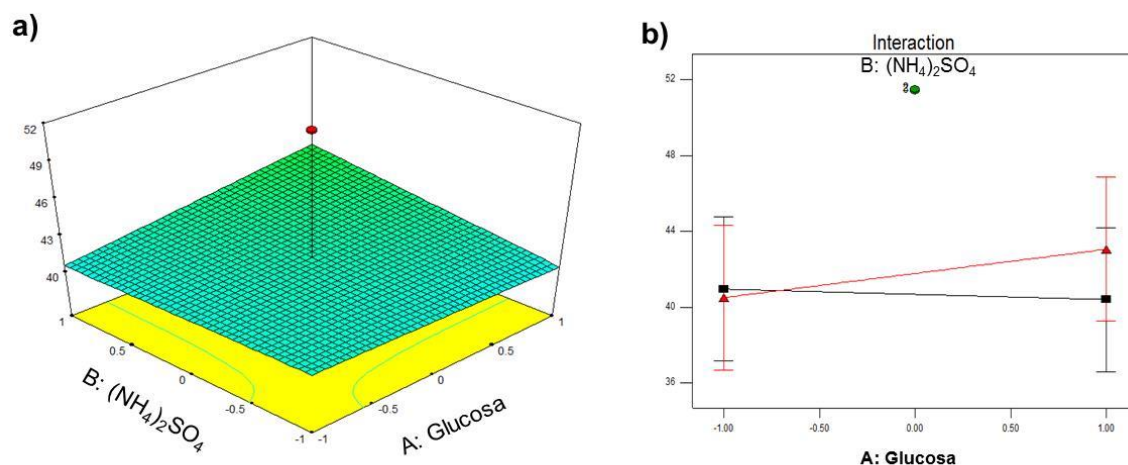


Figura 19. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la TS en la cepa SMRG-5 en glucosa. **a** superficie de respuesta máxima de reducción de la TS con respecto a glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **b**. interacción glucosa - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.3.4.2 Análisis de varianza (ANOVA) del IE_{24} en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glucosa

Con respecto al IE_{24} , el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.01% dado que el valor de probabilidad es menor a 0.05 (tabla 24). El valor de $\text{Prob}>F$ para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección, es decir, los factores empleados para este modelo tienen un efecto de manera individual e interaccionando, sin embargo el E_{24} no se ve favorecido. Los factores y sus interacciones se ajustan al modelo. No obstante, el emplear estas fuentes de carbono y nitrógeno no favorece el E_{24} para esta cepa.

Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo factorial seleccionado con respecto a IE₂₄ en la cepa SMRG-5 con glucosa

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor F	Prob > F
Modelo	243.5	7	34.79	6.366E + 007	<0.0001*
A-Glucosa	0.5	1	0.5	6.366E + 008	<0.0001
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	12.5	1	12.5	6.366E + 009	<0.0001
C-P.					
Caseína	220.5	1	220.5	6.366E + 010	<0.0001
AB	0.5	1	0.5	6.366E + 011	<0.0001
AC	4.5	1	4.5	6.366E + 012	<0.0001
BC	0.5	1	0.5	6.366E + 013	<0.0001
ABC	4.5	1	4.5	6.366E + 014	<0.0001
Curvatura	99.41	1	99.1	6.366E + 015	<0.0001
Error puro	0.00E+00	2	0		
Total	3.43E+02	10			

D. estand= 0.000, R²= 1.000, Media= 6.91, Adj,R²= 1.000, C.V%=0.000
 Pred R2=N/A, PRESS=N/A

La ecuación final en términos del modelo con respecto al IE₂₄ se presenta a continuación.

$$IE_{24} = 8.75 + 0.25A - 1.25B + 5.25C + 0.25AB + 0.75AC + 0.250BC + 0.75ABC \quad (\text{Ec. 8})$$

Dónde:

E₂₄ = Índice de Emulsión

A= Glucosa

B= (NH₄)₂SO₄

C= Peptona de Caseína

Los valores reales con respecto a los predichos en este modelo se presentan en la tabla 25. A pesar de que el análisis se ajusta al modelo, el porcentaje de emulsión no es significativo cuando la glucosa y (NH₄)₂SO₄, interaccionan de manera conjunta.

Tabla 25. Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto al IE₂₄ cepa SMRG-5 en glucosa.

Medio de cultivo	Valores Reales	Valores predichos
1	5	2.5
2	5	2.5
3	3	5.5
4	1	3.5
5	15	12.5
6	15	12.5
7	11	13.5
8	15	17.5
9	2	8.75
10	2	8.75
11	2	8.75

Los resultados del IE₂₄ evaluados a los 11 medios de cultivo en la cepa SMRG-5 con glucosa se presentan en la tabla 26, el porcentaje de emulsión empleando glucosa como fuente de carbono no favorece la producción de Bs en ningún nivel (alto y bajo) de concentración de fuente de carbono y nitrógeno.

Tabla 26. Resultados del IE₂₄ en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glucosa.

Medio de cultivo	Índice de Emulsión IE ₂₄ (%)
1	5±0.23
2	5±0.14
3	3±0.24
4	1±0.23
5	15±0.24
6	15±0.21
7	11±0.21
8	15±0.23
9	2±0.19
10	2±0.18
11	2±0.18

*Promedio de tres observaciones

Los valores de respuesta muestran una variación desde un 2 a un 15%, por lo que los factores analizados glucosa – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cuando la peptona de caseína se mantiene constante, son significativos en el modelo pero no para la producción de Bs que es nuestra respuesta de interés. No obstante, los resultados de superficie de respuesta y su gráfica de interacciones en los 11 medios de cultivo evaluados se presentan en la figura 20, en función de glucosa – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con respecto al IE_{24} . De acuerdo al modelo, los medios de cultivo marcados con los números 5 (Glucosa 12 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75), 6 (Glucosa 14g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75) y 8 (Glucosa 14 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.50 g/L), representan los valores máximos de E_{24} en el modelo. Sin embargo no son resultados favorables a la producción de Bs.

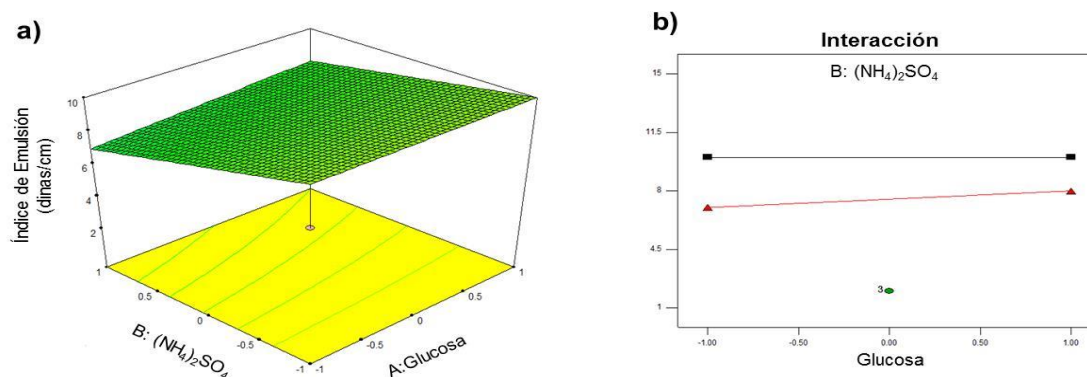


Figura 20. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE_{24} en la cepa SMRG-5 en glucosa. **a** Superficie de repuesta máxima de IE_{24} con respecto a glucosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **b**. Interacción de glucosa - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Con los resultados obtenidos en este diseño factorial empleando glucosa como fuente de carbono en la cepa SMRG-5, no favorece los valores de producción de Bs por lo que se descarta por el momento esta fuente de carbono para dicha producción.

5.3.5 Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa SM3 en glicerol (fuente de carbono)

Se usó un diseño factorial 2^3 para evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de Bs en función del glicerol (fuente de carbono), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y peptona de caseína (fuentes de nitrógeno). Los valores de respuesta se basan en la reducción de la TS e IE_{24} . En la figura 21 se presentan las cinéticas de crecimiento en el de los diferentes medios de cultivo evaluados a la cepa SM3.

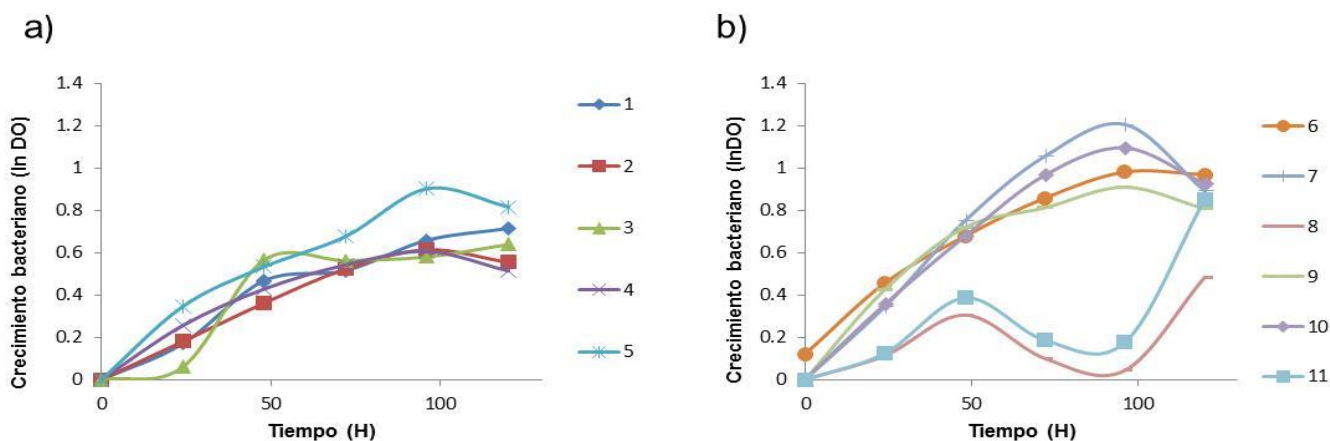


Figura 21. Cinéticas de crecimientos de los 11 tratamientos evaluados en la producción de Bs con glicerol como fuente de carbono en un diseño factorial 2³.

En la tabla 27 se presentan los resultados de la velocidad de crecimiento para los 11 medios de cultivo evaluados en este diseño factorial 2³. Se observa que hay una correlación entre el crecimiento microbiano y la producción de Bs en un periodo de 72 h como máximo, cabe destacar que los valores de μ oscilan entre 0.0182 y 0.3585. En estos ensayos evaluados con glicerol (fuente de carbono), el aumento en la producción de Bs se ve asociado con respecto al crecimiento, es decir; cuando el medio de cultivo presenta un aumento en la biomasa celular la producción de Bs incrementa también.

Tabla 27. Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2³ en glicerol (fuente de carbono).

Medio de Cultivo	Velocidad de crecimiento (μ)	Densidad Óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.02179	0.5158	72
2	0.02201	0.5229	72
3	0.01979	0.563	72
4	0.0182	0.4285	48
5	0.02778	0.5335	48
6	0.03585	0.6785	48
7	0.03075	0.7509	48
8	0.02059	0.3052	48
9	0.02866	0.7197	48
10	0.03575	0.6775	48
11	0.02378	0.3859	48

5.3.5.1 Análisis de varianza (ANOVA) de la tensión superficial de la cepa SM3 en el diseño factorial 2³ en glicerol (fuente de carbono)

La tabla 28 presenta el ANOVA de los parámetros de regresión del modelo lineal de superficie de respuesta, los datos demuestran que el modelo no es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue mayor a 0.05.

El valor de coeficiente de correlación obtenido en el presente estudio fue de 0.30. Para un modelo con buen ajuste, el coeficiente de correlación mínima podría ser de 0.60 [82]. Con respecto a la curvatura esta no fue significativa por lo que los factores estudiados no son lineales.

Tabla 28. Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado en la producción de Bs con respecto a la TS en el diseño factorial 2³, glicerol (fuente de carbono).

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	2.5	7	0.36	1.27	0.5073	no significativo
A-Glicerol	1.05	1	1.05	3.75	0.1923	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15	1	0.15	0.54	0.5389	
C-Peptona de C.	0.78	1	0.78	2.79	0.2368	
AB	0.15	1	0.15	0.54	0.5389	
AC	0.15	1	0.15	0.54	0.5389	
BC	0.061	1	0.061	0.22	0.686	
ABC	0.15	1	0.15	0.54	0.5389	
Curvatura	0.25	1	0.25	0.89	0.4456	no significativo
Error Puro	0.56	2	0.28			
Total	3.31	10				

D. estand= 0.53, R²= 0.8169, Media= 32.45, Adj,R²= 0.1761, C.V%=1.63 Pred R²=N/A, PRESS=N/A,

Adeq Presicion=3.970

El efecto de los factores estudiados fueron diferentes a cero ($F, p < 0.05$). La ecuación de primer orden generada en términos de factores codificados, se presenta en la ecuación 7 con respecto a la TS. Los valores se correlacionan con los parámetros obtenidos experimentalmente ($R^2 = 0.8169$) y sus efectos sobre la producción de Bs. Sin embargo, las concentraciones evaluadas en este modelo no se ajustan al modelo con respecto a la TS. La ecuación final en el modelo factorial seleccionado, en términos de factores codificados se presenta en la ecuación 9.

$$TS = +32.36 - 0.36A - 0.14B - 0.31C + 0.14AB - 0.14AC + 0.087BC - 0.14ABC \quad (\text{Ec. 9})$$

Dónde:

TS = Tensión superficial

A = Glicerol

B = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

C = Peptona de caseína

Los resultados de reducción de la TS evaluado a los 11 tratamientos en el diseño factorial 2^3 se muestran en la tabla 29. Los niveles más bajos de TS se obtienen a las 48 horas en los medios de cultivo marcados con los números 6 y 8, en un rango de 31.5 y 33.4 dinas/cm.

Tabla 29. Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3 con glicerol como fuente de carbono.

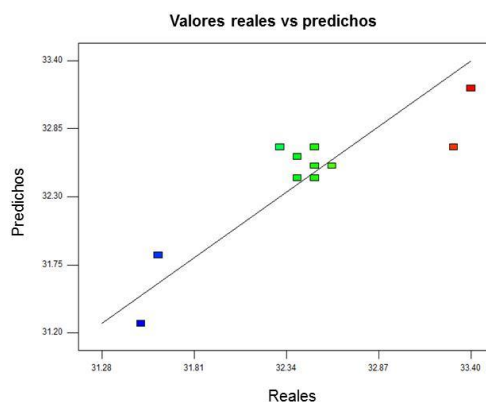
Número de tratamientos	Tensión Superficial* (dinas/cm)
1	33.4 ± 0.20
2	32.4 ± 0.30
3	32.4 ± 0.30
4	32.5 ± 0.36
5	32.6 ± 0.20
6	31.6 ± 0.26
7	32.5 ± 0.15
8	31.5 ± 0.28
9	33.3 ± 0.32
10	32.3 ± 0.20
11	32.5 ± 0.11

*Promedio de seis observaciones

En la tabla 30 se presentan los valores reales con respecto a los predichos del modelo, así como su gráfica (figura 22). Cuando son seleccionados los factores con interacción, los cuales tienen efecto sobre la producción de Bs.

Tabla 30. Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2^3 con respecto a la TS en glicerol cepa SM3

Medio de cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	33.4	32.587
2	32.4	32.307
3	32.4	32.133
4	32.5	32.413
5	32.6	32.413
6	31.6	32.133
7	32.5	32.307
8	31.5	32.587
9	33.3	32.36
10	32.3	32.36
11	32.5	32.36

**Figura 22.** Valores Reales y predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2^3 en glicerol (fuente de carbono).

El análisis de superficie de respuesta basado en las variables de interés y su influencia con otras, muestran los valores de respuesta y el efecto de cada variable, con el objeto de entender el efecto de cada factor, se requiere deducir la naturaleza de las interacciones. Los resultados de la mejor respuesta de reducción de la TS y la gráfica de interacciones entre dos factores se muestran en la figura 23.

La superficie de respuesta en la reducción de la tensión superficial, se muestra en el panel a) de la figura 23; en función del glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cabe destacar que, el efecto de los factores se presenta cuando las concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno son altas en el medio de cultivo (glicerol 14 gl^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 gl^{-1} y peptona de caseína 4 gl^{-1}) promoviendo la producción de Bs. Así mismo,

la gráfica de interacciones entre glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ muestra el significado de los valores (desviación estándar) de respuesta (TS) a niveles altos y bajos de cada factor involucrado (panel b). Por lo que, en ambas gráficas se observa una correlación de la reducción de la TS promovida por las altas concentraciones de cada factor analizado.

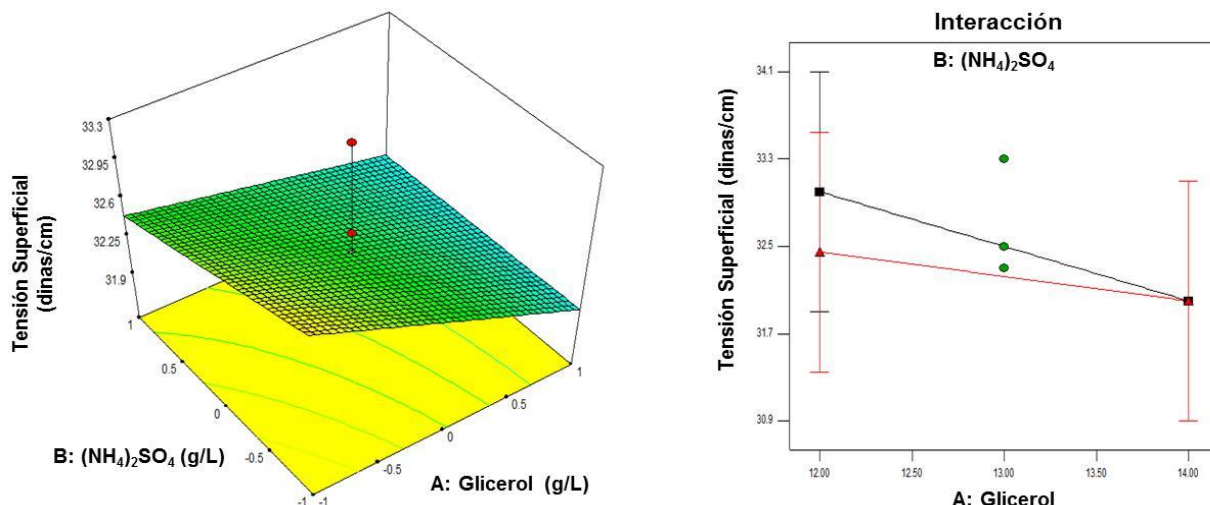


Figura 23. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3 en glicerol. **a** superficie de respuesta máxima de reducción de TS con respecto a glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
b. Interacción de glicerol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.3.5.2 Análisis de varianza (ANOVA) del índice de emulsión (IE_{24}) en el diseño factorial 2^3 cepa SM3 en glicerol (fuente de carbono)

Contrario al análisis de varianza de la TS en el IE_{24} presentado en tabla 31, se indica que el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. Los valores de los coeficientes de correlación obtenidos en el presente estudio fueron de 0.31. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección es decir, los factores estudiados tienen un efecto de manera individual e interacción en la generación de emulsiones y una alta producción de Bs. Los factores y sus concentraciones se ajustan al modelo y hay una curvatura significativa, por lo que este análisis no requiere la selección de aquellos factores que ejerzan un efecto sobre la producción de Bs con respecto al IE_{24} .

Tabla 31. Análisis de varianza del modelo factorial seleccionado con respecto al IE₂₄

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	25.42	7	3.63	83.8	0.0118*	significativo
A-Glicerol	13.78	1	13.78	318.03	0.0031*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	1.36	1	1.36	31.41	0.0304*	
C-Peptona de C.	3	1	3	69.26	0.0141*	
AB	0.91	1	0.91	21.03	0.0444*	
AC	5.28	1	5.28	121.87	0.0081*	
BC	1.05	1	1.05	24.26	0.0388*	
ABC	0.031	1	0.031	0.72	0.4852*	
Curvatura	53.01	1	53.01	1223.33	0.0008	significativo
Error Puro	0.087	2	0.043			
Total	78.52	10				

D. estand= 0,21 R²= 0.9966, Media= 75.32, Adj,R²= 0.9847, C.V%=0.28 Pred R²=N/A, PRESS=N/A, Adeq Precision=43.372

La ecuación final en términos de modelo factorial seleccionado, con respecto al IE₂₄ se presenta a continuación.

$$IE_{24} = 76.66 + 1.31A + 0.41B + 0.61C - 0.34AB + 0.81AC + 0.36BC + 0.063ABC \quad (\text{Ec. 10})$$

Los valores reales contra los predichos del modelo se muestran en la tabla 32. La gráfica demuestra que estos factores se ajustan al modelo cuando son seleccionados los factores glicerol, (NH₄)₂SO₄ y peptona de caseína así como sus interacciones (figura 24). Por lo que este análisis se ajusta, con respecto al aumento en la producción de Bs con respecto a la generación de porcentajes de emulsión altos.

Tabla 32. Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2³ con respecto al IE₂₄ cepa SM3 en glicerol

Medio de cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	75.1	75.437
2	76.9	76.563
3	76	75.663
4	76.2	76.537
5	74.1	74.443
6	78.9	78.557
7	76.2	75.857
8	79.9	80.223
9	71.9	76.66
10	71.8	76.66
11	71.5	76.66

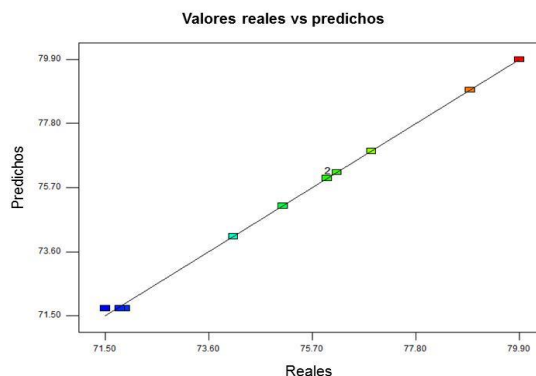


Figura 24. Valores Reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2³ en glicerol (fuente de carbono).

Los resultados de IE₂₄ evaluados a los 11 medios de cultivo del diseño factorial 2³ en la cepa pigmentada (SM3) se presentan en la tabla 33 con su respectiva desviación estándar.

Tabla 33. Resultados del IE₂₄ en el diseño factorial 2³ de la cepa SM3 con glicerol.

Número de tratamientos	Índice de Emulsión IE ₂₄ (%)
1	75.1 ± 0.50
2	76.9 ± 0.20
3	76.0 ± 0.30
4	76.2 ± 0.36
5	74.1 ± 0.50
6	78.9 ± 0.26
7	76.2 ± 0.35
8	79.9 ± 0.28
9	71.9 ± 0.32
10	71.8 ± 0.46
11	71.5 ± 0.41

*Promedio de seis observaciones.

Los valores de respuesta muestran una variación de 68.5 a 79.9 %, demostrando que los factores analizados (glicerol, (NH₄)₂SO₄ y peptona de caseína) presentan un efecto significativo con respecto a los valores de respuesta (TS e IE₂₄), por lo que la producción de Bs aumentó significativamente los tratamientos 6 y 8 pues emulsionan el keroseno hasta en un 79.9%.

No obstante, los resultados de superficie de respuesta y la gráfica de interacciones entre factores se presentan en la figura 25, en función del glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con respecto al IE_{24} . Con respecto al modelo, se observa que el factor $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no tiene un efecto en la interacción de factores.

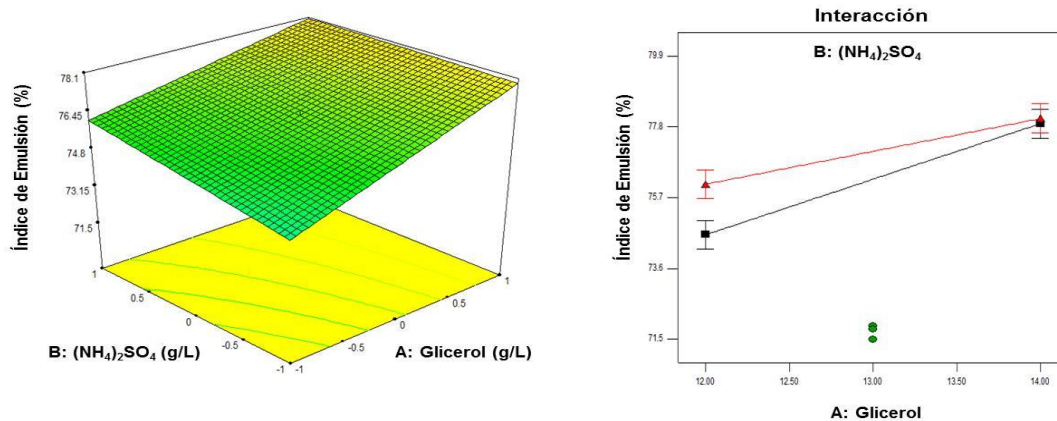


Figura 25. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el índice de IE_{24} en la cepa SM3 en glicerol. **a** superficie de respuesta máxima de IE_{24} con respecto a glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ **b**. Interacción de glicerol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

De acuerdo al modelo, los tratamientos marcados con el número 6 (glicerol 14 gl^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 gl^{-1} , peptona de caseína 4 gl^{-1}) y 8 (glicerol 14 gl^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 gl^{-1} , peptona de caseína 4 gl^{-1}) representan los valores máximos de E_{24} favoreciendo la producción de Bs en ambos medios de cultivo ya que logran reducir la TS a 31.6 y 31.5 días/cm, así como emulsionar el hidrocarburo en un 78.9 y 79.9 % respectivamente. Sin embargo, existe una diferencia entre ambos medios con respecto a la pigmentación.

El tratamiento 6 logra pigmentar el medio en un tono fucsia, mientras que el tratamiento 8 presenta un rosa tenue como se observa en la figura 26.

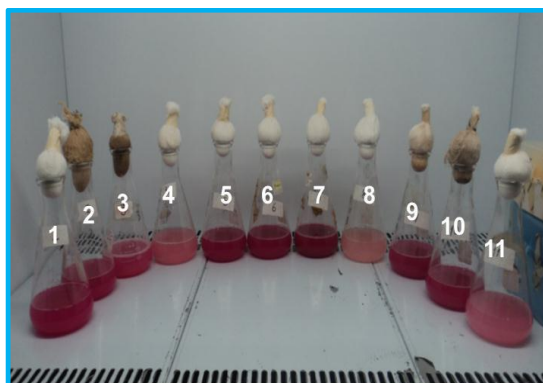


Figura 26. Perfil fisiológico de las cinéticas de crecimiento evaluado a los 11 medios de cultivo de la cepa SM3 en glicerol.

Ambos medios de cultivo son favorables a la producción de Bs. Sin embargo, emplear un medio de cultivo que contiene pigmento (prodigiosina) impide en algunos casos llevar a cabo una purificación de Bs completa [83]. Por lo anterior, y debido a las características que presenta el medio de cultivo marcado con el número 8, se usará a futuro para la extracción de Bs.

Emplear glicerol en el medio de cultivo como fuente de carbono para la producción de Bs ha favorecido la reducción de la TS a 31.5 dinas/cm y emulsionar hidrocarburo en un 79.9% en solo 48 hr. Cabe destacar que hoy en día, no existen reportes de cepas de *S marcescens* que logren reducir la tensión superficial a 31 dinas/cm así como lo ha mostrado esta cepa por lo que la hace única en su especie hasta ahora reportada.

De manera similar, se evaluó el efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa mutante química SMRG-5 en glicerol, ya que esta fuente de carbono favorece la producción de Bs en la cepa silvestre SM3. Sin embargo, no se llevó a cabo el estudio con glucosa (fuente de carbono) en la cepa SMRG-5.

5.3.6 Efecto del medio de cultivo para la producción de Bs por la cepa mutante química SMRG-5 en glicerol

Se ha reportado que cepas de *Serratia marcescens* (NSK-1) son capaz de producir un Bs en un medio de cultivo que contiene glicerol como fuente de carbono [84]. Con base a este antecedente, se planteó evaluar el efecto que ejercen la fuente de carbono y nitrógeno en un diseño experimental con la cepa SMRG-5 no pigmentada.

Un diseño experimental 2^3 fue empleado en la cepa SMRG-5, para evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de Bs en función de glicerol (fuente de carbono) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y peptona de caseína (fuente de nitrógeno). Los valores de respuesta empleados fueron: reducción de la TS e IE_{24} en base a las cinéticas de crecimiento evaluadas durante 72 hr de incubación (Figura 27).

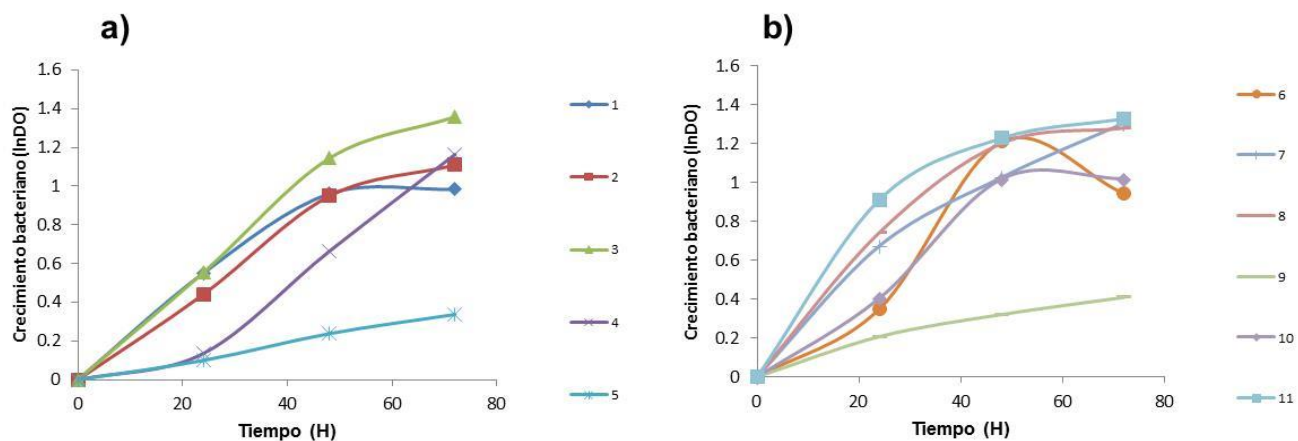


Figura 27. Cinética de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados mediante el diseño factorial 2^3 de la cepa mutante SMRG-5 en glicerol

En la tabla 34 se presentan los resultados de la velocidad de crecimiento para los 11 medios de cultivo evaluados en este diseño factorial 2^3 con respecto a esta cepa no pigmentada. La velocidad de crecimiento se ve asociada con el aumento en la producción de Bs, en un periodo de 72 h como máximo, cabe señalar que los valores de μ oscilan entre 0.010103 y 0.06175. En estos ensayos evaluados con glicerol (fuente de carbono), el aumento en la producción de Bs se ve favorecido con respecto al crecimiento, es decir; cuando el medio de cultivo presenta un aumento en la biomasa celular la producción de Bs incrementa también.

Tabla 34. Velocidad de crecimiento de los 11 medios de cultivo evaluados en el diseño factorial 2^3 en glicerol (fuente de carbono) cepa SMRG-5.

Medio de Cultivo	Tasa específica de crecimiento (μ)	Densidad Óptica (abs)	Tiempo (H)
1	0.01687	0.9839	72
2	0.03099	1.1088	72
3	0.06175	1.435	48
4	0.03055	1.1644	72
5	0.04633	0.3373	72
6	0.10103	1.2095	72
7	0.05608	1.3048	72
8	0.0215	1.2014	48
9	0.00334	0.4087	72
10	0.01168	1.0184	72
11	0.01196	1.3273	72

5.3.6.1 Análisis de varianza (ANOVA) de la TS en el diseño factorial 2³, SMRG-5 en glicerol (fuente de carbono)

El análisis de varianza (ANOVA) de los parámetros de regresión lineal con respecto al modelo se presenta en la tabla 35, los datos demuestran que el modelo es significativo y que los factores evaluados a dichas concentraciones y sus interacciones (factores marcados con *), se ajustan al modelo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue mayor a 0.05.

Los resultados de reducción de la TS, con su desviación estándar de los 11 medios de cultivo analizados mediante el diseño factorial 2³ se muestran en la tabla 35. Los niveles de reducción más bajos se registraron a las 72 h de cultivo, posterior a este periodo los niveles se mantienen constantes. Los valores de TS muestran una variación de 40.4 a 30.2 dinas/cm por lo que, el medio de cultivo marcado con el número 1, describe el mayor efecto que ejercen los factores estudiados, con respecto a la reducción de la TS a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno la actividad Bs se ve favorecida.

Tabla 35. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5 en glicerol (fuente de carbono)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	67.85	7	9.69	223.68	0.0045*	significativo
A-Glicerol	6.3	1	6.3	145.41	0.0068*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	4.65	1	4.65	107.34	0.0092*	
C-Peptona de C.	22.11	1	22.11	510.26	0.002*	
AB	2.53	1	2.53	58.41	0.0167*	
AC	6.66	1	6.66	153.72	0.0064*	
BC	14.31	1	14.31	330.26	0.003*	
ABC	11.28	1	11.28	260.34	0.0038*	
Curvatura	1.13	1	1.13	26.16	0.0362	significativo
Error Puro	0.087	2	0.043			
Total	69.07	10				

D. estand= 0.21 R²= 0.9987, Media= 32.89, Adj,R²= 0.9943, C.V%=0.63 Pred R²=N/A, PRESS=N/A, Adeq Presicion=54.171

El análisis de varianza (ANOVA) nos muestra que el efecto de los factores analizados fueron significativamente diferentes a cero (F_{prueba} , $p < 0.0001$) mientras que la falta de ajuste debida al modelo no lo fue (F , $p = 0.0374$). Por lo tanto, los factores glicerol, $(NH_4)_2SO_4$ y peptona de caseína ejercen un efecto en el incremento en la producción de Bs, en la TS (Tabla 36). Estos datos se corroboran con la ecuación de primer orden que se generó en términos de factores codificados (Ecuación 11) con los valores de respuesta de reducción de la tensión superficial. Los valores estimados se correlacionan con los parámetros obtenidos experimentalmente ($R^2 = 0.9987$) y sus efectos en el aumento de producción de Bs.

Tabla 36. Resultados de la TS en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5

Número de tratamientos	Tensión superficial (dinas/cm)*
1	30.2
2	31.5
3	32.6
4	31.4
5	40.4
6	33.3
7	32.7
8	32.6
9	32.6
10	32.2
11	32.3

*Promedio de seis observaciones

$$TS = 33.09 - 0.89A - 0.76B + 1.66C + 0.56AB - 0.91AC - 1.34BC + 1.19ABC \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

A = Glicerol

B = $(NH_4)_2SO_4$

C = Peptona de caseína

Con el resultado arrojado por el análisis de varianza con respecto a la TS y seleccionando los factores que ejercen un efecto en el aumento de la producción de Bs, el modelo ajustado en términos de valores reales contra los predichos se especifican en la tabla 37. Así, como su gráfica (figura 28).

Tabla 37. Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5 en glicerol (fuente de carbono)

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	30.2	36.8
2	31.5	38.06
3	32.6	38.06
4	31.4	36.8
5	40.4	42.5
6	33.3	39
7	32.7	39
8	32.6	42.5
9	32.6	39.09
10	32.2	39.09
11	32.3	39.09

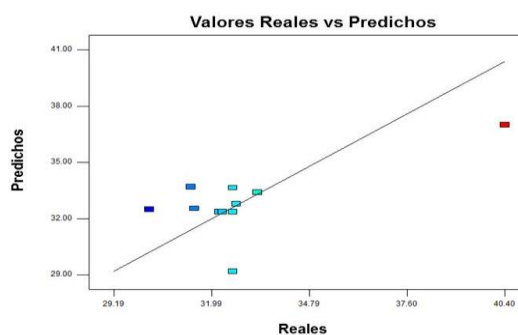


Figura 28. Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2³ en glicerol (fuente de carbono).

Los resultados de superficie de respuesta con en la reducción de la TS se presentan en la figura 29 en función de glicerol y (NH₄)₂SO₄. El efecto del medio de cultivo se observa a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno favoreciendo la producción de Bs. Así mismo, la gráfica de interacciones en la misma figura panel b, se observa que a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno los factores tienen un efecto en el medio de cultivo para la producción de Bs.

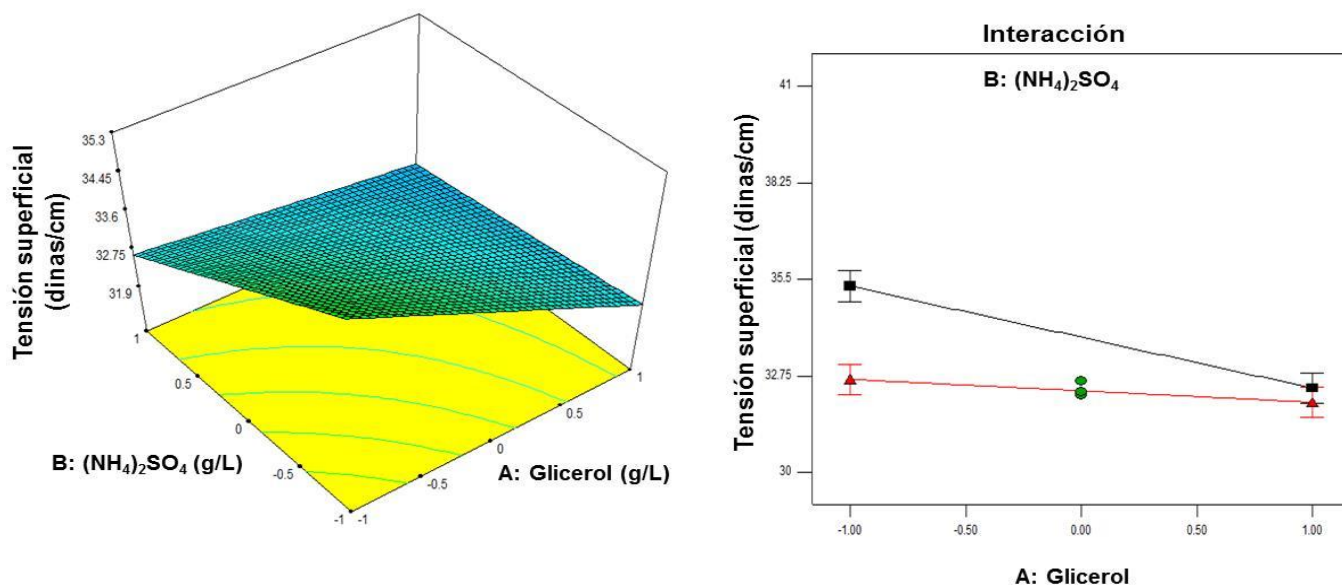


Figura 29. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5. **a** superficie de respuesta máxima con respecto a glicerol y (NH₄)₂SO₄. **b** gráfica de interacción entre glicerol - (NH₄)₂SO₄.

5.3.6.2 Análisis de varianza (ANOVA) del IE₂₄ en el diseño factorial 2³ en glicerol (fuente de carbono) cepa SMRG-5

El análisis de varianza (ANOVA) para el IE₂₄, se indica en la tabla 38. Los parámetros de regresión lineal de superficie de respuesta, muestran que este modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección es decir, los factores estudiados tienen un efecto de manera individual (Glicerol y (NH₄)₂SO₄) e interacción (Glicerol – Peptona de caseína y Glicerol- (NH₄)₂SO₄- Peptona de caseína) en la generación de emulsiones y un aumento en la producción de Bs. Sin embargo, a pesar de que hay un efecto en los factores este modelo aún requiere de ajuste; es decir, no se requiere de todos los factores para el aumento en la producción de Bs y los niveles en IE₂₄ son altos a pesar de la falta de ajuste.

Tabla 38. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE₂₄ de la cepa SMRG-5 en glicerol (fuente de carbono).

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	4621.14	7	660.16	1.98E+05	<0.0001*	Significativo
A-Glicerol	486.72	1	486.72	1.46E+05	<0.0001*	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	792.02	1	792.02	2.38E+05	<0.0001*	
C-Peptona de C.	192.08	1	192.08	5.76E+04	<0.0001*	
AB	528.12	1	528.12	1.58E+05	<0.0001*	
AC	1176.13	1	1176.13	3.53E+05	<0.0001*	
BC	206.04	1	206.04	6.18E+04	<0.0001*	
ABC	1240.02	1	1240.02	3.72E+05	<0.0001*	
Curvatura	190.4	1	190.4	5.71E+04	<0.0001	significativo
Error Puro	6.67E-03	2	3.33E-03			
Total	4811.54	10				

D. estand= 0.058 R²= 1.0000, Media= 71.67, Adj,R²= 1.0000, C.V%=0.081 Pred R²=N/A, PRESS=N/A, Adeq Presición=1551.032

La ecuación final en términos del modelo factorial seleccionado, se presenta en la ecuación 12 donde todos los factores ejercen un efecto sobre la producción de Bs con relación a la respuesta IE₂₄.

$$IE_{24} = 69.13 - 7.80A + 9.95B + 4.90C + 8.13AB + 12.13AC - 5.07BC - 12.45ABC \quad (\text{Ec.12})$$

Los resultados del IE₂₄ evaluados en el diseño factorial 2³ en función de la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (NH₄)₂SO₄ a bajas concentraciones se presenta en la tabla 39. Los 11 medios de cultivo presentaron una variación de 60.5 a 89.7 % con su respectiva desviación estándar. Los factores estudiados (glicerol, (NH₄)₂SO₄, peptona de caseína y sus interacciones) tienen un efecto significativo y promueven la producción de Bs cuando los factores se presentan a bajas concentraciones.

Tabla 39. Resultados del IE₂₄ en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5, glicerol

Número de tratamientos	Índice de Emulsión (%)
1	89.7±0.02
2	84.7±0.01
3	78.6±0.02
4	79.9±0.07
5	60.5±0.04
6	77.8±0.02
7	78.9±0.01
8	78.9±0.01
9	78.4±0.01
10	78.5±0.02
11	78.5±0.01

*Promedio de tres observaciones,
nueve replicas

El análisis de varianza con respecto a los valores reales vs predichos se muestra en la tabla 40 con su respectiva gráfica (figura 30), como se observa la diferencia entre ambos resultados ya que el efecto de los factores con respecto a la respuesta TS se encuentra dentro de los niveles óptimos de producción

Tabla 40. Resultados del IE₂₄ valores reales vs predichos, en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5, glicerol

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	89.7	74.54
2	84.7	34.02
3	78.6	78.18
4	79.9	70.18
5	60.5	60.08
6	77.8	68.08
7	78.9	63.72
8	78.9	104.24
9	78.4	69.13
10	78.5	69.13
11	78.5	69.13

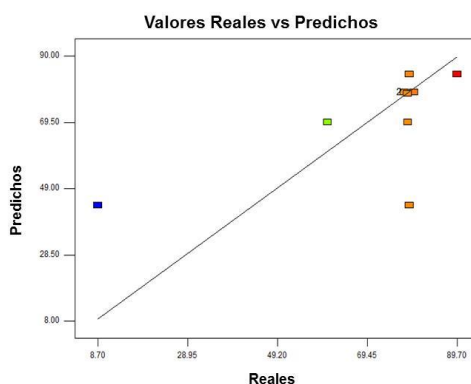


Figura 30. Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^3 en glicerol (fuente de carbono) con respecto al IE_{24} .

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 31a), sustenta los datos de respuesta óptima en el IE_{24} , indicando que a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno se alcanza un alto porcentaje de emulsión. La gráfica de interacciones (figura 31b) correlaciona los datos de superficie de respuesta a bajas concentraciones de cada factor involucrado. De acuerdo al modelo, el tratamiento marcado con el número 1 (glicerol, 12 gl^{-1} y $(NH_4)_2SO_4$, 0.75 gl^{-1}) es el mejor medio de cultivo en la producción de Bs, ya que emulsiona el medio en un 89.7%.

Roldán-Carrillo [80] y Matsuyama, [83] han estudiado la producción de Bs empleando diseños experimentales por cepas de *S. marcescens* (SmSA pigmentada y NS 25 no pigmentada, respectivamente). Sin embargo, solo han logrado reducir la TS a 33 y 33.9 dinas/cm. La cepa SMRG-5 de *S. marcescens* es de gran interés ya que reduce la TS (30.8 dinas/cm) por debajo de otras cepas previamente reportadas.

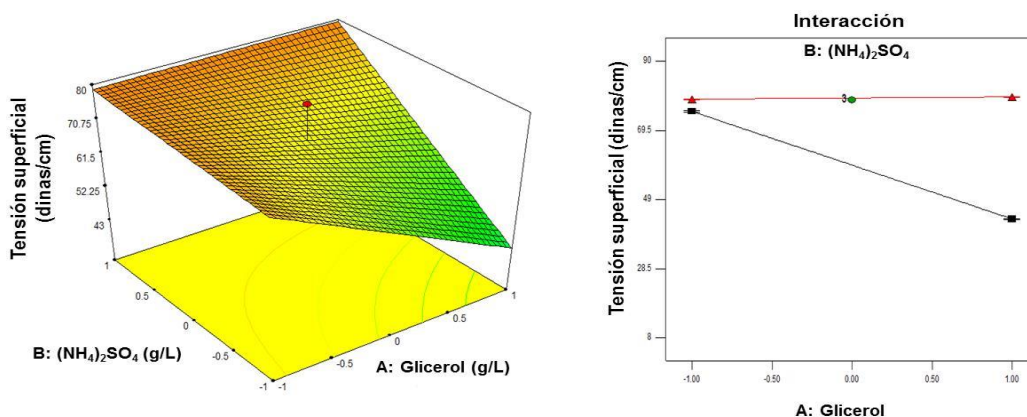


Figura 31. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE_{24} de la cepa SMRG-5. **a** superficie de respuesta máxima del IE_{24} con respecto a glucosa y $(NH_4)_2SO_4$ **b**. Interacción de Glucosa - $(NH_4)_2SO_4$

Los factores evaluados en los diseños factoriales de ambas cepas, nos permitieron seleccionar el medio de cultivo con mayor producción de Bs; como respuesta a la tensión superficial e índice de emulsión. Por lo tanto, para una producción de Bs a mayor escala se tomarán de cada cepa el medio de cultivo adecuado.

5.3.7 Medición de la actividad Bs a las cepas SM3 y SMRG-5 por el método de placa (Whilhelmy) en el diseño factorial 2³ en glicerol

5.3.7.1 Diseño factorial 2³, medición de la TS en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy)

Nuevamente el uso de la herramienta estadística fue empleada, bajo el diseño factorial 2³ para evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de Bs; en función del glicerol, (NH₄)₂SO₄ y peptona de caseína, como se mencionó en el apartado anterior. Los valores de respuesta se basan en la reducción de la TS con base en el método de placa (ver materiales y métodos), mientras que el IE₂₄ fue evaluado en keroseno crudo (ensayos previos kerosina). En esta sección se presentan únicamente los resultados de actividad Bs, que involucra la TS, IE₂₄, locomoción en swarming y actividad hemolítica en caja.

El análisis de varianza (ANOVA) en los parámetros de regresión lineal con relación al modelo se presenta en la tabla 41, los datos demuestran que el modelo es significativo y que los factores evaluados a dichas concentraciones y sus interacciones (factores marcados con *), se ajustan al modelo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue mayor a 0.05. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección. Cada factor analizado ejerce un efecto de manera individual (Glicerol y (NH₄)₂SO₄) e interacción (Glicerol – Peptona de caseína y Glicerol- (NH₄)₂SO₄- Peptona de caseína) En este análisis aún puede ajustarse el modelo, es decir, no se requiere de todos los factores o interacciones (glicerol-(NH₄)₂SO₄ o glicerol Peptona de caseína) para un incremento en la producción de Bs.

Tabla 41. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2³ de la cepa SM3 en glicerol, método de placa (Whilhelmy).

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado Medio	Valor- F	Prob > F	Observaciones	
Modelo	2.5	7	0.36	1.27	0.5073	significativo	
A-Glicerol	1.05	1	1.05	3.75	0.1923		
B- (NH ₄) ₂ SO ₄	0.15	1	0.15	0.54	0.5389		
C-Pep. Casein	0.78	1	0.78	2.79	0.2368		
AB	0.15	1	0.15	0.54	0.5389		
AC	0.15	1	0.15	0.54	0.5389		
BC	0.061	1	0.061	0.22	0.686		
ABC	1.05	1	0.15	0.54	0.5389		
Curvatura	0.25	1	0.25	0.89	0.4456		significativo
Error puro	0.56	2	0.28				
Total	3.31	10	.				

Des. Stand= 0.21, R²= 0.9987, Media= 32.89, Adj,R²= 0.9943, C.V%=0.63 Pred R²=-N/A, PRESS=N/A , Adeq Presicion=54.171

La reducción de la TS, con su desviación estándar de los 11 medios de cultivo analizados mediante el diseño factorial 2³ se muestran en la tabla 42. Los niveles de reducción de TS se mantiene con el mismo patrón que en el ensayo anterior, es decir a altas concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno se registran los mejores resultados de actividad Bs, en este ensayo los valores de TS muestran una variación de 28.4 y 26.5, estos resultados son parámetros óptimos de actividad Bs comparados con los datos registrados con el anillo de iridio previamente empleado, donde los datos oscilan entre 40.4 a 30.2 dinas/cm por lo que, el medio de cultivo marcado con el número 8, describe el mayor efecto que ejercen los factores estudiados, con respecto a la reducción de la TS. .

Tabla 42. Resultados de la TS en el diseño factorial 2³ de la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy).

Número de tratamientos	Tensión superficial (dinas/cm)*
1	28.4
2	27.4
3	27.4
4	27.5
5	27.6
6	26.6
7	27.5
8	26.5
9	28.3
10	27.3
11	27.5

*Promedio de seis observaciones

El análisis de varianza (ANOVA) nos muestra que el efecto de los factores analizados fueron significativamente diferentes a cero ($F_{prueba}, p < 0.0045$), sin validar el modelo, ya que los valores de actividad Bs son favorables a la actividad Bs. No obstante, los parámetros de optimización no aplican para este diseño factorial ya que los factores no se ajustan al modelo. Los datos arrojados se corroboran mediante la ecuación de primer orden generada, en términos de factores codificados (Ecuación 13).

$$TS = 27.36 - 0.36A - 0.14B - 0.31C + 0.14AB - .014AC + 0.087BC - 0.14ABC \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde:

A = Glicerol

B = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

C = Peptona de caseína

El resultado arrojado por el análisis de varianza con respecto a la TS y los factores seleccionados ejercen un efecto en el aumento de la producción de Bs, el modelo ajustado en términos de valores reales contra los predichos se especifican en la tabla 43. Así, como su gráfica (figura 32).

Tabla 43. Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SM3, método de la placa.

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	28.4	28.9
2	27.4	27.401
3	27.4	27.379
4	27.5	27.499
5	27.6	27.605
6	26.6	26.605
7	27.5	27.495
8	26.5	26.495
9	28.3	27.36
10	27.3	27.36
11	27.5	27.36

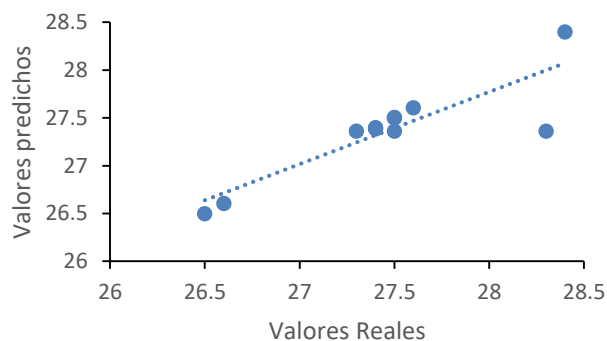


Figura 32. Valores reales vs predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2^3 , en glicerol, Método de la placa (Whilhelmy).

La superficie de respuesta en la reducción de la TS se presentan en la figura 33 en función de glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El efecto del medio de cultivo se observa a altas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno favoreciendo la producción de Bs. Así mismo, la gráfica de interacciones en la misma figura panel b, se observa que a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno los factores tienen un efecto en el medio de cultivo para la producción de Bs.

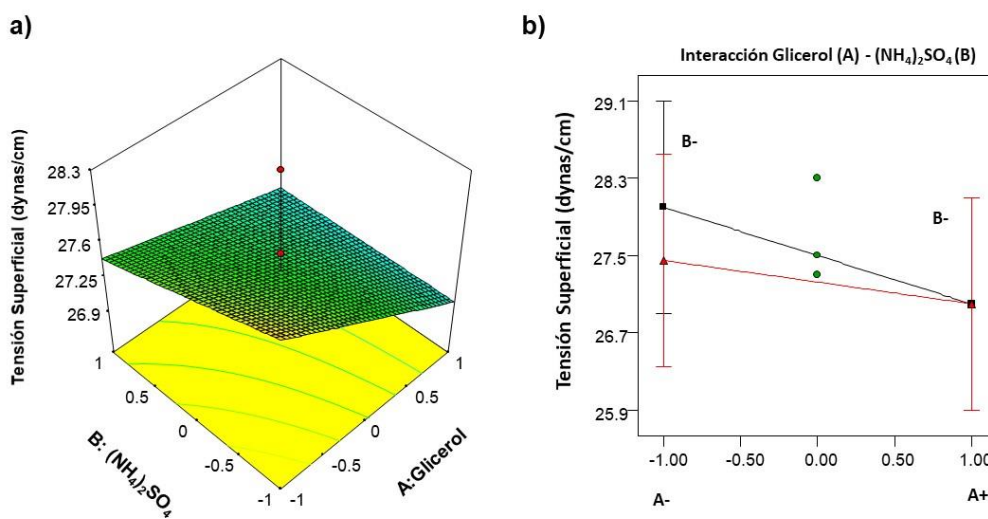


Figura 33. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy). **a** superficie de respuesta máxima con respecto a glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **b** gráfica de interacción entre glicerol - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.3.7.2 Diseño factorial 2³, medición del IE₂₄ en la cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy)

El análisis de varianza (ANOVA) para el IE₂₄, se indica en la tabla 44. Los parámetros de regresión lineal de superficie de respuesta, muestran que este modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección es decir, los factores estudiados tienen un efecto de manera individual (Glicerol y (NH₄)₂SO₄) e interacción (Glicerol – Peptona de caseína y Glicerol- (NH₄)₂SO₄- Peptona de caseína). Al igual que en la TS este modelo carece de ajuste, es decir no se requieren de todos los factores o interacciones para incremental la actividad Bs. Sin embargo los valores de IE₂₄ son favorables y se encuentran dentro de un rango sin cambio significativo por lo que no es necesario llevarlo a optimización.

Tabla 44. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE₂₄ de la cepa SM3 en glicerol, método de la placa (Whihelmy)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F	
Modelo	4621.14	7	660.16	1.980+005	<0.0001	significativo
A-Glicerol	486.72	1	486.72	1.46E+05	<0.0001	
B- (NH ₄) ₂ SO ₄	792.02	1	792.02	2.38E+05	<0.0001	
C-Pep. Casein	192.08	1	192.08	57624	<0.0001	
AB	528.13	1	528.13	1.58E+05	<0.0001	
AC	1176.13	1	1176.13	3.53E+05	<0.0001	
BC	206.04	1	206.04	61813.5	<0.0001	
ABC	1240.02	1	1240.02	3.72E+05	<0.0001	
Curvatura	190.4	1	190.4	57120.05	<0.0001	significativo
Error puro	6.67E-03	2	3.33E-03			
Total	4811.54	10	.			

Des Est= 0.058, R²= 1.000, Media= 71.67, Adj,R²= 1.000, C.V%=0.081 Pred R²=-N/A, PRESS=N/A , Adeq Presición=1551.032

La ecuación final en términos del modelo factorial seleccionado, se presenta en la ecuación 14 donde todos los factores ejercen un efecto sobre la producción de Bs con relación a la respuesta IE₂₄.

$$IE_{24} = 76.66 + 1.31A + 0.41B + 0.61C - 0.34AB + 0.81AC + 0.36BC - 0.063ABC \quad (\text{Ec. 14})$$

Los resultados del IE₂₄ evaluados en este diseño factorial 2³ en función de la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (NH₄)₂SO₄, a altas concentraciones se presenta en la tabla 45. Los 11 medios de cultivo no presentan variación significativa y el porcentaje oscila entre el 79.9 y 71.5 % su respectiva desviación estándar. Los factores estudiados (glicerol, (NH₄)₂SO₄, peptona de caseína y sus interacciones) tienen un efecto significativo y promueven la producción de Bs cuando los factores se presentan a altas concentraciones.

Tabla 45. Resultados del IE₂₄ en el diseño factorial 2³ de la cepa SM3

Número de tratamientos	Índice de emulsión (%)
1	75.01±0.02
2	76.9±0.01
3	76±0.02
4	76.2±0.07
5	74.1±0.04
6	78.9±0.02
7	76.2±0.01
8	79.9±0.01
9	71.9±0.01
10	71.8±0.02
11	71.5±0.01

*Promedio de tres observaciones, nueve replicas

El análisis de varianza con respecto a los valores reales vs predichos se muestra en la tabla 46 con su respectiva gráfica (figura 34), como se observa no hay una diferencia entre ambos resultados ya que el efecto de cada factor con base en la respuesta se encuentra dentro de los niveles óptimos de emulsión para esta cepa

Tabla 46. Resultados del IE₂₄ valores reales vs predichos en el diseño factorial 2³ de la cepa SM3, método de placa (Whilhelmy)

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	75.1	75.16
2	76.9	76.84
3	76	75.94
4	76.2	76.26
5	74.1	74.04
6	78.9	78.96
7	76.2	76.96
8	79.9	79.82
9	71.9	76.66
10	71.8	76.66
11	71.5	76.66

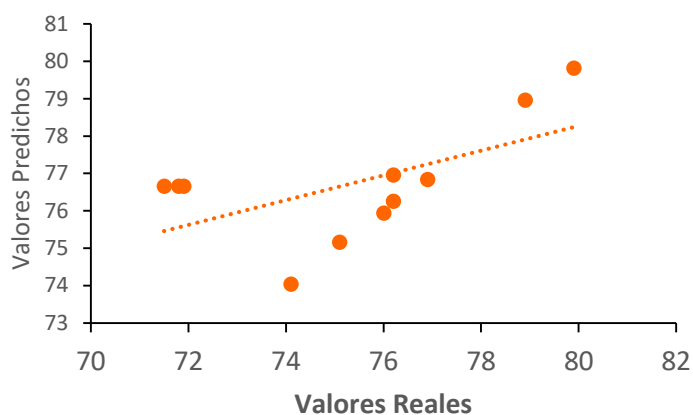


Figura 34. Valores Reales y predichos de la cepa SM3 en el diseño factorial 2³ en glicerol con respecto al IE₂₄. Metodo de la placa (Whilhelmy)

Los valores en niveles altos de concentración de carbono y nitrógeno incrementan la actividad emulsificante en esta cepa, aun a pesar de que este diseño no es el más adecuado para niveles de optimización, por lo que no fue necesario recurrir a parámetros de

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 35a), sustenta los datos de respuesta optima en el IE₂₄, indicando que a niveles altos de carbono y se alcanza un alto porcentaje de emulsión. La gráfica de interacciones (figura 35b) correlaciona los datos de superficie de respuesta de cada factor involucrado. De acuerdo al modelo, el tratamiento marcado con el número 8 es el medio de cultivo favorable a la producción de Bs, ya que emulsiona el medio en un 79.9%.

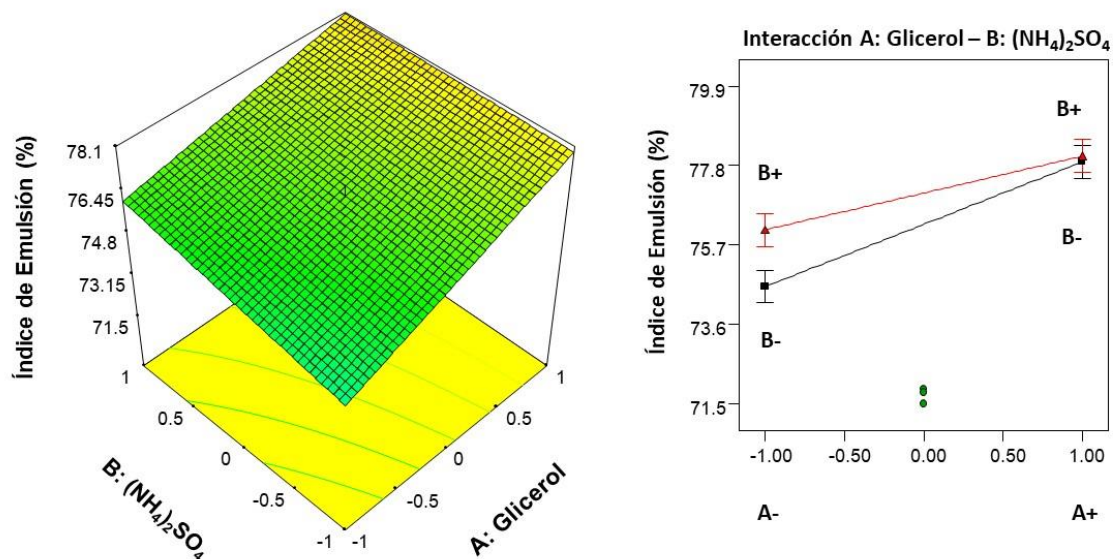


Figura 35. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE₂₄ cepa SM3, método de la placa (Whilhelmy). **a** superficie de respuesta máxima con respecto a glicerol y (NH₄)₂SO₄. **b** gráfica de interacción entre glicerol - (NH₄)₂SO₄.

Hasta el momento no hay reportes de actividad emulsificante superior al 70% en cepas de *Serratia marcescens* en medios optimizados a dicha producción, por lo que esta cepa nos da la pauta para emplearla en actividades con procesos de aplicación en el área de biorremediación debido a la biodisponibilidad que puede ejercer en cuanto a la producción de Bs.

5.3.7.3 Diseño factorial 2³, medición de la TS y análisis de varianza (ANOVA) en la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy)

El análisis de varianza (ANOVA) en los parámetros de regresión lineal con respecto al modelo se presenta en la tabla 47, los datos indican que el modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, los factores evaluados a dichas concentraciones, en este diseño no se presentan como un ajuste al modelo ya que la actividad Bs en esta cepa alcanzaron niveles óptimos.

Tabla 47. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto a la TS en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	Valor-F	Prob > F	Observaciones
Modelo	67.85	7	9.69	223.68	0.0045	significativo
A-Glicerol	6.3	1	6.3	145.41	0.0068	
B- (NH ₄) ₂ SO ₄	4.65	1	4.65	107.34	0.0092	
C-Pep. Casein	22.11	1	22.11	510.26	0.002	
AB	2.53	1	2.53	58.41	0.0167	
AC	6.66	1	6.66	153.72	0.0064	
BC	14.31	1	14.31	330.26	0.003	
ABC	11.28	1	11.28	260.34	0.0038	
Curvatura	1.13	1	1.13	26.16	0.0362	significativo
Error	0.087	2	0.43			
Total	69.07	10	.			

Des Est= 021, R²= 0.9987, Media= 27.89, Adj,R²= 0.9943, C.V%=0.75 Pred R²=-N/A, PRESS=N/A, Adeq Presicion=54.171

La reducción de la TS, evaluada en los 11 medios de cultivo analizados mediante el diseño factorial 2³, se muestran en la tabla 48. Los niveles de reducción más bajos se registraron a las 72 h de cultivo, posterior a este periodo los niveles se mantienen constantes. Los valores de TS muestran una variación de 35.4 a 25.2 dinas/cm por lo que, el medio de cultivo marcado con el número 1, describe el mayor efecto que ejercen los factores aun a pesar de que este modelo no es el que se ajuste a cada factor, los resultados demuestran que los niveles de TS son los óptimos a la actividad Bs registrada en la literatura [83], ya que los datos reportados de TS son de Bs purificados, mientras que los datos aquí reportados son durante la fermentación a bajos niveles de carbono y nitrógeno, contrario a los datos encontrados a la cepa silvestre.

Tabla 48. Resultados de la TS en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5

Número de tratamientos	Tensión superficial (dinas/cm)*
1	25.2
2	26.5
3	27.6
4	26.4
5	35.4
6	28.3
7	27.7
8	27.6
9	27.6
10	27.2
11	27.3

*Promedio de seis observaciones

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que el efecto de los factores analizados fueron significativamente diferentes a cero (F_{prueba} , $p < 0.0001$) mientras que la falta de ajuste debida al modelo no lo fue (F , $p = 0.0045$), cuando los datos no son seleccionados para guiar el diseño a optimización. Por lo tanto, los factores glicerol, $(NH_4)_2SO_4$ y peptona de caseína ejercen un efecto en el incremento en la producción de Bs. Estos datos se corroboran con la ecuación de primer orden que se generó en términos de factores codificados (Ecuación 15) con los valores de respuesta de reducción de TS. Los valores estimados se correlacionan con los parámetros obtenidos experimentalmente ($R^2 = 0.9987$) y sus efectos en el aumento de producción de Bs.

$$TS = 28.09 - 0.89A - 0.76B + 1.66C + 0.56AB - 0.91AC - 1.34BC + 1.19ABC \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

A = Glicerol

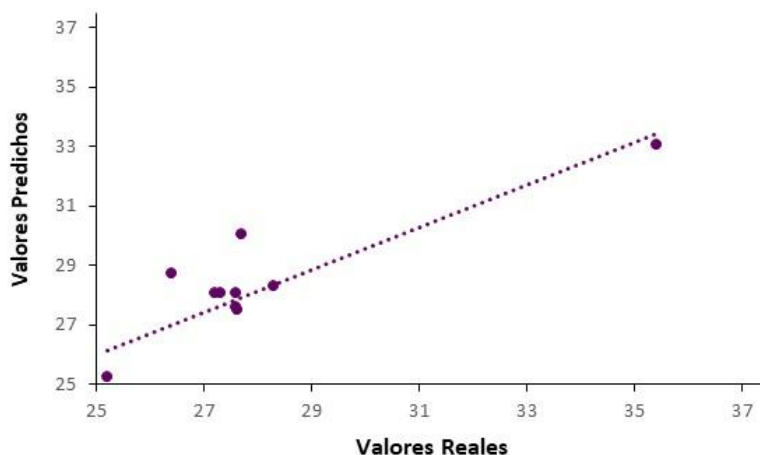
B = $(NH_4)_2SO_4$

C = Peptona de caseína

El modelo ajustado en términos de valores reales contra los predichos, calculados a partir de la ecuación generada, se especifican en la tabla 49, así, como su gráfica (figura 36).

Tabla 49. Valores reales vs valores predichos en el diseño factorial 2^3 de la cepa SMRG-5 en glicerol, método de placa (Whilhelmy).

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	25.5	25.23
2	26.5	24.15
3	27.6	27.49
4	26.4	28.73
5	35.4	33.05
6	28.3	28.29
7	27.7	30.03
8	27.6	27.59
9	27.6	28.07
10	27.2	28.07
11	27.3	28.07

**Figura 36.** Valores reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^3 en glicerol, método de la placa (Whilhelmy)

Los resultados de superficie de respuesta con en la reducción de la TS se presentan en la figura 37 en función de glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El efecto del medio de cultivo se observa a bajas concentraciones de carbono y nitrógeno favoreciendo la producción de Bs. Así mismo, la gráfica de interacciones en la misma figura panel b, se observa que a bajas concentraciones carbono y nitrógeno, cada factor ejerce un efecto sobre la producción de Bs en el medio de cultivo.

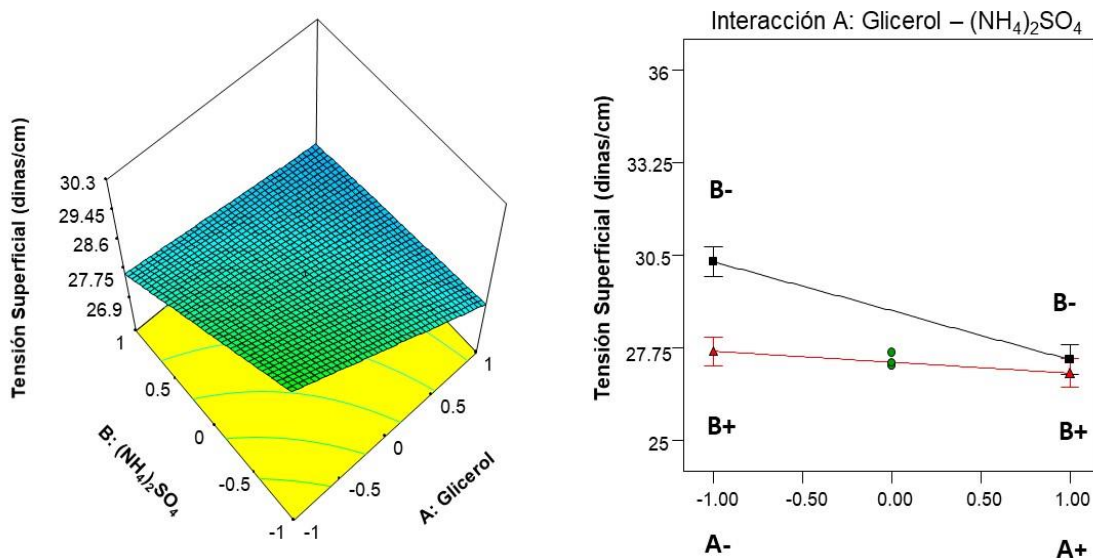


Figura 37. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan la reducción de la TS en la cepa SMRG-5, método de la placa (Whihelmy). **a** superficie de respuesta máxima con respecto a glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **b** gráfica de interacción entre glicerol - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.3.7.4 Diseño factorial 2^3 , medición del IE_{24} y análisis de varianza (ANOVA), cepa SMRG-5, en glicerol método de la placa (Whihelmy)

El análisis de varianza (ANOVA) para el IE_{24} , se indica en la tabla 50. Los parámetros de regresión lineal de superficie de respuesta, muestran que este modelo es significativo a un nivel de confiabilidad 0.05%, dado que el valor de probabilidad fue menor a 0.05. El valor de t para el modelo implica que el modelo es significativamente relevante a esta elección es decir, los factores estudiados tienen un efecto de manera individual (Glicerol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e interacción (Glicerol – Peptona de caseína y Glicerol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Peptona de caseína) en la generación de emulsiones y un aumento en la producción de Bs. No obstante, a pesar de que hay un efecto en los factores este modelo aún requiere de ajuste; es decir, no se requiere de todos los factores para el aumento en la producción de Bs y los niveles en IE_{24} son altos a pesar de la falta de ajuste.

Tabla 50. Análisis de varianza del modelo lineal con respecto al IE₂₄ de la cepa SMRG-5 en glicerol Método de la placa (Whilhelmy).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	Valor -F	Prob > F	Observaciones
Modelo	490.54	7	70.08	21022.93	<0.0001	significativo
A-Glicerol	23.12	1	23.12	6936	0.0001	
B- (NH ₄) ₂ SO ₄	1.62	1	1.62	486	0.0021	
C-Pep. Casein	169.28	1	169.28	4537.5	<0.0001	
AB	15.12	1	15.12	16537.5	0.0002	
AC	55.12	1	55.12	46993.5	<0.0001	
BC	156.65	1	156.65	20886	<0.0001	
ABC	69.62	1	69.62	16.41	<0.0001	
Curvatura	0.055	1	0.055	0.89	0.0559	not significativo
Error	6.67E-03	2	3.33E-03			
Total	490.6	10				

Des Std= 058, R²= 1.0000, Media= 78.58, Adj,R²= 0.9999, C.V%=0.73 Pred R²=N/A, PRESS=N/A, Adeq Presicion=559.137

La ecuación final en términos del modelo factorial seleccionado, se presenta en la ecuación 12 donde todos los factores ejercen un efecto sobre la producción de Bs con relación a la respuesta IE₂₄.

$$IE_{24} = 78.63 + 1.70A + 0.45B - 4.60C - 1.37AB + 2.62AC + 4.43BC - 2.95ABC \quad (\text{Ec. 16})$$

Los resultados del IE₂₄ evaluados en el diseño factorial 2³ en función de la fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (NH₄)₂SO₄ a bajas concentraciones se presenta en la tabla 51. Los 11 medios de cultivo presentaron una variación de entre 60.5 y 89.7 % con su respectiva desviación estándar. Los factores estudiados (glicerol, (NH₄)₂SO₄, peptona de caseína y sus interacciones) tienen un efecto significativo y promueven la producción de Bs cuando los cuando los niveles de carbono y nitrógeno son empleados a bajas concentraciones, contrario a lo que sucede en la cepa silvestre SM3, por lo que la mutación química en esta cepa favoreció dicha producción. Condiciones de cultivo optimizadas han incrementado la producción de Bs en cepas de *Serratia marcescens* como la reportada por Bidlan [80] quien ha empleado también como sustrato el glicerol, esta fuente de carbono es precursor de los ácidos grasos por lo que puede ser fácilmente sintetizado por la bacteria. No solo cepas de *Serratia marcescens* han sido optimizadas para la producción de Bs, *Pseudomonas sp* han sido producidas bajo la misma fuente de carbono y los resultados han sido favorables a dicha producción, además de las ya mencionas en la introducción. [85].

Tabla 51. Resultados del IE₂₄ en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy)

Número de tratamientos	Índice de emulsión (%)
1	89.7±0.03
2	84.7±0.05
3	78.6±0.02
4	79.9±0.06
5	60.5±0.02
6	77.8±0.04
7	78.9±0.03
8	78.9±0.04
9	78.4±0.04
10	78.5±0.06
11	78.5±0.06

*Promedio de tres observaciones, nueve replicas

El análisis de varianza con respecto a los valores reales vs predichos se muestra en la tabla 52 con su respectiva gráfica (figura 38), como se observa, no hay diferencia significativa a los valores predichos, ya que el efecto de los factores con respecto a la respuesta IE₂₄ se encuentra dentro de los niveles óptimos de producción, sin necesidad de emplear algún otro diseño experimental, a pesar de que no fue ajustado el modelo ya que no se requiere de dicha optimización.

Tabla 52. Resultados del IE₂₄ Valores reales vs predichos en el diseño factorial 2³ de la cepa SMRG-5.

Medio de Cultivo	Valores Reales	Valores Predichos
1	89.7	89.71
2	84.7	84.71
3	78.6	78.59
4	79.9	79.91
5	60.5	60.51
6	77.8	77.79
7	78.9	78.91
8	78.9	78.91
9	78.4	78.70
10	78.5	78.63
11	78.5	78.61

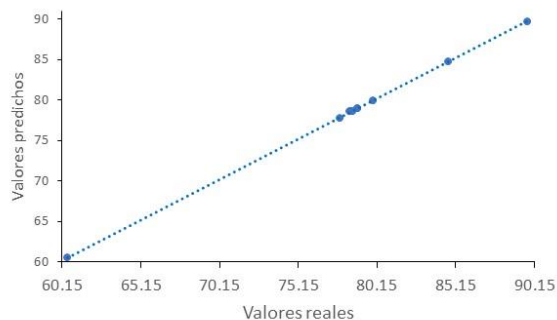


Figura 38. Valores Reales vs predichos de la cepa SMRG-5 en el diseño factorial 2^3 en glicerol, con respecto al IE₂₄. Método de la placa (Whilhelmy)

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 39a), sustenta los datos de respuesta óptima en el IE₂₄, indicando que a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno se alcanza el mayor porcentaje de emulsión registrado para esta cepa, comparada con la silvestre y con otras cepas de *Serratia marcescens*. La gráfica de interacciones (figura 39b) correlaciona los datos de superficie de respuesta a bajas concentraciones de cada factor involucrado. De acuerdo al modelo, el tratamiento marcado con el número 1 (glicerol, 12 gl⁻¹ y (NH₄)₂SO₄, 0.75 gl⁻¹) es el mejor medio de cultivo en la producción de Bs, ya que emulsiona el medio en un 89.7%.

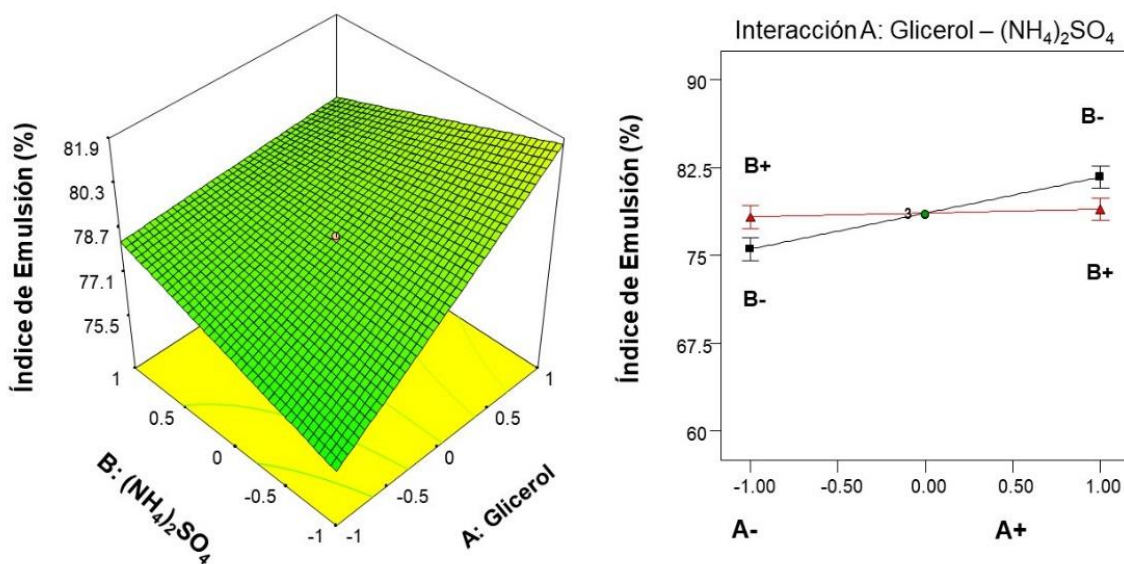


Figura 39. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que afectan el IE₂₄ de la cepa SMRG-5, método de la placa (Whilhelmy). **a** superficie de respuesta máxima del IE₂₄ en glicerol y (NH₄)₂SO₄ **b**. Interacción de glicerol - (NH₄)₂SO₄

5.3.8 Ensayos de locomoción en Swarming a las cepas SM3 y SMRG-5

Los factores evaluados en los diseños factoriales de ambas cepas, nos permitieron seleccionar el medio de cultivo con mayor producción de Bs; como respuesta a la TS e IE₂₄. Por lo tanto, para una producción de Bs a mayor escala se tomaron de cada cepa el medio de cultivo favorable a la producción de Bs, considerante que a partir de este punto, nos da la pauta para que la cepa isogénica SMRG-5 sea considerada de gran importancia para todo los siguientes análisis.

Los ensayos de actividad Bs, que involucra la medición de la TS, IE₂₄, locomoción en swarming y actividad hemolítica fueron realizados en cada medio favorable a la producción de Bs y los resultados corroboran que en cada medio de cultivo ambas cepas ejercen claramente dicha actividad. La locomoción en swarming evaluada en ambas cepas en medio rico (LB) se esquematiza en la figura 40a-b SM3 y SMRG-5, respectivamente.

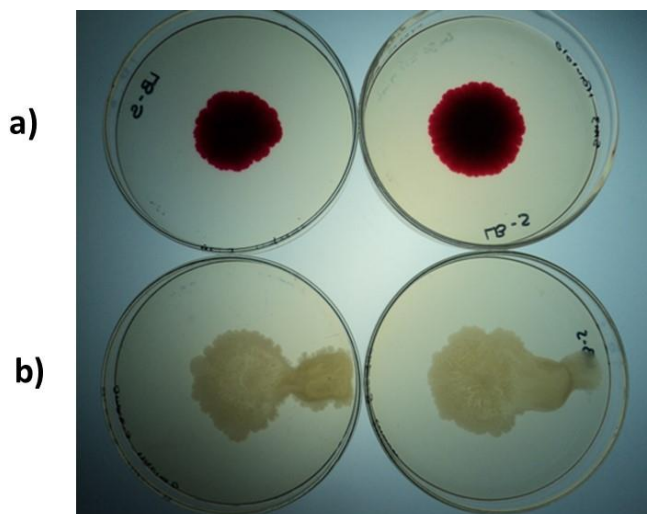


Figura 40. Locomoción en swarming de las cepas: a) SM3, b) SMRG-5 en medio LB.

Mientras que en los medios favorables a la producción de Bs, la cepa SM3 incrementa su población bacteriana fisiológicamente cuando el glicerol es utilizado como sustrato, por lo que en este parámetro de actividad Bs sustenta que el medio es favorable a la inducción del agente activo de superficie (Figura 41a). Así mismo, la locomoción en swarming en la cepa SMRG-5 en el medio de cultivo propicio a la producción de Bs, incrementa su densidad poblacional bajo las mismas condiciones de incubación. Dado lo anterior, este parámetro delimita un incremento en la presencia de Bs, comparado al medio rico LB (Figura 41b).

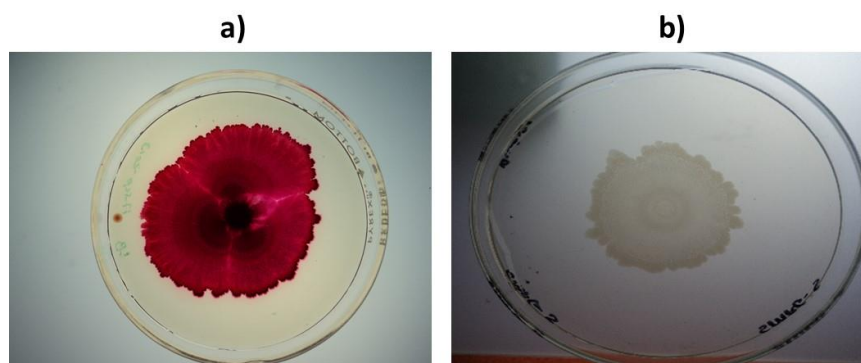


Figura 41. Locomoción en swarming de las cepas a) SM3 y b) SMRG-5 en glicerol

Otro de los parámetros que delimitan la presencia de agentes activos de superficie es la actividad hemolítica que indica la formación de poros a través de la presencia de Bs. Estas cepas también fueron sometidas a dicho análisis en placa. Los resultados sustentan la presencia de poros en ambas cepas como positivo.

5.3.9 Conclusiones

- Evaluar el efecto del medio de cultivo en la cepa SM3 empleando glucosa como fuente de carbono, en un diseño factorial 2^4 , permite la producción de Bs reduciendo la TS del medio en un 33.9 dinas/cm y 79.9%.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo mediante un diseño factorial 2^4 en la cepa SMRG-5, permite la producción de Bs reduciendo la tensión superficial a 36.3 dinas/cm. Sin embargo no favorece el IE_{24} en las mismas condiciones, empleando glucosa como fuente de carbono.
- Evaluar el efecto de medio de cultivo mediante un diseño factorial 2^3 , permitió aumentar la producción de Bs en la cepa SM3. Altas concentraciones de fuente de carbono (glicerol, 14 gl^{-1}) y nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 gl^{-1} y Peptona de caseína, 4 gl^{-1}), reduce la tensión superficial del medio a 26.5 dinas/cm y emulsiona el keroseno en un 79.9%.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo mediante un diseño factorial 2^3 permitió aumentar la producción de Bs en la cepa mutante SMRG-5. Bajas concentraciones de fuente de carbono (glicerol, 12 gl^{-1}) y nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.755 gl^{-1} y Peptona de caseína, 2 gl^{-1}), reduce la tensión superficial del medio a 25.5 dinas/cm y emulsiona el hidrocarburo en un 89.7%.

- Evaluar la actividad Bs en los medios de cultivo favorables a la producción, permitió delimitar los parámetros óptimos mediante el método de la placa (Whilhelmy) y el anillo Du Nouy. Donde la cepa SM3 registró una TS de 26.5 dinas/cm mientras que el IE₂₄ permaneció igual. Mientras que para la cepa SMRG-5 registró una TS de 25.2 dinas/cm y emulsiona el hidrocarburo en el mismo porcentaje (89.7%). Estos datos, fueron registrados por el método de placa y un anillo nuevo de iridio
- Evaluar el efecto del medio de cultivo, mediante un diseño factorial 2³ en la cepa SMRG-5 en glucosa como fuente de carbono no incrementa la producción de Bs.
- Las herramientas estadísticas empleadas en este trabajo, permitieron determinar las condiciones favorables al aumento en la producción de Bs, bajo la influencia de altas y bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (SM3 y SMRG-5, respectivamente). Estos parámetros de respuesta, dan la pauta para la producción a gran escala, la caracterización y elucidación de la estructura de dichos agentes tensoactivos, secretados por ambas cepas.

CAPÍTULO VI

6.1 ANTECEDENTES

6.1.1 Caracterización de Biosurfactantes producidos por las cepas SM3 y SMRG-5

Gran cantidad de microorganismos sintetizan compuestos de alto y bajo peso molecular, su máxima producción ocurre posterior a la división celular o porque dichas sustancias no son requeridas para el metabolismo primario o crecimiento celular. Por lo que son denominados metabolitos secundarios. Estos compuestos, no se identifican por su naturaleza química sino por sus características taxonómicas y metabólicas, los factores fisicoquímicos ejercen un efecto sobre su producción, como la temperatura, oxígeno, concentraciones de fosfato e iones metálicos, etc. Cada factor involucrado en la producción de Bs tanto fisicoquímico, como biológico; ejerce un efecto sobre dichas biomoléculas, los pasos y procesos para la extracción, purificación y caracterización son hoy en día un problema de costos a resolver. En este sentido, en diversas ocasiones depende del microorganismo empleado y el tipo de Bs a purificar.

Los procesos de extracción y purificación de Bs, en cepas de *Serratia marcescens*, esta delimitado por el tipo de agente tensoactivo secretado, ya sea a partir de cepas pigmentadas y no pigmentadas. Además, la producción de Bs y prodigiosina es termoregulado por la temperatura, es decir; la diferenciación celular, locomoción en swarming y pigmentos se lleva a cabo a 30°C, pero la producción de estos exolípidos no ocurre a 37 °C. La prodigiosina es un metabolito secundario constituido de 3 anillos pirrólicos unidos de manera lineal, derivados de L-prolina (Figura 42), estudios de mutantes deficientes en este pigmento, secretan precursores de este mismo y la condensación de moléculas como el 2-metil-3-pentilpirrol (siglas en inglés: MAP) y 4-metoxi-2,2-bipirrol, 5-carboxialdehído (MBC), estos compuestos se encuentran presentes en pasos finales de biosíntesis de pigmento. De igual forma, los Bs secretados por la cepa 274 de *S. marcescens* (Serrawetina 1) son responsables del incremento en la actividad de translocación de superficie dependientes ambas de la temperatura. El mecanismo de biosíntesis de estos metabolitos es sintetizado a través del sistema péptido sintetasa no ribosomales (NRPSs) en paralelo, esto debido al análisis genético estudiado en las secuencias consenso entre los miembros de las fosfopanteteneil transferasas, las cuales pertenecen a las proteínas acarreadoras de peptidil-fosfopanteteneilados en el gen *pswP* [72].

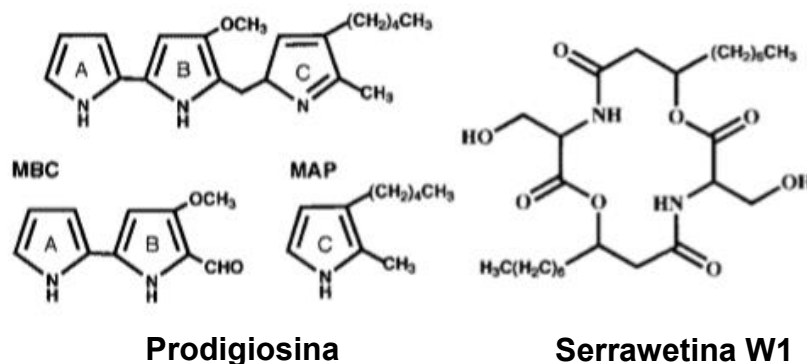


Figura 42. Estructura química de la prodigiosina MAP y MBC. El Bs Serratetina W1 es una dilactona compuesta de ácido D-3-hidroxidecanoico y L-serina.

Dada la naturaleza de la cepa SM3 de *S. marcescens*, la purificación y caracterización de los Bs pudiese verse ligeramente perturbada por la producción a la par del pigmento. Por tanto, la cepa mutante SMRG-5 productora de Bs, no pigmentada dará la pauta para una comparación entre ambos productos; con el fin de incrementar y mejorar la purificación de Bs, haciendo una comparación entre ambas cepas en cuanto a caracterización, delimitando la naturaleza de ambos extractos en cuanto al efecto de la mutagénesis en la cepa isogénica.

6.2 MATERIALES Y METODOS

6.2.1 Extracción de Biosurfactante de la cepa mutante SMRG-5

6.2.1.1 Sistema de extracción de Biosurfactante I

Para la extracción de Bs en fase acuosa, un cultivo con volumen final de 200 mL (72 hr de incubación) de la cepa SMRG-5, se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm y 4°C. El sobrenadante recuperado libre de células, se acidificó a pH 2 con HCl 1M y posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol; la solución etanólica formada se agitó durante 30 min (Corning, agitador/placa caliente) y se refrigeró por 72 hr con el objeto de precipitar el biosurfactante. Los sedimentos formados se eliminaron por centrifugación a 5 000 rpm durante 20 min a 4°C. La solución etanólica se evaporó en un rotaevaporador (Buchi, R-124). El remanente acuoso recuperado se liofilizó (marca de la liofilizadora). Finalmente, la muestra liofilizada con aspecto viscoso y color ámbar se mezcló con cloroformo-metanol (2:1 v/v) y se concentró la solución orgánica por evaporación. Los extractos obtenidos se revelaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placa de sílica gel G en un sistema de solvente I (cloroformo-metanol-5 M amonio (80: 25:4, v/v)). Los extractos se analizaron en placas de sílica gel por cromatografía en capa fina (siglas en inglés: TLC) en los sistemas de solventes I, sistema II

(cloroformo-metanol-acetona-ácido acético (90:10:6:1, v/v)) y sistema III (cloroformo-metanol-acetona (90:10:6, v/v)) [86].

6.2.1.2 Sistema de extracción de Biosurfactante II

Este sistema de extracción de Bs fue acoplado a ambas cepas de *Serratia marcescens* (SM3 y SMRG-5) por separado.

Un cultivo de la cepa SM3 con volumen final de 2 L previamente incubado durante 8 días, fue centrifugado a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C, con el fin de recuperar el sobrenadante libre de células. Un volumen de 500 mL de sobrenadante se somete a 2 extracciones sucesivas con 3 volúmenes de acetato de etilo, en cada caso se agitó durante 20 h (agitador Corning stirrer/hot plate agitación nivel 6) y posteriormente se refrigeró por 24 h a 4°C [87]. Una vez llevada a cabo la precipitación, se eliminaron los sedimentos por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El solvente orgánico se recuperó por evaporación. El extracto concentrado con característica viscosa y color ámbar, se mezcló con 200 mL de la mezcla de solventes: cloroformo-metanol (2:1) y se agitó durante 1 hr, posteriormente se concentran los solventes orgánicos por evaporación. Los extractos concentrados se analizaron por TLC en una placa de sílica gel, empleando como fase móvil metanol 100% y se reveló con vapores de yodo sublimado.

6.2.2 Caracterización del Biosurfactante

6.2.2.1 Gel Desnaturalizante de proteínas al 12% (SDS-PAGE)

Se preparó un gel desnaturalizante al 12% (SDS-PAGE). Se tomaron 15 µl de muestra (extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5) y se agregó solución de muestra (incluye β-mercapto-etanol) y se incubó a 92°C durante 5 min. Un volumen final de 25 µl fueron cargados en el gel utilizando 2 µl de marcador de peso molecular (color Marker, Fermentas), y fue corrido durante ~45 minutos a 150 v en una fuente de poder PowerPac Basic 300 v, 400 mA, 75 W Bio Rad.

6.2.2.2 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés HPLC) de las cepas SM3 y SMRG-5

Los extractos obtenidos se analizan por cromatografía de líquidos, utilizando un sistema High Performance Liquid Chromatography (HPLC) con detector y arreglo de diodos acoplado a un detector UV-visible, (Waters 996 Photodiode Array Detector, con inyector Mod. 7725i). Se utilizaron una columna XDBC-18 Agilent de 150 x 4.6 mm, 3.5 µm y una columna EC 250/4 NUCLEOSIL 120-5 C18.

6.2.2.3 Sistema de solventes de las cepas SM3 y SMRG-5

El método de separación empleado para ambas cepas SM3 y SMRG-5 fue en el sistema de solvente acetonitrilo - agua en un gradiente (tabla 53), la velocidad de flujo total fue de 1.0 ml min^{-1} , y una longitud de onda $\lambda = 215 \text{ nm}$ y un tiempo de corrida de 45 min.

Tabla 53. Sistema de gradiente empleado en la inyección de muestra de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5.

Tiempo (minutos)	Flujo	Solvente: Agua (%)	Acetonitrilo (%)
Inicial	1.0	100	0
5	1.0	100	0
35	1.0	50	50
37	1.0	100	0
45	1.0	100	0

El volumen inyección de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 fue de 100 μL . Las muestras a inyectar contienen 0.0305 mg de cada extracto crudo resuspendido en 700 μL de metanol grado HPLC. Los solventes orgánicos: empleados en este sistema fueron de grado HPLC y fueron previamente filtrados y sometidos a desgasificación por sonicación (20 min).

6.2.2.4 Caracterización del extracto por cromatografía de HPLC

Se inyectaron (15 μL) de una solución agua/metanol del extracto SM3. Para estandarizar el método de separación de Bs de la cepa SMRG-5, se empleó un gradiente con el sistema agua/metanol: (100/0) hasta alcanzar 100% metanol con un tiempo de corrida de 40 min. La velocidad de flujo total fue de 1 ml min^{-1} .

Una vez monitoreado el tiempo de elución, los extractos crudos de la cepa SMRG-5 fueron inyectados al HPLC para su separación en un sistema de gradiente isocrático agua - metanol [80:20] conteniendo 0.01% de ácido trifluoroacético.

El volumen final de muestra a inyectar fue de 20 μl de extracto crudo concentrado de las cepas SM3 y SMRG-5, resuspendido en 80 μl de metanol. Los solventes orgánicos: empleados en este sistema son de grado HPLC y fueron previamente filtrados y sometidos a desgasificación por sonicación (20 min).

El volumen final del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 adicionado con el 60% v/v de glicerol se llevó a un volumen final de 0.500 mL (60% glicerol, 20% extracto crudo concentrado de SMRG-5 y 20% de Metanol grado HPLC).

6.2.3 Ensayo de biodegradación

Los ensayos de biodegradación se llevan a cabo con el hidrocarburo policíclico aromático (benzo (a) pireno (BaP)), el cual se caracteriza por ser un compuesto poco soluble. Mientras que el dimetil sulfóxido (DMSO) es un líquido orgánico incoloro que es usado como disolvente orgánico industrial. En este ensayo se prepararán mezclas de compuestos previamente mencionados interactuando con distintas cepas de *Serratia marcescens* para identificar si hay una adsorción del BaP, y evaluar la biodisponibilidad de este hidrocarburo a partir de los Bs secretados a partir de las cepas de *Serratia marcescens*. Las mezclas se preparan en matraces de 20 mL con 10 mL de las siguientes mezclas: BaP (36 ppm) con DMSO, cepas de *S marcescens* SM3 (pigmentada), SM4 (no pigmentada), mutantes químicas (SMRG-2, SMRG-3, SMRG-4 y SMRG-5), respectivamente. El BaP es homogeneizado con DMSO. Los cultivos fueron incubados durante 30 días de fermentación en los medios favorables a la producción de Bs. Para recuperar los residuos de hidrocarburo, cada muestra libre de células, es previamente extraída con 3 volúmenes de diclorometano, durante 3 veces. La recuperación de los residuos de BaP se lleva a cabo en rota-evaporador y cada muestra se analiza por HPLC. Cada experimento es hecho por triplicado.

6.2.4 Ensayo de actividad hemolítica

Para este ensayo se usó sangre total (5 mL) y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C, el precipitado celular fue sometido a 3 lavados consecutivos con solución isotónica (3 veces v/v) para obtener el concentrado de eritrocitos lavados. Para determinar la actividad hemolítica se partió del concentrado de eritrocitos lavados, se emplearon como control positivo el surfactante sintético Tween 80 a 3, 30 y 300 mM, mientras que el control negativo se emplearon las muestras de los extractos crudos concentrados de ambas cepas de *S. marcescens* SM3 y SMRG-5.

Se tomó 1 mL del concentrado de eritrocitos y se resuspendió en 4 mL de solución isotónica. Para la evaluación de los compuestos se utilizaron 0.195 mL de solución de eritrocitos a los que se le adicionaron 0.005 mL del extracto crudo concentrado de cada cepa (SM3 y SMRG-5). El control positivo se evaluó tomando 0.195 mL de la solución de eritrocitos y complementando al volumen final de 0.200 mL con la concentración señalada previamente y como control negativo los extractos crudos concentrados 0.005 mL, al que se añadió el agua destilada. En cada ensayo se realizaron 2 réplicas de cada concentración.

Una vez preparadas las distintas concentraciones se incubaron durante 1 h a 37°C, posteriormente se centrifugaron, se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia por espectrofotometría.

La actividad hemolítica se evaluó en el sobrenadante midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda $\lambda = 545$ nm. Se calculó el porcentaje de hemólisis (%H) a partir del valor medido de las mediciones de la absorbancia por r+eplica par cada una de las concentraciones de trabajo empleadas:

$$\%H = \frac{DO_M - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \cdot 100$$

Donde:

DO = densidad óptica, M = muestra, CN = control negativo, CP = control positivo

6.2.5 Producción de Biosurfactante a escala fermentador de la cepa SM3

Pre-inóculo

Un colonia de cada cepa de *S. marcescens* SM3 fue inoculado en matraces de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) e incubado a 30 ± 2 °C y 150 rpm, durante 16 ± 2 hrs.

Inoculo

Un cultivo fue preparado, centrifugando 200 mL de medio de cultivo tomado del matraz semilla (pre-inóculo) a un fermentador de 5 L conteniendo 2 L de medio. El medio de cultivo usado para la producción de biosurfactante contiene (g L^{-1} de agua destilada) glicerol 14, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, y peptona de caseína 1.5. El pH del medio de cultivo fue 7.0. Se incubó durante 8 días a temperatura ambiente (24 ± 0.2 °C) y 150 rpm, tiempo en el cual, la tensión superficial del medio registró el menor valor. Posteriormente, al sobrenadante libre de células se sometió a extracción de Bs.

Posterior a estas condiciones de preparación y analizando los distintos parámetros que pudiesen ser modificados para incrementar la producción de Bs, con respecto Se inoculó el 10% v/v partiendo del preinóculo centrifugando 500 mL de este último con un peso equivalente en biosamasa húmeda de 14 g.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. ETAPA I. Producción de Bs de la cepa SM3 a escala reactor

En orden de obtener mayor cantidad de Bs, la cepa SM3 de *S. marcescens* fue cultivada a nivel reactor (2 L de volumen final) en el medio de cultivo favorable a la producción de Bs analizados en las secciones anteriores, como se observó previamente, el medio de cultivo que contiene altas concentraciones de glicerol (14 g/L) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.5g/L) bajo las condiciones ya mencionadas será usado para los posteriores análisis que delimiten cada objetivo a concluir.

Se montaron al menos 4 reactores para la producción a gran escala de Bs en esta cepa silvestre. Sin embargo solo se presentan los resultados de crecimiento y reducción de la TS de tres fermentadores, mientras que los cultivos restantes fueron empleados para realizar diversos procesos (extracción, purificación y caracterización).

En la figura 43a se presenta un crecimiento bacteriano bajo o nulo menor a 0.1 DO indicado en color azul. Por tanto no hubo crecimiento con respecto a la reducción de la TS en este mismo cultivo; se registró una reducción de la TS de 58.6 dinas/cm a las 96 h de incubación. Posterior a este cultivo en fermentador se montó un segundo fermentador bajo las mismas condiciones previamente manejadas. Sin embargo, los resultados difieren satisfactoriamente como se muestra en la figura 43b, con respecto al crecimiento se duplicó en un 100% registrando 1.54 DO. Con respecto a la TS el mínimo registrado fue de 38.6 dinas/cm por lo que se considera aumento en la producción de Bs. Cabe señalar que empleando el mismo medio de cultivo no sustenta una alta producción de Bs, deben manipularse todos los parámetros fisicoquímicos involucrados en dicha producción.

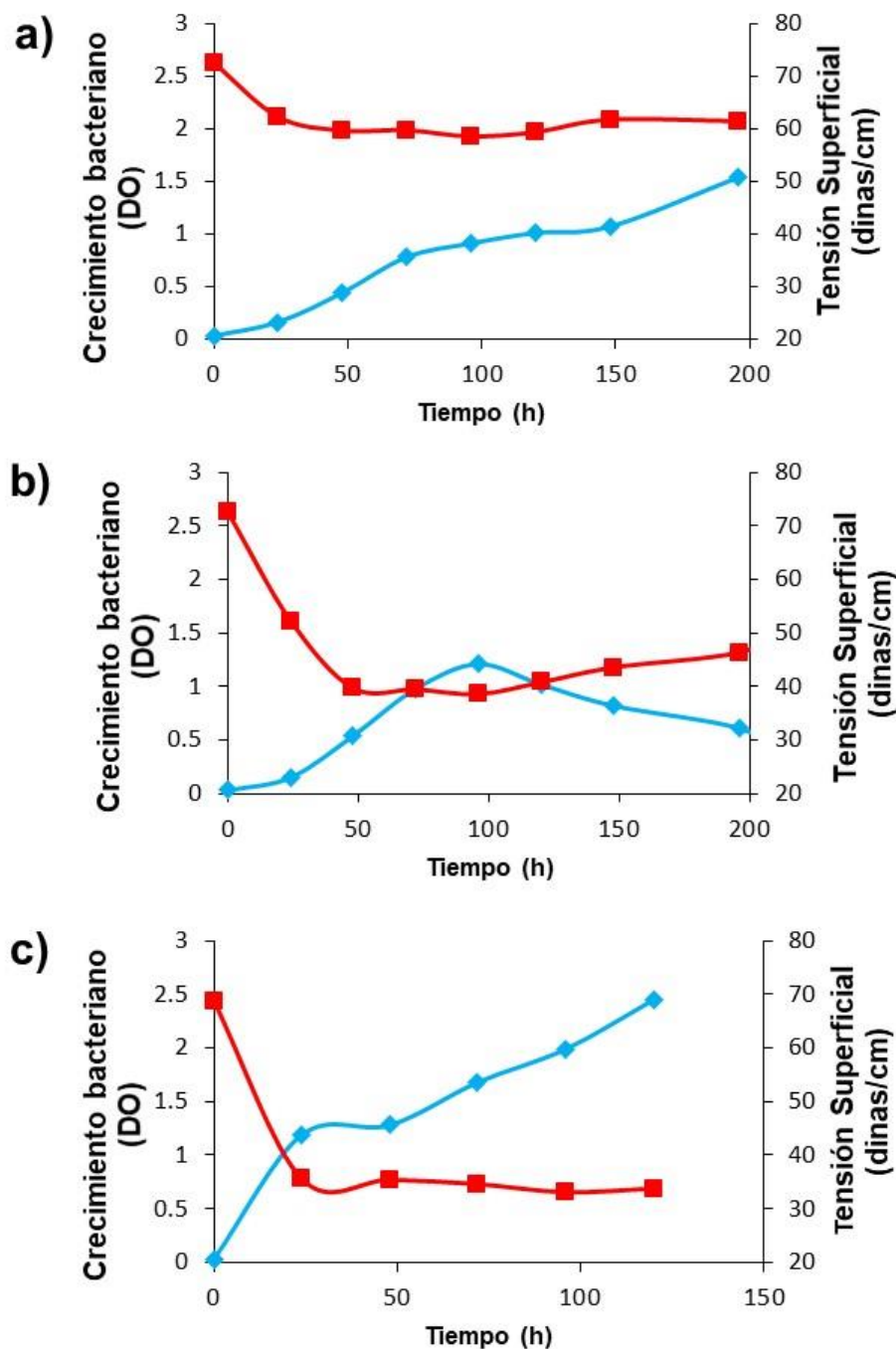


Figura 43. Cinética de crecimiento de la cepa SM3 a escala reactor con volumen final 2L; 150 rpm, $27\pm 2^\circ\text{C}$ en Glicerol como fuente de carbono. **a)** Reactor 1 de la cepa SM3. **b)** Reactor 2 de la cepa SM3. **c)** Reactor 3 de la cepa SM3 aumento de biomasa

Se analizaron cada uno de los parámetros que pudieran inferir en la producción de Bs, por lo que se decidió aumentar la cantidad de biomasa y no realizar los lavados a las células. Los resultados se presentan en la figura 43c, donde se observa un crecimiento de la cepa SM3 hasta en un 2.45 DO y

una reducción de la tensión superficial de 33.1 dinas/cm. Por tanto, el aumentar la biomasa celular permite llevar una fermentación con alta producción de Bs a nivel reactor, disminuyendo el tiempo de cultivo a solo 5 días. En la tabla 54 se resumen los datos de crecimiento bacteriano correlacionado con la reducción de la TS como respuesta en el aumento de la producción de Bs.

Tabla 54. Crecimiento bacteriano y TS en la producción de Bs a escala reactor, cepa SM3

Reactor	Crecimiento bacteriano (DO)	Tensión Superficial (dinas/cm)
1	0.91	58.6
2	1.01	38.6
3	2.45	33.1

6.3.2 Producción de Bs de la cepa SMRG-5 a escala reactor

La cepa SMRG-5 fue cultivada a nivel reactor (2 L de volumen final) en el medio de cultivo, evaluado en el diseño factorial 2³, a bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (glicerol 12 g/L y (NH₄)₂SO₄ 0.75 g/L), con el fin de obtener mayor cantidad de Bs. En base a los resultados obtenidos a nivel reactor en la cepa SM3, se siguió el mismo protocolo de inoculación en esta fermentación; es decir; de un cultivo de 500 mL volumen final se centrifugó y la biomasa celular sin ser lavada fue inoculada en un volumen final equivalente al 20% v/v.

La cinética de crecimiento y TS de esta cepa se presenta en la figura 44, donde se registró un máximo de crecimiento durante las primeras 48 h de fermentación, asociado con la reducción de la TS de 36.2 dinas/cm que se alcanza durante el mismo tiempo de cultivo. Cabe señalar que posterior a este cultivo, se hicieron replicas producción y durante la fermentación se logró controlar la temperatura a 30°C por lo que la reducción de la TS se registró en un 30.6 dinas/cm Este resultado comparado con la cepa silvestre demuestra que es igualmente competitiva y con gran potencial para analizar en posteriores análisis como elucidación.

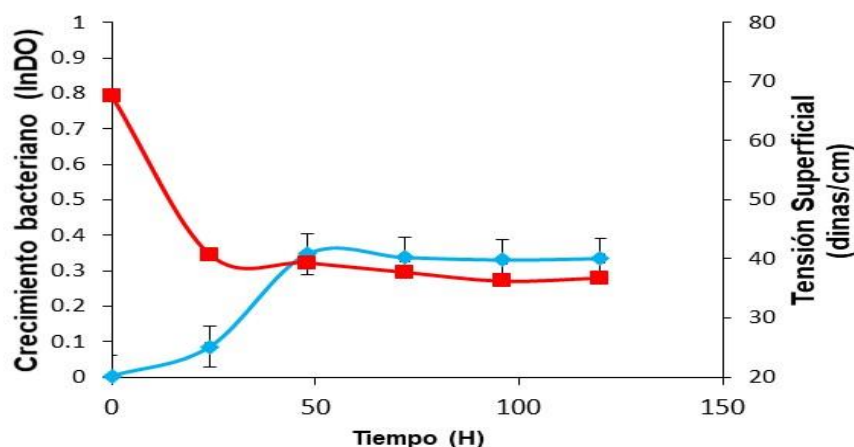


Figura 44. Cinética de crecimiento de la cepa SMRG-5 a escala reactor 2L, en glicerol 12 gL⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 0.5 gL⁻¹; Peptona de caseína 0.5 gL⁻¹.

6.3.3 Etapa II. Extracción de Bs por diferentes sistemas de solvente

6.3.3.1 Extracción de Bs de la cepa SM3

La extracción de los Bs a partir de la cepa SM3, se llevó a cabo mediante los sistemas de extracción III y IV (ver materiales y métodos). Sin embargo, las extracciones realizadas con el sistema de extracción III (precipitación con acetona fría 3v/v) deben ser liofilizadas para obtener una mayor cantidad de extracto crudo. Por lo que el método de extracción IV (precipitación con acetato de etilo 3 v/v) se considera el mejor método de extracción ya que en este, no se requiere liofilizar la muestra para obtener mayor cantidad de extracto crudo de Bs concentrado.

Las extracciones del Bs se llevaron a cabo mediante los sistemas III y IV (ver materiales y métodos). Se obtuvieron 6.1 g/L de extracto crudo concentrado a partir del sistema IV. No obstante, la extracción realizada con el sistema II fue de 4.0 g/L. Estos resultados avalan la diferencia que existe entre cepas de *S. marcescens* que secretan al medio un tipo de Bs, pues cepas como DT-1P crecida en glicerol como fuente de carbono para la producción de Bs, se extrae en promedio 4.0 g/L de extracto crudo concentrado de Bs [81].

En la tabla 55 se presentan los distintos sistemas de extracción de Bs y los g/L de extracto crudo obtenidos en esta cepa pigmentada. Como se observa el método IV permite obtener mayor cantidad de extracto crudo.

Tabla 55. Sistema de extracción de Bs vs g/L de extracto crudo concentrado de la cepa SM3

Sistema de Extracción de Bs	Extracto crudo concentrado (g/L)
I	4
II	4.4
III	6
IV	6.1

Los extractos concentrados de la cepa SM3 fueron analizados por cromatografía en capa fina. Las muestras fueron colocadas en una placa de Sílica gel 60 F254 (2 x 5 cm), se probaron distintos sistemas de solvente. Sin embargo, el sistema de solvente orgánico desarrollado fué acetonitrilo-metanol [1:1] con un tiempo aproximado de elución de 3 min como se observa en la figura 45. También se consideró analizar la fuente de carbono empleada para la producción de Bs en el mismo sistema de solvente. El glicerol en este sistema de solvente eluyó en primer orden (figura 45, panel a) mientras que el extracto crudo concentrado de la cepa SM3 eluyó en segundo orden como se observa en la figura 45 panel b 1. Sin embargo, la muestra del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 no eluye con respecto a las muestras anteriores y permanece en el punto de aplicación ya que el sistema de solvente no es el adecuado (figura 45 panel b, 2). Las placas fueron reveladas con vapores de Iodo sublimado.

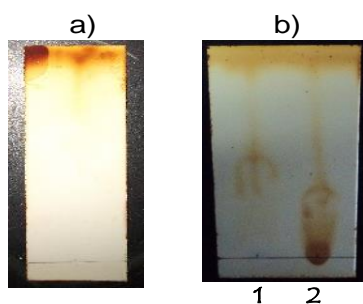


Figura 45. Cromatografía en capa fina de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 de *S. marcescens*. a) Glicerol (fuente de carbono), b) Extractos crudos concentrados de: 1) SM3, 2) SMRG-5.

Las características de la cromatoplaqueta del glicerol nos da la pauta para inferir en el orden en el cual, eluyen los compuestos presentes en el extracto crudo concentrado de cada cepa analizada.

6.3.3.2 Extracción de Bs de la cepa SMRG-5

La extracción de los Bs a partir de la cepa SMRG-5, se llevó a cabo en tres sistemas diferentes. El mejor sistema de extracción de Bs para esta cepa, fue con el solvente orgánico acetato de etilo asignado como sistema de extracción IV (ver materiales y métodos). Así mismo, se analizó el extracto crudo concentrado de SMRG-5 generado en distintos sistemas de elución; asignados como método de elución I (sistema de solventes cloroformo-metanol-acetona-ácido acético (90:10:6:1, v/v) y cloroformo-metanol-acetona (90:10:6, v/v)), método II (sistema de solvente: cloroformo-metanol (2:1)), como los reportados en la literatura para estas especies de bacterias [84]. Sin embargo, estos sistemas no fueron los adecuados para la extracción y separación de los compuestos presentes en el extracto crudo concentrado (figura 46).

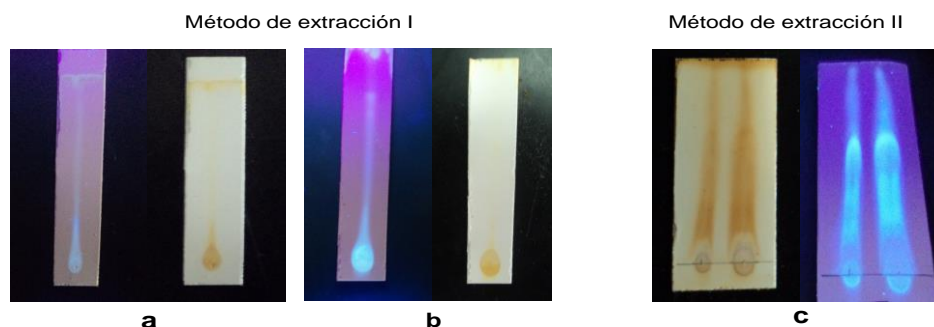


Figura 46. Sistema de extracción de Bs de la cepa SMRG-5. **a)** Cloroformo-metanol-acetona-ácido acético (90:10:6:1). **b)** Cloroformo-metanol-acetona (90:10:60). **c)** Cloroformo-metanol (2:1)

Se probaron otros sistemas acoplados a esta cepa, siendo el sistema Diclorometano – Metanol [90:5] (figura 47a) el sistema que permite separar los primeros compuestos cuando la muestra se hace eluir tres veces. El solvente orgánico metanol [100] también permite separar los compuestos más polares en un tiempo de elución de aproximadamente 3 min (figura 47b), en placa de sílica gel 60 F254 (4 X 5 cm) En analogía, con respecto a los reveladores: ácido sulfúrico 50% (sistema de solvente I) y sulfato sérico amoniacal (sistema de solvente II) empleados en cada sistema propuesto, no se obtuvieron resultados favorables. No obstante, los extractos concentrados revelan evidencia con puntos amarillos en vapores de yodo sublimado, y previamente identificados bajo la luz ultravioleta (longitud de onda corta y larga). Lo que nos da un indicio de la presencia de algún grupo de tipo lipopeptídico. Estos extractos también fueron positivos a vainillina (Figura 47 c y d), y bajo las mismas condiciones positivas a ninhídrina (figura 46e), por lo que las placas sugieren algún Nitrógeno-terminal libre [83].

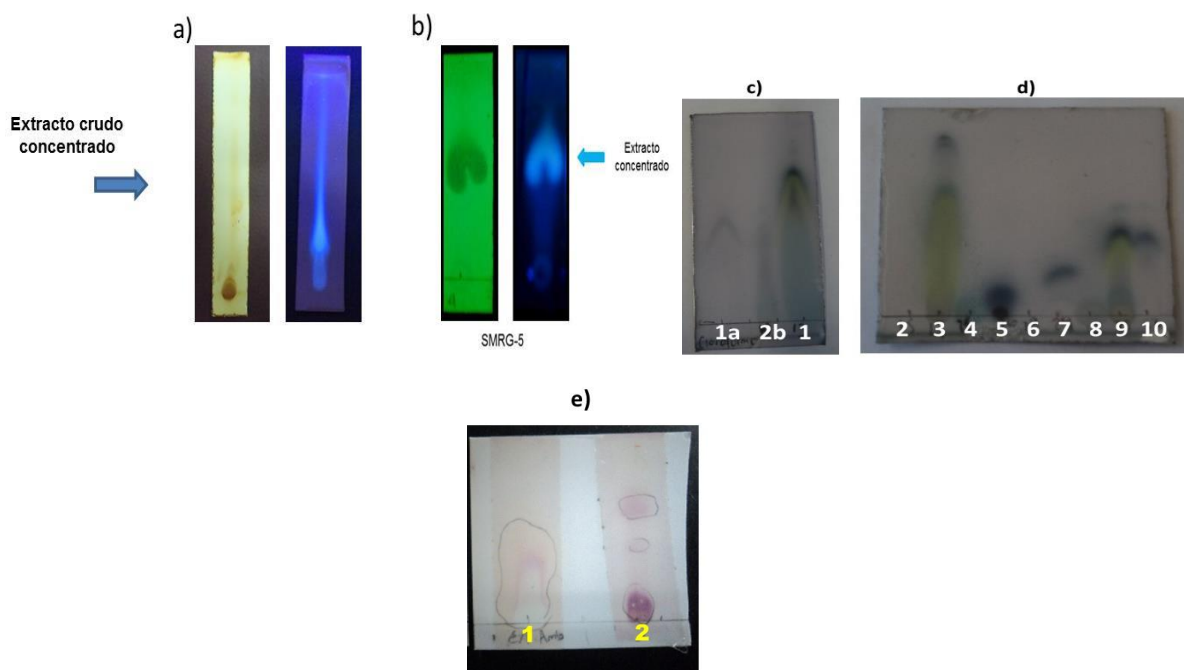


Figura 47. Extracto concentrado de la cepa SMRG-5. a) Sistema de solvente orgánico diclorometano-metanol [95:5], b) metanol [100]. c) y d) extracto crudo concentrado de SMRG-5 revelado con vainillina. d) Extracto crudo revelado con ninhidrina

6.3.4 Perfil proteico a los extractos crudos de Bs de las cepas SM3 y SMRG-5

El sobrenadante libre de células, posee una composición elemental condicionada a una diversidad de compuestos que secreta la bacteria; incluyendo algunas proteínas que en diversos casos no logran ser eliminadas durante los procesos de extracción. Con el objetivo de identificar si los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5, contienen proteínas contaminantes que afecten la extracción del Bs. Para ello se preparó un gel desnaturalizante de proteínas al 12% (SDS-PAGE) (ver materiales y métodos) y se corrieron las muestras (extractos crudos de Bs concentrado de ambas cepas) se empleó como control positivo y negativo, la digestión de albumina de suero bovino (BSA) con la enzima tripsina y sin digerir, así como el marcador de peso molecular (color Marker de Fermentas). En la figura 48, se observan las distintas muestras digeridas y sin digerir de los extractos crudos de las cepas SM3 y SMRG-5 incluyendo el marcador de peso molecular. Los extractos crudos concentrados de ambas cepas no presentan proteínas contaminantes que pudiesen afectar los resultados de reducción de la tensión superficial, así como la extracción de Bs.

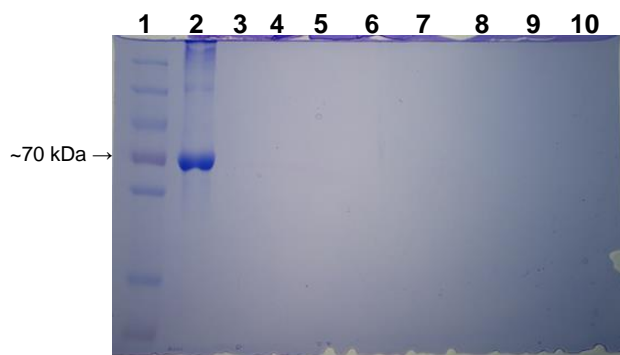


Figura 48. Gel desnaturalizante de proteínas SDS-PAGE al 12%. Carril 1, marcador de Peso Molecular. Carril 2, Albumina de suero bovino (BSA) sin digerir. Carriles 3 y 4, BSA digerido con la enzima Tripsina. Carril 5, en blanco. Carril 6, extracto de la cepa SM3 sin digerir. Carril 7, extracto de la cepa SM3 digerido. Carril 8, extracto de la cepa SMRG-5 sin digerir. Carril 9, extracto de la cepa SMRG-5 digerido25.

6.3.5 Etapa III. Caracterización del Bs de las cepas de *S. marcescens* SM3 y SMRG-5

6.3.5.1 Perfil Cromatográfico de los extractos crudos concentrados de la cepa SM3

Para analizar el extracto crudo concentrado de la cepa SM3 recuperado con acetato de etilo, se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello se empleó el sistema de solvente en fase reversa móvil acetonitrilo-agua en modo de gradiente (ver materiales y métodos). En los resultados del perfil cromatográfico se observan 12 fracciones principales (figura 49); el extracto presenta distintos compuestos de gran interés, que fueron colectados para su análisis individual y en conjunto con respecto a la actividad Bs.

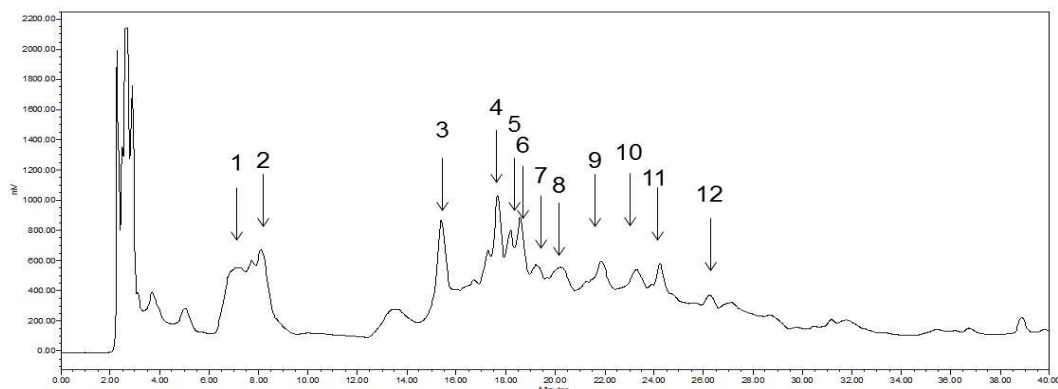


Figura 49. Perfil Cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SM3 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa: Acetonitrilo- Agua (gradiente). Columna EC/250/4 Nucleosil 120-5 C18.

En la tabla 56 se presenta la tensión superficial e Índice de emulsión de las fracciones colectadas en el HPLC, un total de 2 mL se probaron para medir actividad Bs. Se observa que se requiere de mayor cantidad de cada muestra para reducir la tensión superficial y emulsionar el keroseno.

Tabla 56. Actividad Bs de los picos colectados por HPLC del extracto crudo concentrado de la cepa SM3

Pico colectado	Tensión superficial (dinas/cm)	Índice de emulsión (%)
1 y 2	50.4±0.1	8
3	44.6 ± 0.2	11
4	51.6±0.1	8
5 y 6	46.8±0.1	11.3
7 y 8	57.4±0.2	6
9	66.4±0.21	3
10	66.8±0.3	3.1
11	66.6±0.1	3.2

6.3.5.2 Perfil Cromatográfico de los extractos crudos concentrados de la cepa SMRG-5

Una vez realizada la extracción del Bs crudo concentrado a los cultivos de la cepa SMRG-5 (72 hr de incubación 150 rpm, 30± 2 °C), se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

El perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado seco de la cepa SMRG-5, extraída con acetato de etilo sometiendo a 2 lavados con cloroformo-metanol [2:1] y un lavado en metanol [100%] se presenta en la figura 50. Se observan doce fracciones diferentes en distintos tiempos de elución que indican la presencia de diferentes metabolitos, por lo que; será necesario realizar una colecta de fracciones y evaluar la actividad Bs en cada una.

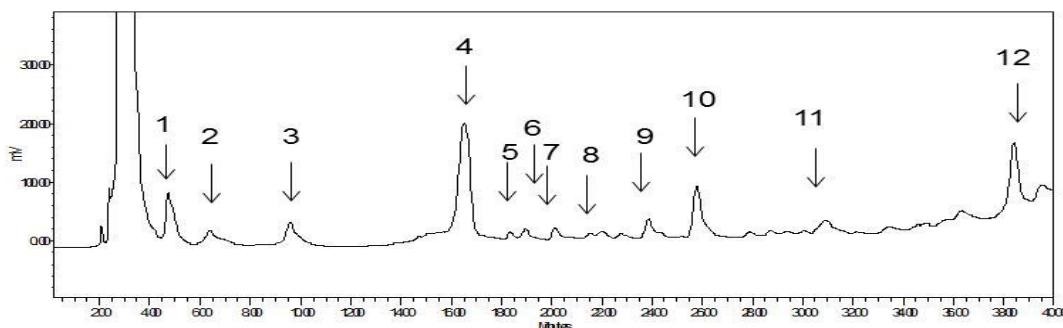


Figura 50. Perfil Cromatográfico del extracto crudo concentrado seco de la cepa SMRG-5 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa: Acetonitrilo- Agua (gradiente). Columna EC/250/4 Nucleosil 120-5 C18.

No obstante, en la figura 51 se muestra el perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado extraído con acetato de etilo sin secar. Se observan al menos 13 fracciones que eluyen a distintos tiempos de retención e intensidad. Cada fracción fue colectada para análisis de tensión superficial, los resultados se muestran en la tabla 57, cabe señalar que los datos de reducción de tensión

superficial que registra cada fracción oscilan entre 44 – 65 dinas/cm debido a la cantidad de colecta realizada (~2mL), por lo que se sigue colectando cada fracción para su análisis de actividad Bs.

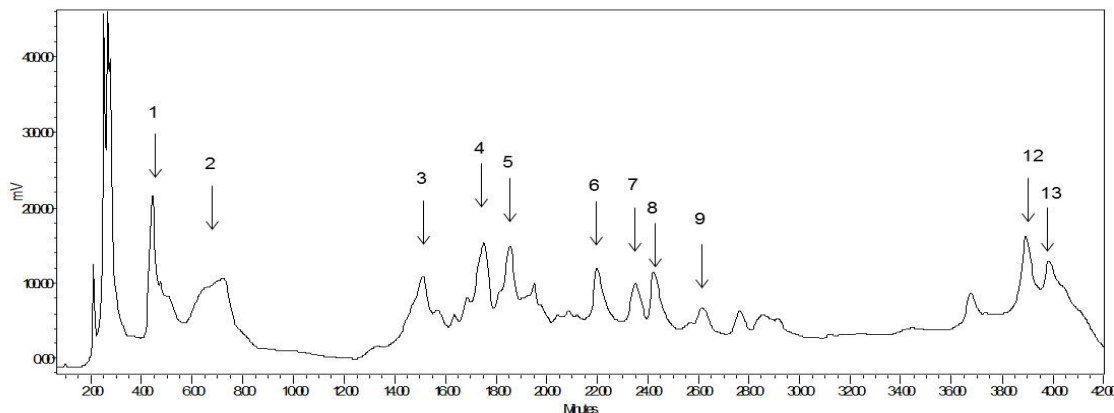


Figura 51. Perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 en un sistema de solvente orgánico, fase reversa: Acetonitrío- Agua (gradiente).

Tabla 57. TS medida a cada fracción colectada a partir del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5

Pico colectado en HPLC	Tensión superficial (dinas/cm)
1	52.6±0.1
2	49.4±0.2
3	44.6±0.1
4	50.0±0.27
5	46.1±0.18
6	44.8±0.17
7	54.8±0.1
8	56.1±0.2
9	64.2±0.17
10	65.1±0.16
11	65.7±0.15

6.3.5.3 Perfil Cromatográfico del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 y un Bs comercial BDM 050

Se analizó el extracto crudo concentrado sin secar de la cepa SMRG-5 en un equipo distinto con un sistema de solvente: acetonitrilo – agua [50 – 50] modo gradiente y el perfil cromatográfico muestra 11 fracciones distintas en tiempos de elución similares al perfil anterior de esta misma cepa (figura 52a). Se analizó también, la fuente de carbono empleada en este caso fue el glicerol. Este último se adicionó al extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5, con el fin de despejar la incógnita si había presencia de glicerol en el extracto crudo, que no hubiese sido degradado por la bacteria en las cinéticas de crecimiento. En la figura 52b se presenta el perfil cromatográfico donde podemos inferir

que en efecto el extracto crudo presenta remanentes de glicerol cuando incrementamos en un 60% la cantidad de glicerol en la muestra, este resultado se refleja en la primera fracción en un tiempo de retención de 4.7 min y en todo el perfil cromatográfico se observa indefinido. Sin embargo, en la luz visible no se pueden observar los compuestos que en su estructura poseen alcoholes, como en este caso el glicerol. Por tanto; en ensayos posteriores se monitorearán cinéticas de crecimiento, evaluando el consumo de fuente de carbono en el medio de cultivo de estas cepas en HPLC.

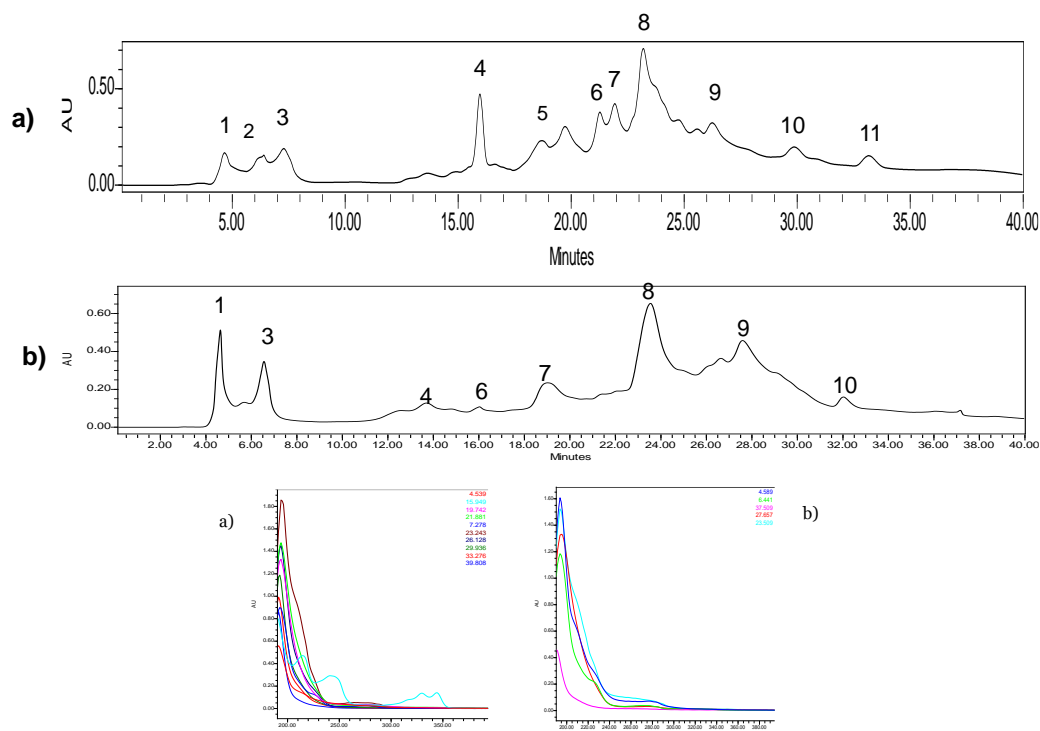


Figura 52. Perfil cromatográfico y espectros de la cepa SMRG-5. a) extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5. b) extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 y glicerol 60%. En un sistema de solvente orgánico: acetonitrilo – agua (gradiente).

Se han reportado perfiles cromatográficos similares a los encontrados en este estudio [84] han identificado 5 fracciones a partir del extracto crudo, de los cuales, el pico principal y mayoritario corresponde al Bs puro denominado *Serrawetina W2*, secretado por la cepa blanca de *Serratia liquefaciens* (MG1) [84].

Cabe destacar que los extractos crudos concentrados de las cepas de *S. marcescens* no han sido analizados con respecto a un control, es decir, un Bs comercial. Por lo que en la figura 53, se presenta el perfil cromatográfico de un Bs disponible en la industria y empleado en derrames de hidrocarburo, puesto que se desconoce la concentración del compuesto se inyectó, la misma cantidad de muestra con respecto a los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5. Como se observa en

el perfil cromatográfico y corroborando con su respectivo espectro, este Bs comercial Bio Degrease Marine BDM 050 presenta al menos 6 fracciones diferentes y podemos inferir en la presencia de glicerol en este compuesto, puesto que al agregar el doble de la concentración incrementa la fracción identificada en los primeros 4 minutos de tiempo de retención.

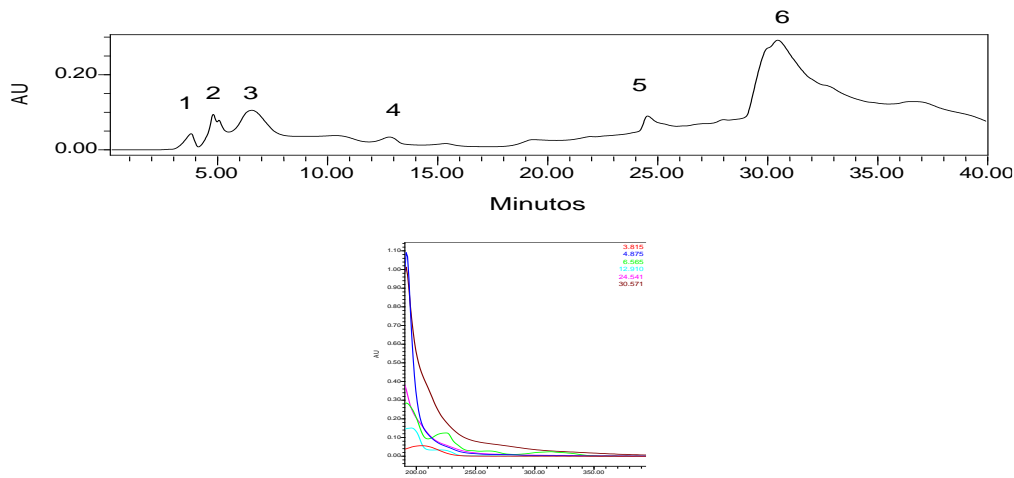


Figura 53. Perfil cromatográfico de un Bs comercial BDM 050y 10% de glicerol. En un sistema de solvente orgánico: acetonitrilo – agua (gradiente) y su espectro.

Una segunda inyección fue hecha en una columna Macherey-Nagel (EC 250/4 Nucreosil 120-5 C18) del Bs comercial, el perfil cromatográfico muestra una sola fracción (figura 54). Donde la fracción uno es similar al perfil que presenta la cepa SMRG-5 cuando se inyecta el extracto crudo concentrado.

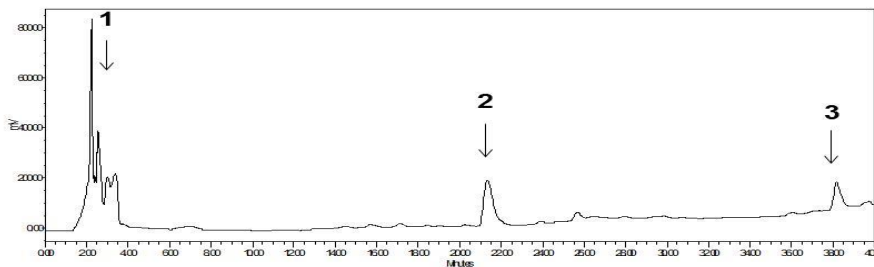


Figura 54. Perfil cromatográfico de un biosurfactante comercial BDM 050 en 70% de metanol. En un sistema de solvente orgánico: acetonitrilo – agua (gradiente).

Dada la naturaleza de cada compuesto analizado, como lo son el extracto crudo concentrado de la cepa SM3 y el extracto crudo concentrado seco de la cepa SMRG-5, y haciendo un comparativo entre ambas cepas y con respecto a un Bs comercial BDM050 purificado como control, se observa la diferencia que existe entre cada extracto y de alguna manera la similitud con respecto al control en este caso analizado, cuando se carga la misma cantidad de muestra con respecto a las cepas y solo un 33% del control (figura 55).

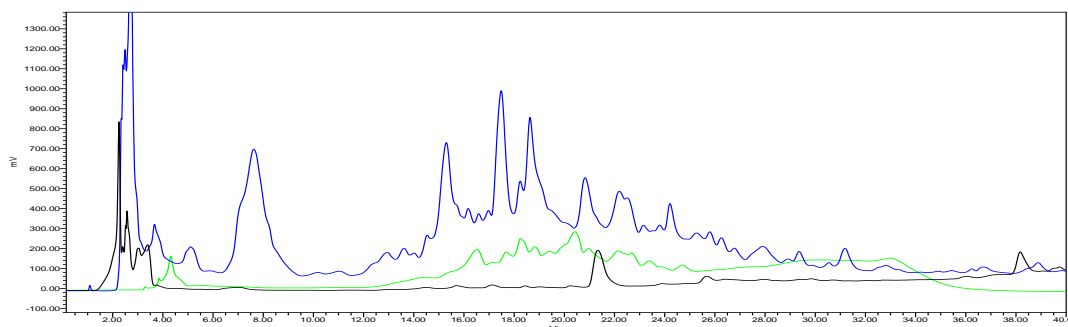


Figura 55. Perfil cromatográfico del extracto crudo concentrado y seco de las cepas SM3 (azul) y SMRG-5 (verde) y un Bs comercial (negro). Sistema de solvente: agua-acetonitrilo (gradiente).

6.3.6 Concentración Micelar Crítica de los extractos crudos concentrados de la cepa SM3 y SMRG-5.

La Concentración Micelar Crítica (CMC) se determina midiendo la TS en una serie de muestras diluidas en este caso, en agua desionizada. Como puntos estándar en escala logarítmica (concentración de Bs) con respecto a la TS y es usada para estimar la CMC. Para determinar la concentración de surfactante en una muestra desconocida, se diluye la muestra hasta que la TS está cerca del mínimo (la concentración de surfactante en solución está por debajo de la CMC). La concentración es determinada usando puntos estándares y multiplicando por el factor de dilución adecuado. En algunos casos, cuando se desconoce la identidad de un surfactante se lleva a cabo una búsqueda deseada de la solución de surfactante crudo. La concentración de surfactante puede, por lo tanto, no ser medida. La solución de surfactante crudo puede ser comparada con referencia a la TS.

Se determinaron los valores de CMC en los surfactantes sintéticos: Monooleato de Polioxietileno o polisorbato (Tween) 20 y 80, con respecto a la concentración de surfactante vs TS, en la figura 56a se muestra que la curva depende de la concentración y TS del surfactante sintético Tween 20, el rango de concentraciones que oscila entre 1mM y la máxima de 100 mM de surfactante sintético fue debido a la medición del mismo, ya que en la mayor concentración la muestra presentaba un aspecto sumamente viscoso; lo cual no permite una adecuada medición de la TS. Sin embargo se logró una reducción de la TS de 35.8 dinas/cm. Mientras que en la misma concentración con respecto al Tween 80 fue de 36.4 dinas/cm (figura 56b). Se ha determinado la CMC de surfactantes sintéticos en fase acuosa. Así mismo se determinó la CMC para un Bs puro de tipo comercial BDM050 con una TS de 26.7 dinas/cm (figura 56c). El resultado de la CMC en este Bs nos indica que tan competitivo puede ser un surfactante de tipo biológico al reducir la tensión superficial con respecto a un surfactante de origen sintético difícil de degradar

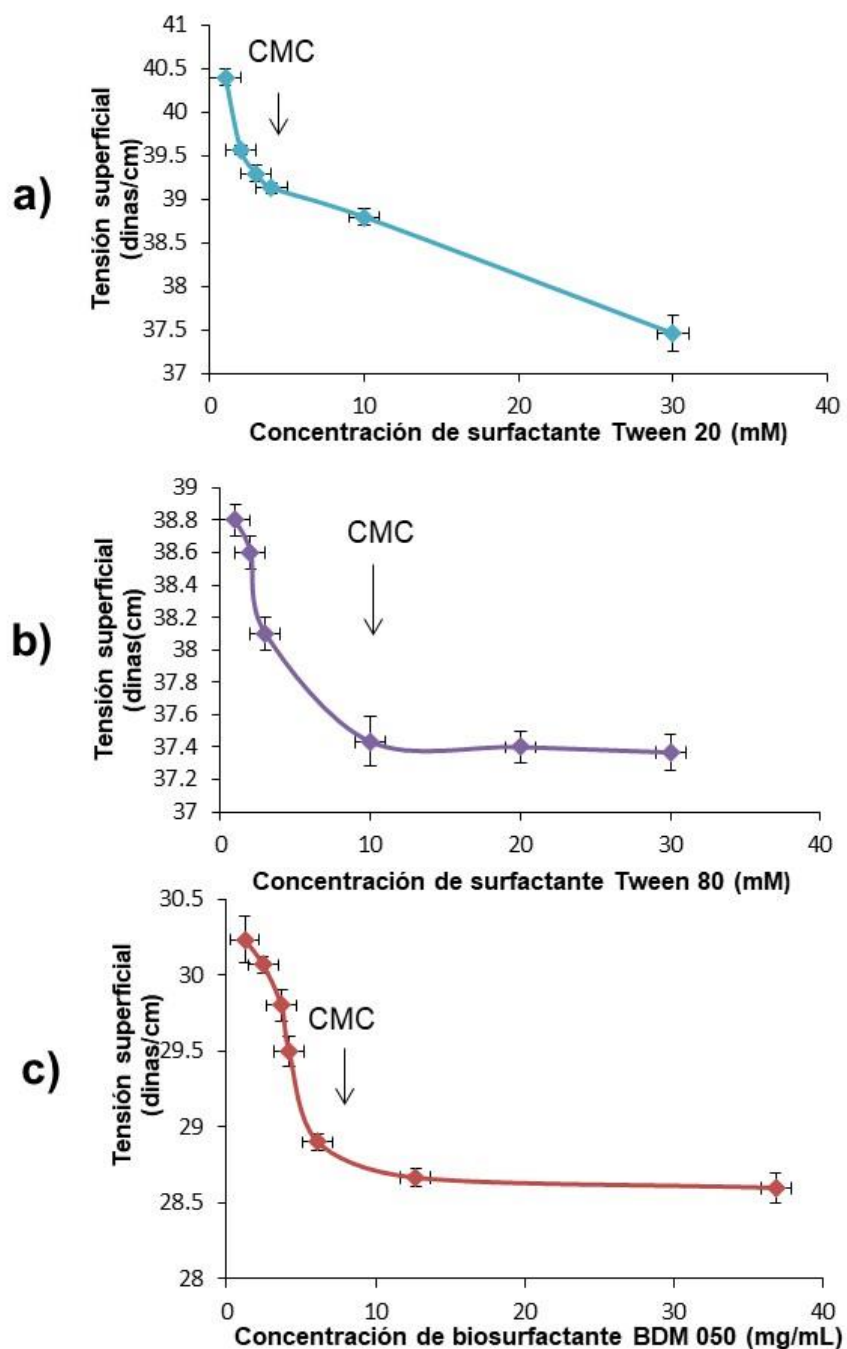


Figura 56. Concentración Micelar Crítica de surfactantes sintéticos. a) Puntos estándar de TS contra la concentración de Tween 20. b) Puntos estándar de TS contra la concentración de Tween 80. La TS fue medida en un 10 mL de agua destilada.

Dado que la CMC es un importante parámetro para evaluar la actividad Bs, una baja CMC nos indica la cantidad mínima requerida para bajar la TS del medio y dar paso a la formación del ensamble micelar. Como resultado, el Bs puede cambiar las propiedades de superficie, mostrando funciones de

solubilización, emulsificación y actividad humectante con respecto a la concentración de un Bs. Por lo tanto, los resultados de CMC entre la cepa SM3 y SMRG-5 se muestran en la figura 57.

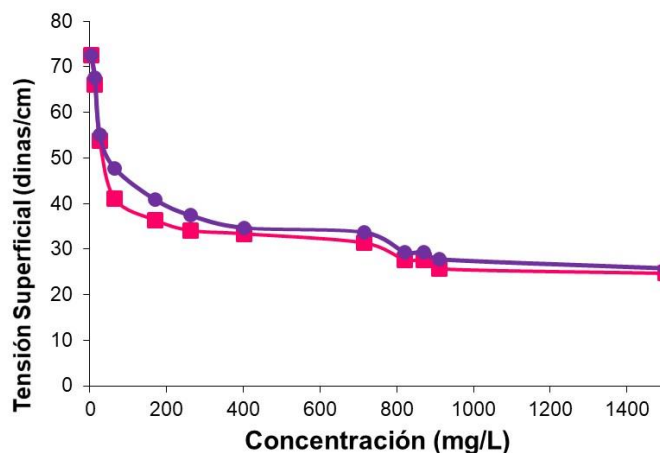


Figura 57. Concentración Micelar Crítica, TS contra Bs crudo concentrado de las cepas SM3 (●), SMRG-5 (■).

Una disminución de la TS de 25.8 and 24.7 dinas/cm fue observada en las cepas SM3 y SMRG-5, respectivamente. En este punto, la CMC de cada Bs fue de 0.898 and 0.820 g/L, respectivamente. Esta CMC es baja comparada con respecto a un surfactante sintético como el dodocil-sulfato de sodio (SDS), este último, tiene una CMC de 2.1 g/L [88]. La CMC ha sido reportada para diversos Bs disponibles, un ejemplo de ello es el de *P. aeruginosa* MM1011, el cual presenta una CMC de 1 g/L y reduce la TS a 26.5 dinas/cm [89]. Por lo tanto, la CMC de ambas cepas nos indica que el tipo de agente tensoactivo que secretan ambas bacterias, pueden ser aplicadas potencialmente con la cantidad mínima requerida siendo altamente competitivas con respecto a los de origen sintético.

La TS que presenta el extracto crudo concentrado de la cepa SM3 bajo las mismas condiciones de preparación de la muestra, indica que la concentración aproximada en la que se encuentra es de 1.5 mM con respecto a los surfactantes sintéticos Tween 20 y Tween 80 y el Bs comercial BDM050 con 44.5 dinas/cm. Con respecto a el extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 la concentración aproximada es de un 2.6 mM ya que presenta una TS de 39.4 dinas/cm bajo las mismas condiciones de preparación.

6.3.7 ETAPA II. CARACTERIZACIÓN DEL BS A LAS CEPAS SM3 y SMRG-5

6.3.7.1 Determinación de la actividad hemolítica a los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 de *S. marcescens*

Al evaluar la actividad hemolítica a los extractos crudos concentrados de ambas cepas, se observó que el porcentaje de hemólisis varía con respecto a cada cepa. Como se observa en la figura 58, el cálculo se realizó a partir del valor medio de las mediciones del absorbancia de las réplicas. En las pruebas realizadas sobre eritrocitos el máximo valor en hemólisis fue de 78.1% en el extracto crudo concentrado de la cepa SM3. El cálculo se realizó a partir del valor medio de las mediciones de absorbancia de las réplicas. Sin embargo se notó un tono café oscuro algo anormal en este ensayo con respecto al control positivo (Tween 80, 300 mM). El comportamiento que presentó el extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 fue en un tono rojizo acorde y un 25.7% de actividad hemolítica.

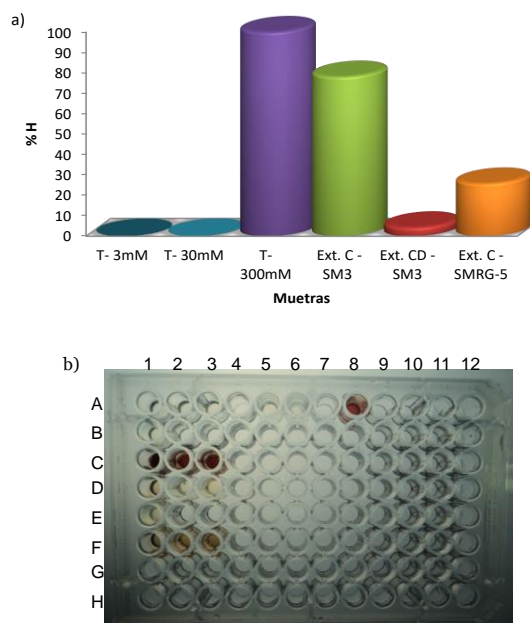


Figura 58. Ensayo de actividad hemolítica a los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5. a) Relación entre el %H con respecto a los extractos crudos concentrados y controles positivo y negativo. b) A₁-A₃ Tween 80, 3mM; A₅-A₇ Tween 80, 30mM; A₈-A₁₀ Tween 80, 300Mm (control +); B₁ extracto crudo concentrado de la cepa SM3 en agua (control -); C₁-C₃, extracto crudo concentrado de la cepa SM3; D₁-D₃, extracto crudo de la cepa SM3; E₁-E₃, extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5; F₁ extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 en agua (control -).

Por lo tanto, este ensayo corrobora la presencia de un agente tenso-activo en los extractos crudos concentrados de ambas cepas de *S. marcescens* (SM3 y SMRG-5). Como se observa, el pigmento en la cepa silvestre ejerce un efecto sobre la medición de la absorbancia y por lo tanto, el porcentaje es mayor en este extracto. No obstante el porcentaje de actividad hemolítica en la cepa mutante es

menor ya que en esta, no interfiere la prodigiosina. Por lo que estos datos sustentan que el pigmento ejerce un efecto de interferencia en la actividad hemolítica medida a los eritrocitos totales, no sucede así cuando ambas cepas son analizadas en placa con agar sangre, los resultados en esta última son inversos. Es decir, la formación de halos de actividad hemolítica es ligeramente más prominente en la cepa SMRG-5 con respecto a la silvestre.

669*

6.3.8 Cromatografía de Gases Acoplado a Masas a los Extractos crudos concentrados de la cepa SM3 y SMRG-5

La CG-MS Esta herramienta nos permite separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. Por lo que en esta sección se describen los resultados de los extractos crudos concentrados de ambas cepas, sometidos a fraccionamiento por columna abierta en sílica gel (ver materiales y métodos). Tres de las 12 fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de Bs de la cepa SM3, revelaron la presencia de esteres metilados de ácido hexadecanoico con formula y peso molecular: $C_{16}H_{32}O_2$ with 298.28 g/mol (Figura 59a).

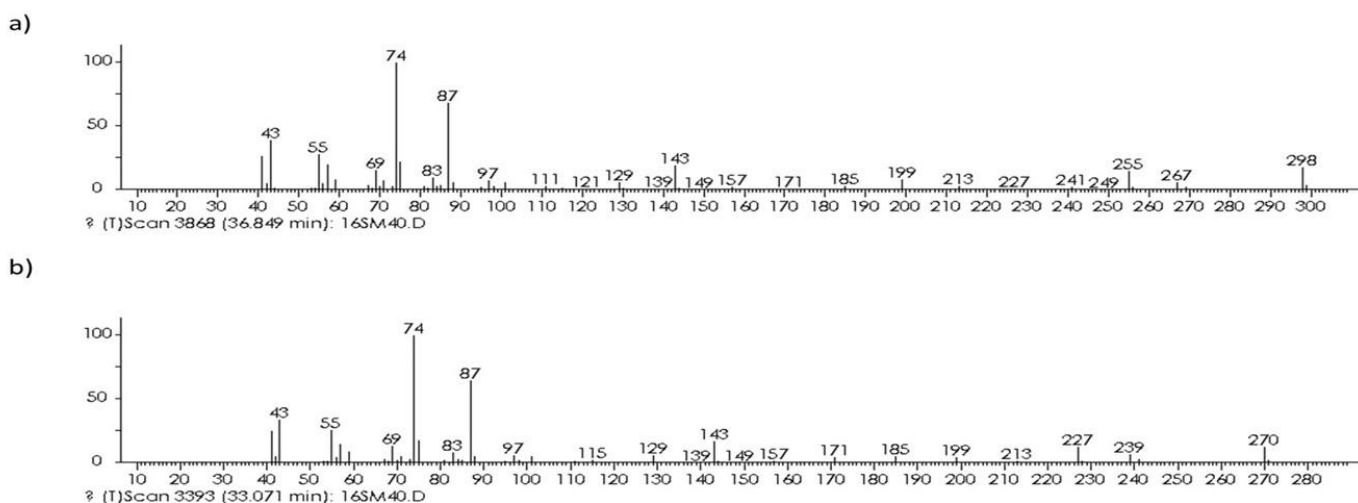


Figura 59. Espectros de Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG-EMS) de la fracción 3 de Bs en: a) Cepa SM3 y b) Cepa SMRG-5

Cabe señalar que las fracciones restantes analizadas, presentaron compuestos trazas de algunos grupos como amino, talatos que son compuestos remanentes del solvente empleado (Anexos, figura 1).

Para el caso de las fracciones de Bs purificados en la cepa SMRG-5, cuatro de 12 fracciones fueron identificadas con presencia mayoritaria de ácido octadecanoico. (Figura 59b). Los esteres de ácidos grasos predominantes en esta cepa presentan una formula $C_{18}H_{36}O_2$ con peso molecular de 270.450

g/mol. Estos datos son congruentes con los reportados por Ibrahim et al., [90], quienes atribuyen la fracción hidrofóbica al tipo de sustrato empleado, similar a esta cepa.

Las fracciones hidrofílicas para ambas cepas no pudieron ser analizadas en este sistema de purificación, ya que posiblemente al realizar la hidrólisis, esta fracción fue fraccionada y es por ello que en todas las fracciones de Bs analizadas presentan trazas de diversos grupos ya antes mencionados. El tipo, característica y composición de la diversidad de Bs que existen; dependen de la cepa, fuente de carbón y estrategias de procesamiento, como se mencionó previamente. Sin embargo: en estas cepas se encontró una diferencia en la cadena hidrocarbonada, lo que nos señala un indicio de los cambios ocurridos en la cepa isogénica con respecto a la Silvestre, bajo las mismas condiciones de producción de Bs, se han reportado diversidad de estructuras en diversas especies, esto atribuido al tipo de sustrato empleado [91]. Interesantemente, en este estudio, podemos corroborar la producción de dos diferentes tipos de moléculas de Bs, empleando el mismo sustrato y una cepa isogénica, capaz de desempeñar la actividad Bs, mejor que la cepa Silvestre, por lo que sus propiedades bioquímicas le confieren gran potencial para diversas aplicaciones. El perfil cromatográfico CG-MS confirma los dos tipos diferentes de ésteres de ácidos grasos unidos o libres (alusivo a la fracción hidrofóbica), secretados. Reportes de Bs con ésteres de ácidos grasos como fracción hidrofóbica, han sido estudiados por Matsuyama et al [86], Ibrahim [90], Mientras que en otras especies de bacterias como *Rhodococcus sp* TW53 aisladas de columnas de agua del océano pacífico, presentan en sus extractos de Bs fracciones de ácido hexadecanoico [92].

Los Bs producidos por ambas cepas de *S. marcescens* son exolípidos activos de superficie que han demostrado tener diferentes funciones que se sustentan por su comportamiento en la actividad Bs y características fisiológicas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora de la cepa isogénica, pone en controversia y tela de juicio lo ya reportado por Sunaga et al., [72], quienes demuestran que la ausencia del gen *pswP*, afecta la producción en paralelo de Bs y prodigiosina en la cepa 274 de *S. marcescens*. Cabe señalar que este mismo gen se encuentra presente en nuestra cepa silvestre SM3 e isogénicas, pero la producción de Bs en estas mutantes se ve favorecido con un ligero incremento de actividad. Por lo que da la pauta para analizar donde se registro la mutación y que pudiese haber desencadenado.

6.3.9 Remoción de Benzo [α] Pireno (BaP)

Los ensayos de remoción de BaP fueron llevados a cabo en los medios óptimos a la producción de Bs determinados previamente en ambas cepas. La concentración inicial de BaP fue ajustada a 36ppm, y el porcentaje de remoción registrado para ambas cepas fue del 59% durante las primeras 72 h de fermentación, la figura 60 muestra como la concentración de BaP va transformándose durante las primeras 72 horas de cultivo. Interesantemente ambas cepas promueven un comportamiento diferente, sin embargo el porcentaje de remoción en ambas fue el mismo, cabe destacar que la cepa SMRG-5 ejerce un patrón similar a las cinéticas de producción de Bs, es decir reduce el porcentaje de BaP al mismo tiempo que es secretado el agente activo.

La secreción de Bs durante la fermentación en ambas cepas mostro un incremento en la solubilidad del medio de cultivo de manera homogénea. Por lo que esta cepa posee gran potencial catabólico para degradar o solubilizar contaminantes hidrofóbicos, interactuando sinérgicamente con la producción de Bs. Diversos reportes, demuestran que especies de *Pseudomonas* BP10 y *Rhodococcus* sp NJ2 son capaz de degradar petróleo hasta en un 60% posterior a los 30 días de incubación [93]. Mientras que en este estudio se alcanza casi el mismo porcentaje en menos de 10 días En efecto, los Bs producidos in situ pueden contribuir significativamente a la emulsificación y solubilización de petróleo incrementando su biodisponibilidad.

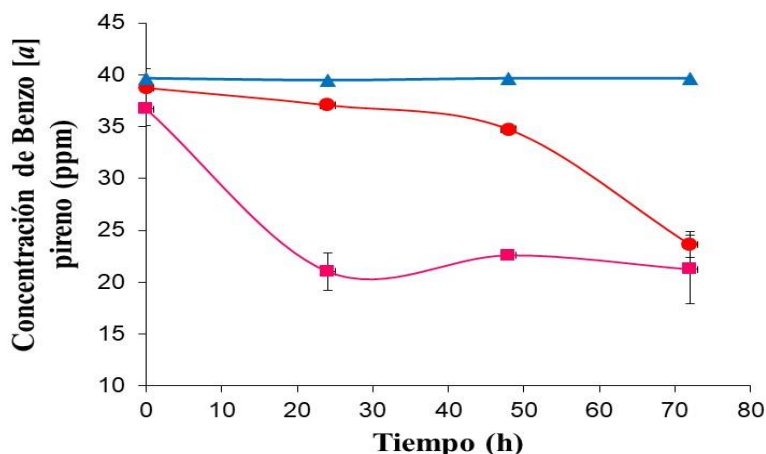


Figura 60. .Cinética de Remoción de Benzo [α] Pireno por la SM3 (●) y SMRG-5 (■).Control concentración de BaP (▲).

El ensayo de remoción de BaP, también fue llevado a cabo en las cepas mutantes SMRG-4 y SMRG-3, cepas generadas por mutagénesis química, mencionadas previamente en antecedentes. Los resultados demuestran que ambas cepas son capaz de remover en BaP en un 59% al igual que las cepas silvestre y SMRG-5.

Estudios de estabilidad indican que el porcentaje de emulsión y la TS en extractos de Bs en ambas cepas, permanecen constantes después de 9 meses, y con actividad Bs cuando es sometido a 60-100°C. Por lo tanto, los Bs estudiados en este trabajo presentan potencial idóneo, en la remoción de hidrocarburos policíclico aromáticos bajo reservorios con diferente salinidad, pH y altas temperaturas. De acuerdo a la literatura, bacterias tolerantes a hidrocarburos como *S. marcescens* degradan petróleo crudo por arriba del 90% después de 20 días de cultivo [90].

6.3.10 Identificación molecular y polifásica de las cepas de *S. marcescens*

Además de los estudios realizados establecidos en este proyecto, las cepas SM3 y SMRG-57 fueron caracterizadas bioquímica y microbiológicamente, siguiendo el protocolo del manual Bergey's, como se muestra en la tabla 58.

Tabla 58. Características microbiológicas de las cepas SM3 y SMRG-5

Análisis	Resultados	
	Cepa SM3	Cepa SMRG-5
Tinción de Gram	-	-
Motilidad	+	+
Consumo de Citrato	+	+
Oxidasa	-	-
HierroTriple	-	-
Sulfuro de Hidrógeno	-	-
Quitinasa	+	+
Lipasa	+	+
Catalasa	+	+
Glucosa	-	-
Maltosa	-	-
Ramnosa	-	-
Lactosa	-	-
Sucrosa	+	+

Las cepas fueron también identificadas vía análisis molecular con la amplificación y secuenciación de gen *gyrB* y 16S rRNA. Ambas cepas fueron identificadas como *S. marcescens* (Figura 61). El DNA genómico fue secuenciado usando los pares de primer universales 27-F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 907-R (5'-CCGTC AATTCMTTTRAGTTT-3') para las regiones 3 y 4. Para el caso del gen *gyrB* este fue secuenciado por PCR y los productos fueron secuenciados usando *gyrB*-UP1Sec (GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTGCA-forward primer) y *gyrB*-UP2rSec (AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CC-reverse primer) [94].

Las secuencias obtenidas a partir del 16S y *gyrB* fueron manipuladas usando el software Bioedit, BLASTN-NCBI y BLASTX. El análisis de alineamiento múltiple fue realizado con CLUSTAL W y CLUSTAL X. El análisis filogenético fue llevado a cabo usando el software the phylogeny fr: TreeDyn. [95]. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con NCBI-BLAST y comparadas con las secuencias de GenBank (NCBI) usando algoritmos BLASTN y BLASTX. La secuencia fue alineada en CLUSTALX.

El alineamiento múltiple reveló un 98% de identidad con respecto a *Serratia* sp. Un árbol filogenético fue generado usando las secuencias parciales del producto de PCR del gen *gyrB* [88]. Ambas cepas se agrupan con *S. marcescens* y presentan una identidad con respecto a otras cepas como DOAB 216-82, AGPim1A (99 %), B3 (99 %), SSM2560 and G3770 (98 %).

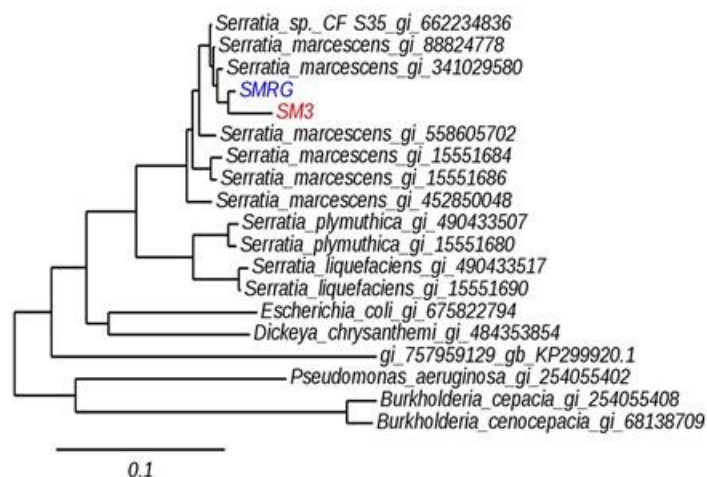


Figura 61. Análisis filogenético de las cepas SM3 y SMRG-5 usando la secuencia parcial del gen *gyrB* y su relación con otras cepas reportadas *S. marcescens*. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de sustituciones. Software the Phylogeny fr software.

6.3.11 Secuenciación del genoma de Cepas de *S. marcescens* SM3, SMRG-5, SMRG-4 y SMRG-3

Los genomas de las cepas SM3, SMRG-5, SMRG-4 y SMRG-3 fueron secuenciados usando la plataforma Illumina. El tamaño generado para el draft del genoma de las cepas fue de 5211345 pb, 5209248 pb, 5156061 pb y 5498252 pb, estas comprenden 27, 30, 25 y 28 contigs. Contienen además 4734, 4741, 4727 y 5017, secuencias codificantes (CDS), 26, 26, 3 y 26, rRNAs, y 82,74, 54 y 78 tRNAs, respectivamente).

Una búsqueda bioinformática preliminar realizada a estas cepas, ha demostrado homología con diferentes vías biosintéticas identificadas y su homología con otras especies como se observa en la tabla 59.

Tabla 59. Vías identificadas en el genoma de las cepas SM3, SMRG-3, SMRG-4 y SMRG-5

Genoma	ID Proteína Identificada	Homólogos en el genoma	Vías identificadas
SM3	KZP92658	PROKKA_02806 UDP-Glc:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-glucosyltransferase WfgD	-
	WP_015368046.1	PROKKA_04093 Capsular glucan synthase	-
	NP_250123.1	-	-
	NP_250121.1	PROKKA_04287 Regulatory protein SdiA	Sistema de dos componentes, Quorum Sensing, Formación de Biofilm - <i>Escherichia coli</i>
	NP_250562.1	PROKKA_02907 Murein DD-endopeptidase MepM	-
	NP_252413.1	PROKKA_02054 Phenolic acid decarboxylase subunit D	Degradación Amino-benzoato
	P54291.2	-	-
	XP_020223349.1	-	-
	YP_105605.1	-	-
	WP_012989257.1	PROKKA_04413 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	-Biosíntesis de Ác. Grasos -Metabolismo de Biotina -Biosíntesis de Ác. Grasos insaturados
	ADF62088.1	PROKKA_04411 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	-Biosíntesis de Ác. grasos
	YP_004590887.1	-	-
	YP_003611743.1	PROKKA_03557 Multidrug efflux pump subunit AcrB	-Resistencia a beta-Lactama Resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos(CAMP)
	YP_003614372.1	PROKKA_01213 Flavohemoprotein	-Infección a Salmonella
	SMRG-3	KZP92658	PROKKA_04648 UDP-Glc:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-glucosyltransferase

WP_015368046.1	PROKKA_03727 Capsular glucan synthase	-
NP_250123.1	PROKKA_04887 PhoPQ- activated pathogenicity- related protein	-
NP_250121.1	PROKKA_01364 Extracellular minor metalloprotease precursor	-
NP_250562.1	PROKKA_04547 Murein DD-endopeptidase MepM	-
NP_252413.1	PROKKA_01364 Extracellular minor metalloprotease precursor	-
P54291.2	PROKKA_04179 Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein YecS	-
XP_020223349.1	PROKKA_00170 Thiol:disulfide interchange protein DsbD precursor	-
YP_105605.1	PROKKA_05000 Non- heme chloroperoxidase	-
WP_012989257.1	PROKKA_03408 3- oxoacyl-[acyl-carrier- protein] reductase FabG	-Biosíntesis de Ác. Grasos -Metabolismo de Biotina -Biosíntesis de Ác. Grasos insaturados
ADF62088.1	PROKKA_03410 3- oxoacyl-[acyl-carrier- protein] synthase 3	-Biosíntesis de Ác. Grasos
YP_004590887.1	PROKKA_00807 4- methylaminobutanoate oxidase (formaldehyde- forming)	-
YP_003611743.1	PROKKA_04265 Multidrug efflux pump subunit AcrB	-Resistencia a beta- Lactama -Resistencia a Péptidos Antimicrobianos Cationicos (CAMP)
YP_003614372.1	PROKKA_01334 Flavohemoprotein	Infección a Salmonella
SMRG-4 KZP92658	PROKKA_04377 UDP- Glc:alpha-D-GlcNAc- diphosphoundecaprenol	-

	beta-1,3-glucosyltransferase WfgD	
WP_015368046.1	PROKKA_03370 Capsular glucan synthase	-
NP_250123.1	PROKKA_04138 PhoPQ-activated pathogenicity-related protein	-
NP_250121.1	PROKKA_00067 Transcriptional activator protein EsaR	-
NP_250562.1	PROKKA_04479 Murein DD-endopeptidase MepM	-
NP_252413.1	PROKKA_00920 Extracellular minor metalloprotease precursor	-
P54291.2	PROKKA_01391 Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein YecS	-
XP_020223349.1	PROKKA_02028 Thiol:disulfide interchange protein DsbD precursor	-
YP_105605.1	PROKKA_04026 Non-heme chloroperoxidase	-
WP_012989257.1	PROKKA_03052 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	-Biosíntesis de Ác. grasos -Metabolismo de Biotina -Biosíntesis de Ác. Grasos insaturados
ADF62088.1	PROKKA_03054 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	Biosíntesis de Ác. grasos
YP_004590887.1	PROKKA_00278 4-methylaminobutanoate oxidase (formaldehyde-forming)	
YP_003611743.1	PROKKA_01477 Multidrug efflux pump subunit AcrB	-Resistencia a beta-Lactama -Resistencia a Péptidos Antimicrobianos Catiónicos (CAMP)
YP_003614372.1	PROKKA_00950 Flavoheмоprotein	Infección a Salmonella
SMRG-5 KZP92658	PROKKA_02952 UDP-Glc:alpha-D-GlcNAc-diphosphoundecaprenol beta-1,3-glucosyltransferase WfgD	
WP_015368046.1	PROKKA_04175 Capsular glucan synthase	

NP_250123.1	PROKKA_03191 PhoPQ-activated pathogenicity-related protein	
NP_250121.1	PROKKA_00015 Transcriptional activator protein EsaR	
NP_250562.1	PROKKA_02851 Murein DD-endopeptidase MepM	
NP_252413.1	PROKKA_01292 Extracellular minor metalloprotease precursor	
P54291.2	PROKKA_04620 Inner membrane amino-acid ABC transporter permease protein YecS	
XP_020223349.1	PROKKA_02769 Thiol:disulfide interchange protein DsbD precursor	
YP_105605.1	PROKKA_03304 Non-heme chloroperoxidase	
WP_012989257.1	PROKKA_03856 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	Biosíntesis de Ác. Grasos -Metabolismo de Biotina -Biosíntesis de Ác. Grasos Insaturados
ADF62088.1	PROKKA_03858 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	-Biosíntesis de Ác. grasos
YP_004590887.1	PROKKA_00827 4-methylaminobutanoate oxidase (formaldehyde-forming)	
YP_003611743.1	PROKKA_04706 Multidrug efflux pump subunit AcrB	-Resistencia a beta-Lactama -Resistencia a Péptidos Antimicrobianos Cationicos (CAMP)
YP_003614372.1	PROKKA_01262 Flavohemoprotein	Infección a Salmonella

Cabe destacar que la secuenciación del genoma de la cepa silvestre y sus derivadas, tienen por objeto el saber donde callo la mutación y hacer una comparación entre ellas, para delimitar las rutas biosintéticas que aún no están reportadas, esto como proyecto a futuro próximo.

La generación de cepas isogénicas a partir de la cepa pigmentada hasta ahora han arrojado diferencias en cuanto a tamaño, composición y actividad Bs por lo que nos da la pauta para analizarlas con respecto a otras actividades. Cabe señalar que la cepa mutante SMRG-4 ya ha sido explorada y se sabe secreta una lipasa termoestable con capacidad de biotransformar residuos de aceites y con futura aplicación en la generación de biodiesel.

6.3.12 Mutagénesis por Transposición- mini-Tn5 de la cepa SM3

Los eventos de transposición múltiple por transposón Tn-5 para la búsqueda de cepas productoras de Bs no pigmentadas, derivadas de la cepa pigmentada silvestre SM3; nos permitirían obtener información acerca de los posibles o posible gen involucrado (s) en la producción de prodigiosina y a su vez aumentando la producción de Bs en cepas derivadas de la cepa silvestre.

El plásmido que contiene la cepa de *E. coli* S17-1 λ -Pir fue introducido por conjugación en la cepa SM3 de *S. marcescens* [96]. Un total de 61 de 9,054 transconjugantes fueron analizadas con respecto a su fisiología, es decir solo se seleccionaron aquellas colonias que fueran blancas y que no revirtieran el pigmento haciendo una resiembra de al menos 8 veces. El análisis de producción de Bs en estas cepas no pigmentada mutantes, fue llevado a cabo en medio de cultivo apto para la producción de Bs previamente estudiado mediante los diseño factorial 2^3 (medio 8, ver materiales y métodos). La tabla 60, muestra la reducción de la TS de cada cepa analizada con respecto a la producción de Bs. Clasificándolas con respecto al rango de reducción de la TS.

Tabla 60. Reducción de la tensión superficial de las cepas mutantes obtenidas por transposición mini-Tn5

Cepas Mutantes	Rango de Reducción de la Tensión Superficial (dinas/cm)	Rango de Índice de Emulsión (%)
1 – 23	68 – 62	N/E ₂₄
24 – 31	61- 59	2
32 – 39	58 – 56	2
40 – 52	55 – 50	2
53 – 61	49 – 45	6

Cabe destacar, que se analizaron solo 37 colonias pigmentadas que en su fisiología habían sido afectadas por dicha mutación se probaron 17 colonias pigmentadas en tono rosa, mientras que las 20 restantes fueron colonias bacterianas sumamente pigmentadas, es decir, un tono rojo intenso, caso curioso que llamo la atención, sin embargo la producción de Bs no fue significativo, ya que el valor de reducción de la TS se registró por arriba de las 45 dinas/cm.

La generación de nuevas cepas productoras de Bs con la característica de no presentar pigmento, no fue posible mediante esta técnica. Sin embargo, esta técnica nos permitió saber la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos Kanamicina y tetraciclina en una concentración de 80-15 μ g/mL

6.4 CONCLUSIONES

El sistema de extracción IV con acetato de etilo fue el que permitió obtener mayor eficiencia de extracto crudo concentrado para ambas cepas SM3 y SMRG-5, En este método una ligera diferencia es percibida en la actividad Bs en esta última cepa. Esto se atribuye posiblemente a la ausencia de pigmento en esta cepa y el incremento en su producción.

- La digestión de los extractos crudos concentrados de las cepas SM3 y SMRG-5 permitió corroborar mediante un gel de proteínas desnaturizante SDS-PAGE 12% que no se encuentran proteínas contaminantes en cada extracto.
- En los perfiles cromatográficos analizados por HPLC del extracto crudo concentrado de la cepa SM3 se observan 12 fracciones distintas, con actividad Bs. Las fracciones purificadas por columna abierta con sílica gel (60 MESH) fueron sometidas a análisis por CG-MS.
- El análisis por HPLC del extracto crudo concentrado de la cepa SMRG-5 presenta 13 fracciones colectadas y analizadas por actividad Bs. Los extractos crudos concentrados fueron purificados por sílica gel (60 MESH), y las fracciones marcadas con el número 1, 2 y 3 fueron analizadas por CG-MS.
- El perfil cromatográfico de extractos crudos de Bs en ambas cepas, presenta un perfil comparativo y diferente al Bs de tipo comercial. Sin embargo, los picos registrados al mismo tiempo de retención al Bs comercial presentan actividad Bs en ambas cepas.
- La CMC de ambas cepas (SM3: 0.893 y SMRG-5: 0.820 g/L) se encuentra por debajo de la registrada en surfactantes de origen sintético como el Tween 80 que es de 2.1 g/L. Por lo tanto, los Bs de ambas cepas son altamente competitivos para su aplicación, ya que la reducción de la tensión superficial fue de 25.8 y 24.7, respectivamente.
- El porcentaje de actividad hemolítica fue medida a los eritrocitos totales con un 78.1% para el extracto crudo de Bs en la cepa SM3 y 25.7%, esta discrepancia en ambos resultados posiblemente sea debido a la presencia de pigmento en el extracto crudo de Bs en la cepa silvestre.

- El análisis por CG-MS realizado a las fracciones purificadas de Bs en ambas cepas, demuestra la presencia de esteres metilados de ácido hexadecanoico con formula $C_{16}H_{32}O_2$ con peso de 298.28 g/mol en la cepa silvestre SM3, mientras que para la cepa SMRG-5 se registró la presencia de esteres de ácidos grasos de ácido octadecanoico con formula $C_{18}H_{36}O_2$ con peso molecular de 270.45 g/mol. Cabe señalar que estos datos corresponden a la fracción hidrofóbica en Bs de ambas cepas.
- Los ensayos de remoción de BaP demuestran la capacidad degradadora de estas cepas por sustratos hidrofóbicos, ya que el porcentaje de remoción fue del 59% durante las primeras 72 h de cultivo en medios que favorecen la producción de Bs en ambas cepas, lo que las hace altamente competitivas para su uso en el área de biorremediación.
- La identificación molecular y polifásica realizada a estas cepas complementa los resultados hasta ahora obtenidos, mientras que la secuenciación del genoma permitirá llevar a cabo un análisis detallado y definitivo a la búsqueda de la mutación generada en las isogénicas cepas no pigmentadas, así como la complementación de resultados metagenómicos que sustenten la resolución de la ruta de biosíntesis para Bs en estas cepas.

CAPITULO VII

7.1 CONCLUSIONES FINALES

Las cepas bacterianas identificadas como *S. marcescens*, mediante análisis molecular por amplificación de los genes *16S* y *gyrB*, incrementan la actividad Bs en presencia de altas y bajas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno (SM3 y SMRG-5 respectivamente). Al evaluar los medios de cultivo en glucosa y glicerol, este último; favorece dicha producción en ambas cepas registrando una reducción de la TS de 26.5 y 25.2 dinas/cm, mientras que el IE₂₄ es del 79.9 y 89.9% en SM3 y SMRG-5, respectivamente. El porcentaje de actividad hemolítica se ve favorecido en los extractos de la cepa SM3 con un 78%, mientras que en SMRG-5 fue de 27%, lo que se atribuye a la presencia del pigmento. El análisis de CG-MS demuestra que la fracción hidrofóbica identificada en la cepa SM3 presenta un éster de ácido graso libre con formula molecular C₁₆H₃₄O₂ con un peso de 298.25 mg/mol corresponde a un ácido Hexadecanoico, mientras que la cepa SMRG-5 tiene una fracción apolar con formula molecular C₁₈H₃₆O₂ y peso de 270.450 g/mol, corresponde a un ácido Octadecanoico. En ambas cepas la CMC, se registra por debajo de la concentración a la que actúa un surfactante de origen sintético. Por lo que ambas cepas tienen un alto potencial de usar sus productos metabólicos en diversas áreas biotecnológicas. La capacidad de los Bs para remover el BaP, fue demostrado durante las primeras 72 H de fermentación. Ambas cepas presentan gran potencial para su aplicación en biodegradación de hidrocarburos.

CAPITULO VIII

8.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., SantosV.A, Sarubbo, L.A (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st Century.
2. (Biosurfactants Market-Global Scenario, Raw Material and Consumption trends, Industry Analysis, size, share and forecasts, 2011-2018 [database on the internet]. [cited 10/11/2012]. Available from: [http://www. Transparencymarketresearch.com](http://www.Transparencymarketresearch.com)).
3. Rosas-Galván, Nashbly Sarela (2011). Estudio de la producción de Biosurfactantes por cepas de *Serratia marcescens*. Tesis de Maestría en Biotecnología.
4. Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Coll. Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.* **152**: 41-52.
5. Fiechter A. (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* **10**: 208-217.
6. Banat, I.M, Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, I. (2010) Microbial biosurfactants production, applications and potential. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **87** (2): 427-444
7. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **53**(5): 495-508.
8. Domínguez A, Fernández A, González N, Iglesias E, Montenegro L (1997). Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *J. of chem. Education.* **74**:1227-1231.
9. Abdel-Mawgoud, A.M; g Lépine, F; Deziel, E. (2008). Production, characterization and applications of biosurfactants- Review. *Biotechnology* **7**: 360-370.
10. Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* **60**:151–166.
11. Desai JD y Banat IM. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev* **61**:47–64.
12. Rosenberg, E., Ron, EZ., (1999). High and low molecular mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 154-162.
13. Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R., and Banat, I. M. (2010). "Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids," in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. K. N. Timmis (Berlin: SpringerVerlag),3705–3723.doi:10.1007/978-3-540-77587-4_291.

14. Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F (1979) Formation, isolation and characterization of trehalose dimycplates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol* **115**: 491-503
15. Gautam, K.K., Tyagi, V.K. (2006) Microbial Surfactants: A review. *J. Oleo Sci.* **55**:155-166.
16. Hu, Y., Ju, L.K. (2001) Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.* **87**: 263-272.
17. Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D. (2008) Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *Biochemys. Biotechnol.* **57**: 359-369.
18. Rosenberg, E., Ron, EZ. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3**. 229-236.
19. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, L., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**:427-444.
20. Hatha, A.A.M., Edward, G., Rahman, K.S.M.P. (2007). Microbial Biosurfactants-review. *J. Mar. Atmos. Res.* **3**: 1-17.
21. Gautam, KK., Tyagi, VK (2006) Microbial Surfactants. A review. *J. Oleo Sci.* **55**: 155-166.
22. Saharan, BS., Sahu, RK., Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation current developments and perspectives. *Genet. Engineer Biotechnol.* Vol: 2011: GEBJ-29.
23. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. (2010). Microbial biosurfactants production, applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 427-44.
24. Vijayakamar, S., Saravanan, V. (2015) Biosurfactants- Types, Sources and Applications. Resear. *J. Microbiol.* **10**: 181-192.
25. Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Maróstica, M.R., Pastore, G.M. (2007) Surfactina: Propiedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova.* **30**: 1-14.
26. Banat IM, Makkar RS, Cameotra, SS. (2000) Potential applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 495-508.
27. Bhardwaj, G., Cameotra, S.S.Chopra, H.K. (2013) Biosurfactants from Fungi: A review. *Pet. Environ. Biotechnol.* **4**: 1-6.
28. Cooper, D.G., Paddock, D.A. (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 173-176.
29. Casas, J.A., de Lara, S.G., García-Ochoa, F. (1997) Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 221-229.

30. Reis, R.S., Pacheco, G.J., Pereira, A.G., and Freire, D.M.G (2013) Biosurfactants: Production and Applications. Open Science/ Open minds (INTECH) Capítulo 2. (<http://dx.doi.org/10.5772/56144>).
31. Kitamoto, D, Ikegami, T, Suzuki, GT., Sasaki, A., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N., Yanagishita, H (2001) Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1709-1714.
32. Amezcua- Veja, C., Poggi-Varaldo, HM., Esparza-Garcia, F., Rodriguez-Vazquez, R. (2006) Effect of the conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. *Bioresour. Technol.* **98**: 237-240.
33. Henkel, M., Müller, M.M., Kügler, J.H., Lovaglio, R.B., Contiero, J., Syltatk, C. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem.* **47**(8): 1207-1219.
34. Robert, M., Mercadé, M.E., Bosh, M.P., Parra, J.L., Espiny, M.J., Manresa, M.A., Guinea, J. (1989) Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.
35. Mulligan, C.N., Gibbs, B.F. (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 3016-3019.
36. Deshpande, M., Daniels, L., (1995) Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour. Technol.* **54**: 143- 150.
37. Gustavo Varela. (2002). Fisiología y Metabolismo Bacteriano. Noviembre 2015, de CEFA Sitio web: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2011.pdf>.
38. Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B (1990). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 121-126.
39. Barbirato F, Himmi EH, Conte T, Bories A (1998). 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind. Crops Prod.*, **7**: 281-289.
40. Voegelé, R.T., Sweet, G.D., Boos, W. (1993). Glycerol Kinase of *Escherichia coli* Is Activated by Interaction with the Glycerol Facilitator. *J. Bacteriol.* **175**: 1087-1094.
41. Darbon, E., Kiyoshi Ito, K., Huang, H., Yoshimoto, T., Poncet, S., Deutscher J. (1999) Glycerol transport and phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation of glycerol kinase in *Thermus flavus*. *Microbiol.* **145**: 3205-3212.
42. Braun, T., Philippsen, A., Wirtz, S., Borgnia, M.J., Agre, P., Kühlbrandt, W., Engel, A., Stahlberg, H., (2000). The 3.7 Å projection map of the glycerol facilitator GlpF: a variant of the aquaporin tetramer. *EMBO Reports.* **1**:183-189.

43. Weber, L., Doge, C., Haufe, G., Hommel, R., Kleber, H.P. (1992) Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. *Biocatal.* **5**: 267-292.
44. Haritash, A.K., Kaushik, C.P. (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's). A review. *J. Hazard. Mater.* **169**: 1-15.
45. Hommel, R.K., Huse, K. (1993) Regulation of sophorose lipid production by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 853-858.
46. Tokumoto, Y., Nomura, N., Uchiyama, H., Imura, T., Morita, T., Fukuoka, T., Kitamoto, D. (2009) Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produce by *Rhodococcus* sp. SD-74. *J. Oleo. Sci.* **58**: 97-102.
47. Williams, P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiol. Pt.* **12**: 3923-3938.
48. Dekimpe, V., Deziel, E. (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiol.* **3**: 712-723.
49. Deziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol. Epub.* **55**(4): 998-1014.
50. Eppelmann, K., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **41**: 9718-9726.
51. Stachelhaus, T., Schneider, A., Marahiel, M.A., (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science.* **269**: 69-72.
52. Koglin, A., Walsh, C.T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 987-1000.
53. Roongsawang, N., Thaniyavarn, S., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S. (2002) Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin and surfactin. *Extremophiles.* **6**: 1084-1096.
54. Christopher C, Allen R, Boyd (1999) Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. *Applied and Environm. Microbiol.* **65**:1335-1339.

55. Van Dyke M.I., Gulley S., Lee H., Trevors J.T. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol* **39**: 1071-1080.
56. Layman P.L. (1985) Industrial surfactants set for strong growth. *Chem Eng News* **23**: 23-48.
57. Kosaric N., Cairns W.L., Gray NCC. (1987) Surfactant science series Dekker, New York (USA) 247-331.
58. Georgiou G., Lin S.C., Sharma M.M (1992) Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology* **10**: 60-65.
59. Khire J.M., Khan M.I. (1994) Microbes and the subsurface environment. *Enz. Microb Technol* **16**: 258-259.
60. Sunita, J.V., Vivek, N.U. (2017) Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Biores Technol.* **232**: 389-397.
61. Kronemberger FDASanta Anna LMM, Fernandes ACLB, Menezes RRD, Borges CP, Freire DMG. (2008). Oxygen- controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.***147** (1-3): 33-45.
62. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M., (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* **90**: 159-168.
63. Inakollu S, Hung H, Shreve GS (2004) Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed waste systems. *Environ Eng Sci* **21**:463–469.
64. Whang, L. M. Liu PWG, Ma CC, Cheng SS. (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. hazard Mater.* **151**(1), 155-63.
65. Neu, TR., Poralla, K. (1990) Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:521-525.
66. Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., La Colla, P., Tamburini, E., Papacchini, M., Bestetti, G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. Strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosp.* **75** (6): 801-807.
67. Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF, James S, Bennett HPJ (1999) Metal removal from contaminated soils and sediments by biosurfactants surfactin. *Environ Sci Technol* **33**:3812–3820.
68. Joutey, N.T., Bahafid, W., Sayel, H., ElGhachtouli, N. (2013) Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. Chapter **11**; doi: 10.5772/56194.

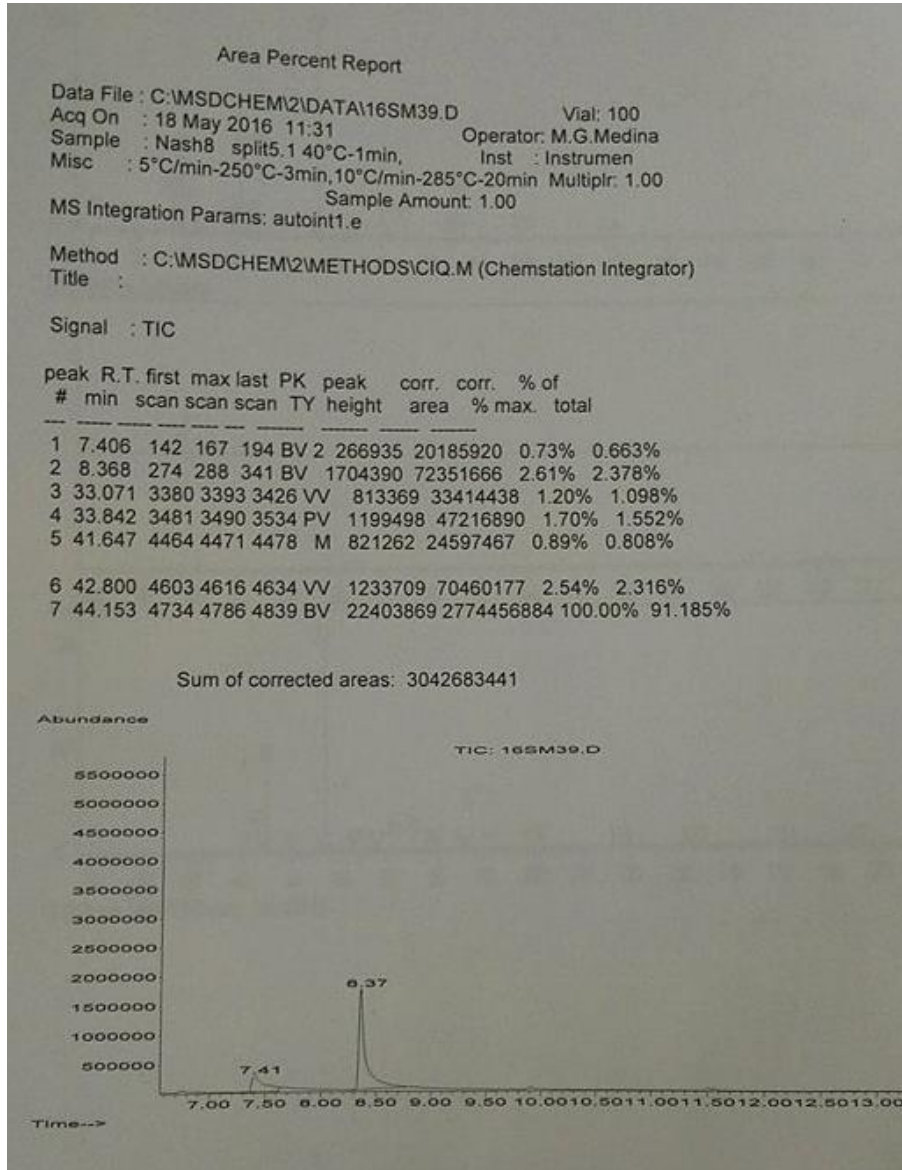
69. Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-López, L. (2009) Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future Prosp Sci Total Environ.* **407**: 3634-3640.
70. Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghtibi, D. (2015) Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ Sci Pollut Res.* Doi **10. 1007/s11356-015-4488-5**.
71. Hong Li, Tanikawa, T., Sato, Y., Nakagawa, Y., Matsuyama, T. (2005). *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to nonribosomal peptide synthetase family. *Microbiol. Immunol.* **49**(4). 303-310.
72. Sunaga, S., Li, H., Sato, Y., Nakagawa, Y., Maatsuyama., T. (2004). Identification and characterization of the pswP gene required for the parallel production of prodigiosin and serrawettin W1 in *Serratia marcescens*. *Microbiol. Immunol.* **48**: 723-728.
73. Ohno A., Takashi A., Shoda M (1996) Use of soybean curd residue, Okara for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic. IturinA by *Bacillus subtilis* NB22. *Process Biochem.* **3**: 801-806.
74. Makkar RS, Cameotra SS. (1997) Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *J Am Oil Chem Soc* **74**:887–889.
75. Dubey K yJuwarkar A. (2001) Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J Microbiol Biotechnol* **17**:61–69.
76. Montgomery, DC. (1997) Response surface methods and other approaches to process optimization. In: Montgomery DC (ed) Design and analysis of experiments. *Wiley, New York*, pp 427–510.
77. Jiménez de Pablo, E., Ingeniería Técnica Industrial Mecánica (2012). Determinación experimental de la tensión superficial del agua en cámara micro-reológica. Universidad Carlos III de Madrid, Esc. Politécnica superior. Departamento de Ingeniería Mecánica.
78. Cooper, D.G., Goldenberg, B.C. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environm. Microbiol.* **53**: 224-229.
79. Soo, P.C., Wei, J.R., Horng, Y.T., Hsieh, S.C., Ho S.W., Lai, H.C. (2005) Characterization of the dapA-nlpB genetic locus involved in regulation of swarming motility, cell envelope architecture, hemolysin production, and cell attachment ability in *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* **73** (9)6075-6084.
80. Roldan Carrillo, T., Martínez-García, X., Zapata-Peñasco, I., Castorena-Cortés, J., Reyes-Avila, M., Mayol-Castillo, M., Olguin-Lora, P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios

- on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. *Coll. Surf. Biointerf.* **86**: 384-389.
81. Bidlan R., Deepthi, N., Rastogi, N.K., Manonmani, H.K. (2007). Optimised Production of Biosurfactant by *Serratia marcescens* DT-1P. *Resear. J. Microbiol.* **2**: 705-716.
82. Nordin M,Y., Venkatesh, V.C., Sharif, S., Elting, S., Abdullah, A. (2004) Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 104 steel. *J. Mater. Process. Technol.* **145**: 46.58.
83. Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, KI., Hara-Hotta, H., Yano, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-depent and independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **174**: 1769-1776.
84. Lindum. PW, Anthoni. U, Christophersen. C, Eberi. L, Molin. S, Givskov, M. N-acyl-Homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for Swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol* **180**:6384-6388.
85. Badu, S., Vaidya, AN., Bal, AS., Kapur, E., Jueo A., Khanna P. (1996). Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotech. Lett.* **18**: 263-268.
86. Matsuyama, T., Kaneda, I. Ishizuka, T, Toida, and I, Yano (1990) Surface-Active Novel Glycolipid and Linked 3-Hydroxy Fatty Acids Produced by *Serratia rubidaea* *J. Bachteriol.* **172**: 3015-3022.
87. Pruthi V, y Cameotra SS (1997) Short communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface-active properties by *Serratia marcescens*. *W. J. of Microbiol. & Biotechnol* **13**: 132-135.
88. Chen, J., Wang, X.J., Hu, J.D., Tao, S. (2006). Effect of surfactants on biodegradation of PAHs by white-rot fungi *Environ Sci* 2006., **27**(1): 154-159.
89. Tahzibi, A., Kamal, F., Mazaheri, M. (2003). Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant I. *Biomedic J* **8**, 25-31.
90. Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., Umar, S. (2013) Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Intern. Biodeterior. Biodeg.* **81**: 28-34.
91. Gong, Z., Peng, Y., Wang, Q. (2015). Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by *Pseudomonas aeruginosa* with plant oils *Biotechnol Lett.* **37**, 2033-2038.
92. Peng F, Wang Y, Sun F, Liu Z, Lai Q, Shao Z (2008). A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53 *J Appl Microbiol* **105**: 698-705.

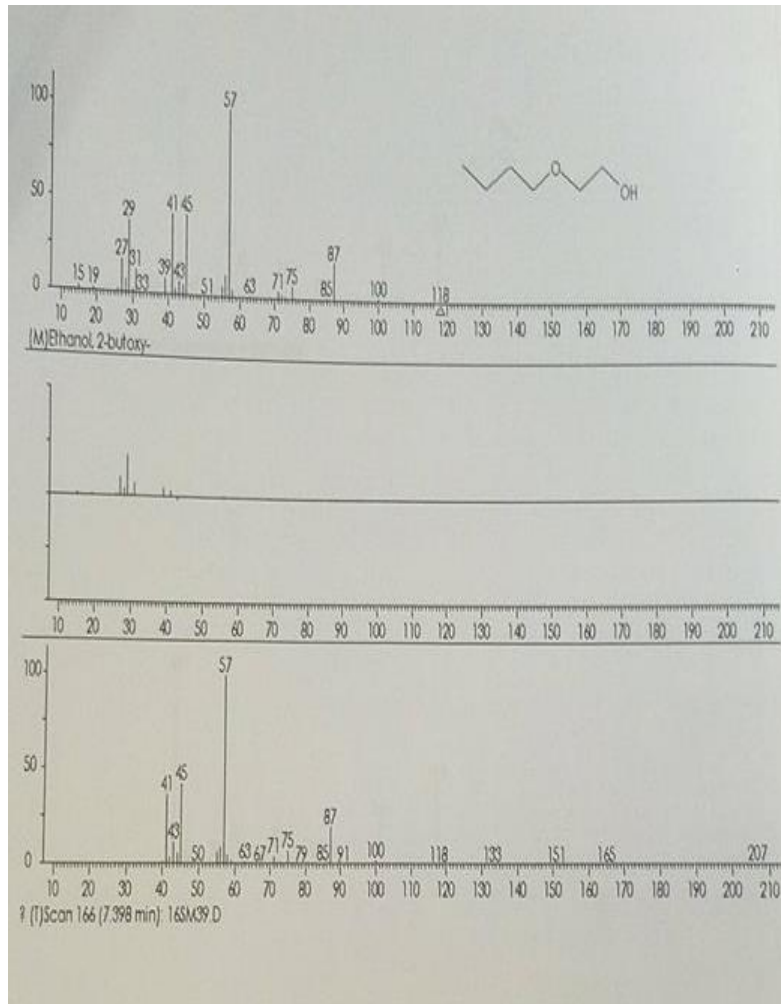
93. Yan, P., Lu, M., Yang, Q., Zhang, H., Zhang, Z., Chen, R. (2012). Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant producing *Pseudomonas*. *Bioresour. Technol.* **116**: 24-28.
94. Yamamoto and Harayama (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**: 1104-1109.
95. Dereeper A¹, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. (2008) Dereeperhylogeny fr. Robust phylogenetic analysis for the non-specialist.
96. Wilson, KJ., Sessitsch, JC., Corbo., KE., Giller, AD., Akkermans., Jefferson, RA. (1995). B-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiol.* **141**: 1691-1705.

ANEXOS

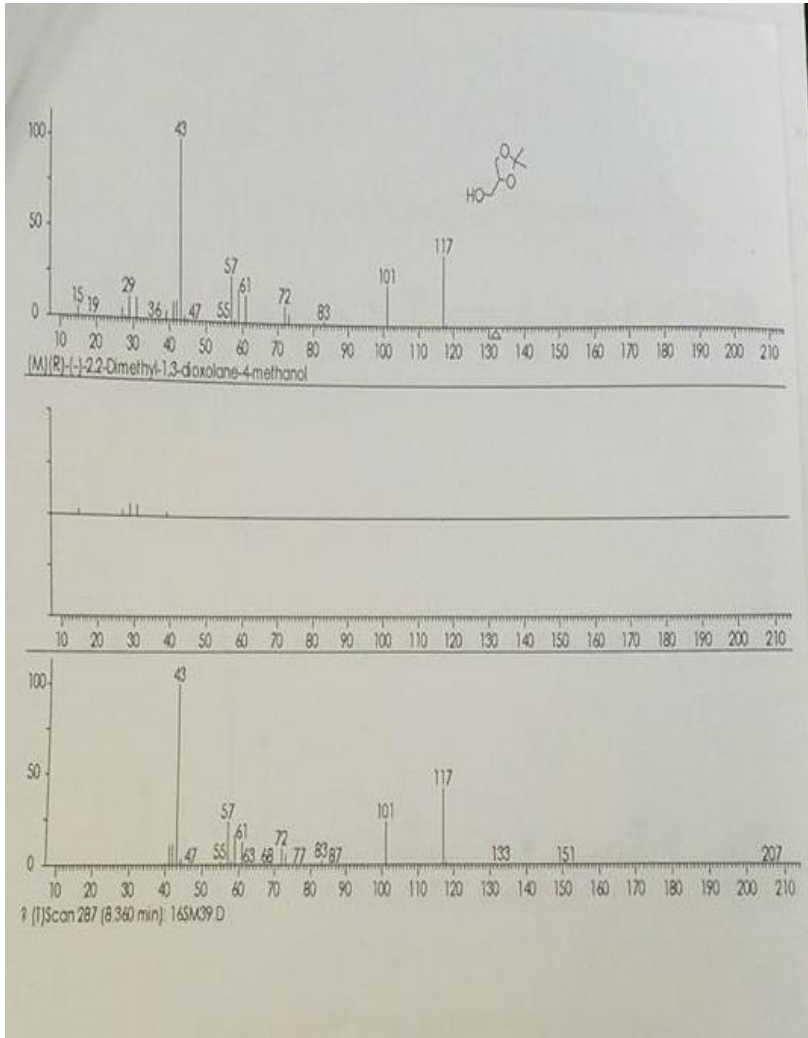
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SM3



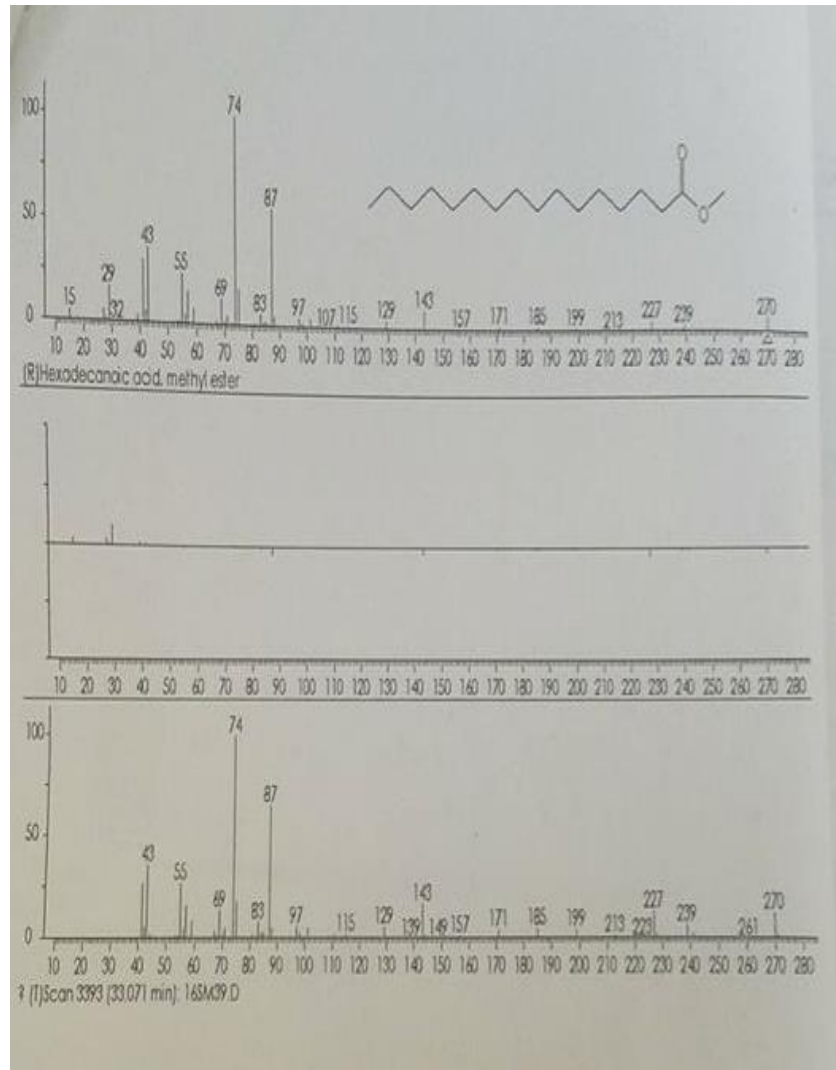
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SM3, fracción 1.



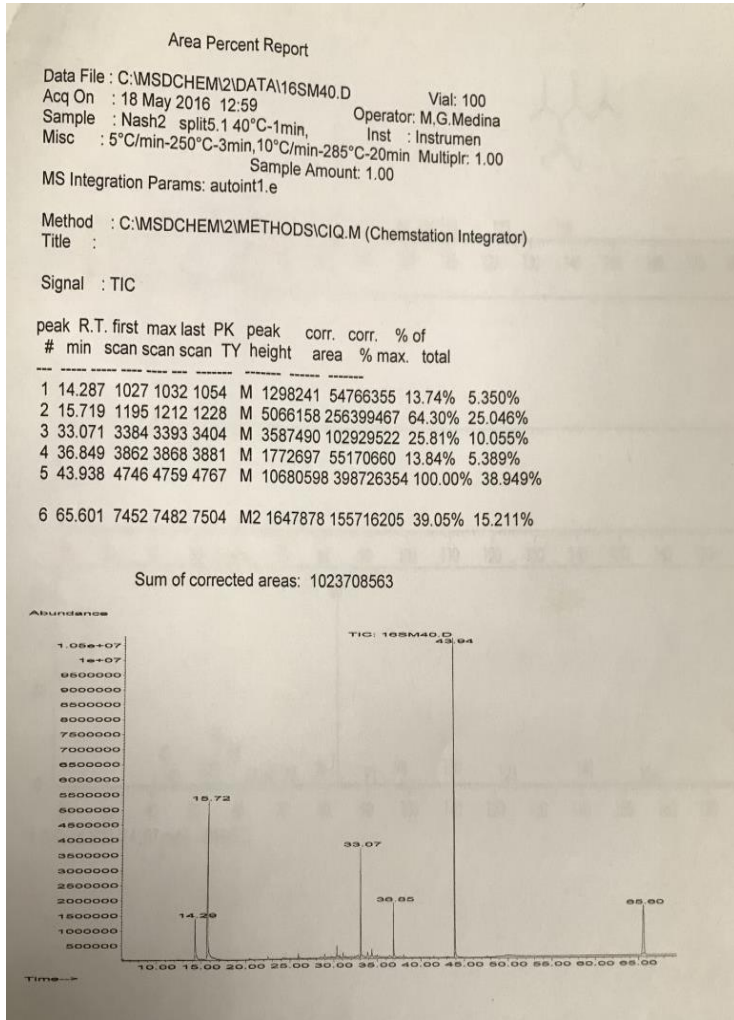
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SM3,fracción 2.



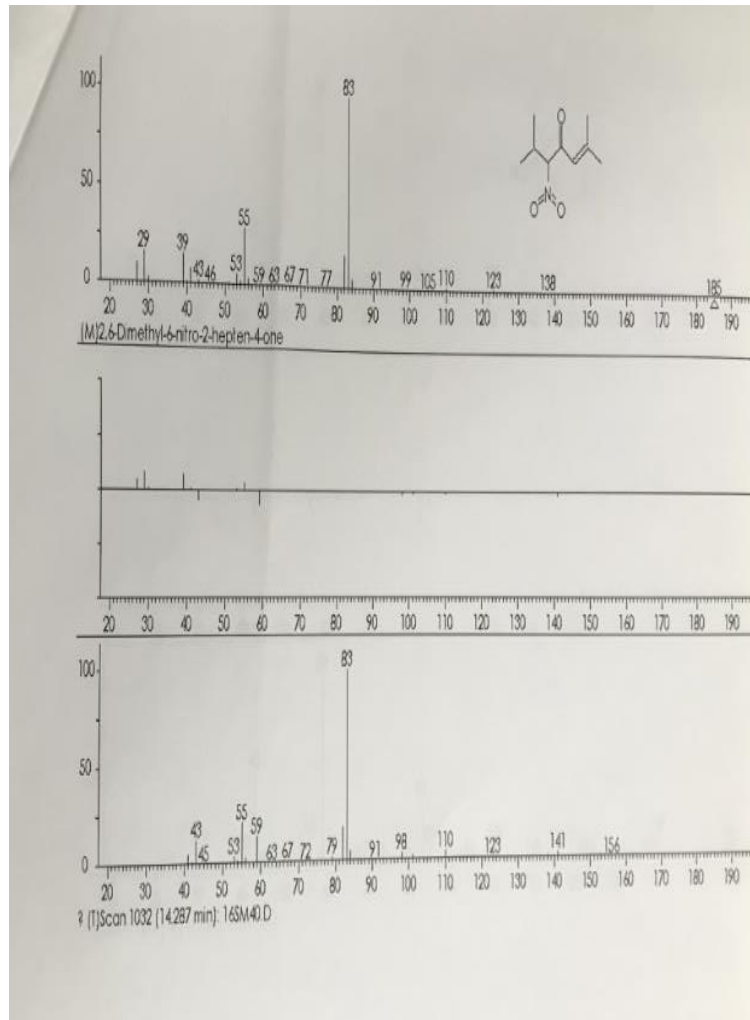
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SM3,fracción 3.



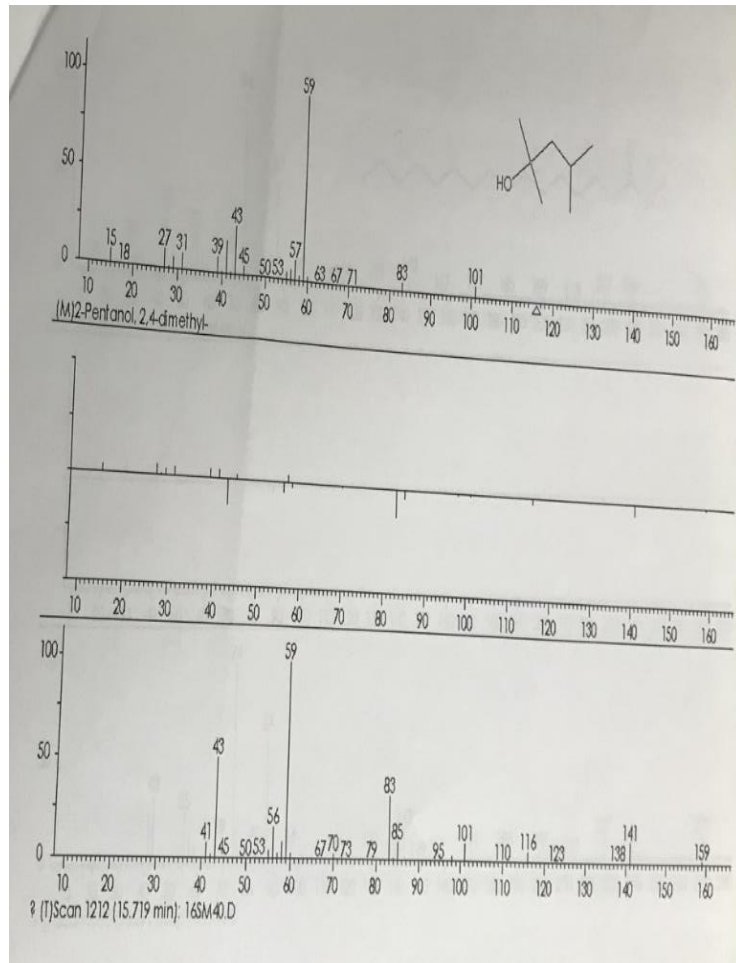
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SMRG-5, fracción 1.



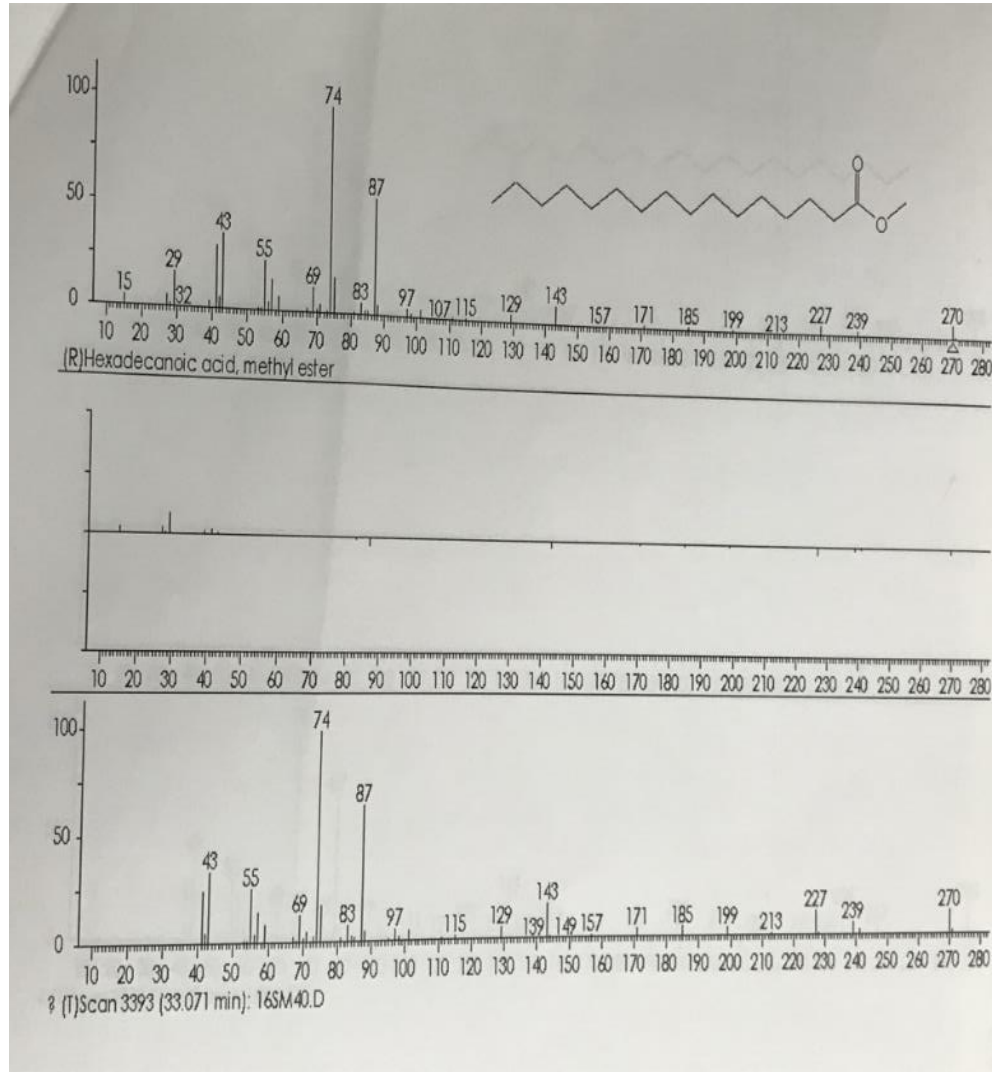
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SMRG-5, fracción 2.



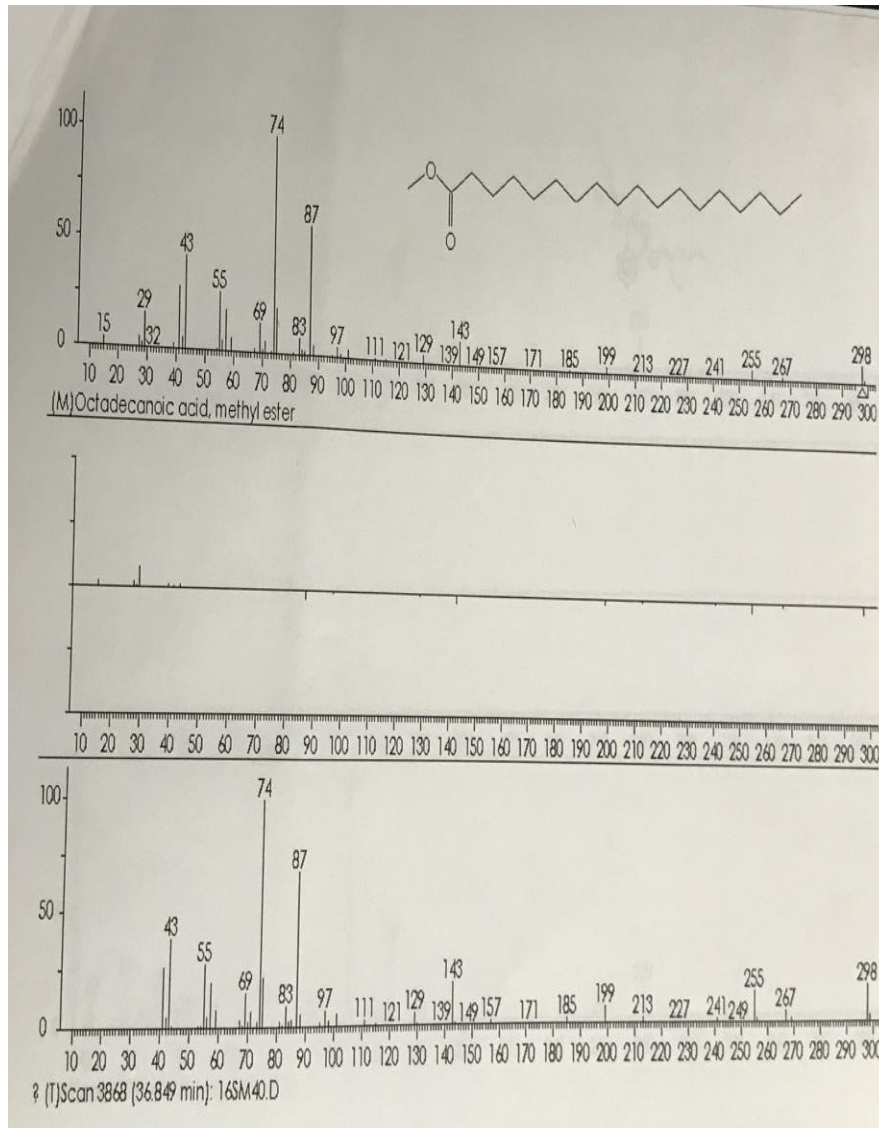
Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SMRG-5, fracción 3.




Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SMRG-5, fracción 4.



Perfil cromatografico de CG-MS de los Bs purificados de la cepa SMRG-5, fracción 5.



Improved production, purification, and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain

Nashbly Sarela Rosas-Galván¹
Fernando Martínez-Morales¹
Silvia Marquina-Bahena²
Raunel Tinoco-Valencia³
Leobardo Serrano-Carreón³
Brandt Bertrand¹
Renato León-Rodríguez⁴
Josefina Guzmán-Aparicio³
Laura Álvarez-Berber²
María R. Trejo-Hernández ^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

²Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

Abstract

In this study, the biosurfactants (Bs) production of two *Serratia marcescens* strains (SM3 and its isogenic SMRG-5 strain) was improved and the tenso-active agents were purified and characterized. A 2³ factorial design was used to evaluate the effect of nitrogen and carbon sources on the surface tension (ST) reduction and emulsion index (EI₂₄) of the produced Bs. Optimum Bs production by SM3 was achieved at high concentrations of carbon and nitrogen, reducing ST to 26.5 ± 0.28 dynes/cm, with an EI₂₄ of 79.9 ± 0.2%. Meanwhile, the best results for SMRG-5 were obtained at low concentrations, reducing the ST to 25.2 ± 0.2 dynes/cm, with

an EI₂₄ of 89.7 ± 0.28%. The optimal conditions for Bs production were scaled up in a 2-L reactor, yielding 4.8 and 5.2 g/L for SM3 and SMRG-5, respectively. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) analysis revealed the presence of two different lipopeptides (hydrofobic fractions: octadecanoic and hexadecanoic acid for SM3 and SMRG5, respectively). Both strains were capable of benzo [a] pyrene removal (59% after 72 H of culture). © 2018 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 00, Number 0, Pages 1–11, 2018

Keywords: benzo [a] pyrene removal, biosurfactants, emulsion index, surface tension reduction

Abbreviations: Bs, Biosurfactant; ST, Surface Tension; EI₂₄, Emulsion Index; RSM, Response Surface Methodology; ANOVA, Analysis of Variance; μ , Growth rate; CMC, Critical Micellar Concentration; TLC, Thin Layer Chromatography; GC-MS, Gas Chromatography-Mass spectrometry; BlalP, Benzo α Pyrene.

*Address for correspondence: María del Refugio Trejo-Hernández, PhD, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos, CP 62209, Mexico. Tel.: +52-777-3297057; Fax: 52-777-3297030; e-mail: mtrejo@uaem.mx

Supporting Information is available in the online issue at wileyonlinelibrary.com.

Received 4 October 2017; accepted 13 February 2018

1. Introduction

Biosurfactants (Bs) present diverse advantages with respect to surfactants of synthetic origin because they are highly biocompatible, biodegradable, present lower toxicity, and are ecofriendly. Bs are amphiphilic molecules; they have hydrophilic moieties and a hydrophobic portion, which allows them to interact at the interfaces between aqueous and nonaqueous systems, including air. Their effect in these systems includes many processes, such as surface tension

DOI: 10.1002/bab.1652

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com)



(ST) reduction and emulsification, and they also favor the formation of micelles and present hemolytic activity [1]. For these reasons, they are considered a better alternative for use in biotechnological processes [2]. The biochemical properties of Bs allow them to be utilized as surface wetting agents, antimicrobial agents, dispersing agents of hydrophobic compounds through emulsion formation, and accelerators of bacterial swarming mobility on semisolid surfaces [3–5].

The production and properties of Bs are influenced by the concentration of the carbon and nitrogen source as well as the physicochemical culture conditions such as pH and temperature [6–10]. Reports on Bs properties show that even small differences in their composition may have a great influence on the factors that determine their application [11, 12].

In the last decade, attention to Bs has considerably increased as these compounds are potential candidates for many commercial applications in different industrial processes, such as in the petroleum, pharmaceutical, biomedical, and food industries [13, 14]. However, the application of Bs on an industrial scale has been limited due to the high cost of production [15]. The most important factors that determine the production cost are the selected strains, production yields, and production optimization.

Diverse microorganisms are capable of producing Bs including *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus ruber*, *Acinetobacter radioresistens*, *Clostridium* sp., *Candida bombicola*, and *Serratia marcescens* [16].

Serratia marcescens produces Bs such as serrawetins that present wetting activity on various hydrophilic and hydrophobic surfaces [17]. Microbial Bs production is related to their capacity to degrade hydrocarbons, such as aliphatic and aromatic compounds [18]. However, there are reports of bacterial strains that produce Bs but are not capable of hydrocarbon degradation, as in the case of a *Thalassospira* sp. strain [19].

In this study, the production of Bs by two *S. marcescens* strains (the pigmented wild-type SM3 and its pigmentless mutant SMRG-5) was evaluated. The effect of the carbon and nitrogen source on Bs production by both strains was also analyzed. Additionally, the produced Bs were purified and biochemically characterized.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

The native *S. marcescens* SM3 strain was isolated from soil contaminated with hydrocarbons in the state of Veracruz, Mexico. The soil physicochemical parameters were the following: temperature 21–28 °C and salinity 0–5‰. SM3 was subjected to chemical mutagenesis using ethyl methyl sulfonate according to the protocol reported by Chaturvedula et al. [20]. From a total of 1,750 mutants, only five were nonpigmented (white mutants). In this work, the SMRG-5 pigmentless mutant was the strain of interest.

The SM3 and SMRG-5 strains were separately grown in solid LB medium at 30 °C. A preculture of each strain was

TABLE 1 Microbial characteristic of the strains SM3 and SMRG-5

Test	Results	
	SM3 strain	SMRG-5 strain
Gram staining	–	–
Motility	+	+
Citrate utilization	+	+
Oxidase	–	–
Triple iron	–	–
Hydrogen sulfide	–	–
Chitinase	+	+
Lipase	+	+
Catalase	+	+
Glucose	–	–
Maltose	–	–
Rhamnose	–	–
Lactose	–	–
Sucrose	+	+

prepared by inoculating one colony each strain in 125-mL flasks containing 50 mL of LB medium at pH 7, and then incubated at 30 °C and 150 rpm. The biomass was recovered by centrifugation at 560 *g* for 15 Min at 4 °C, then resuspended, adjusted to 10% (vol/vol) in the optimum medium for Bs production (the corresponding optimal media were defined in the experimental design, see Section 2.3), with a final volume of 200 mL, and then incubated at 30 °C and 150 rpm for 120 H.

2.2. Identification of *S. marcescens* SM3 and SMRG-5 strains

Both *S. marcescens* strains were identified and characterized according to Bergey's manual [21]. The *S. marcescens* strains were also identified by 16S and *gyrB* gene sequencing (Macrogen Inc.). For the 16S gene sequencing, the strains were grown under aerobic culture conditions in liquid LB medium at 30 °C and 150 rpm, and genomic DNA extraction was carried out using the Zymoclean Quick g-DNA TM Mini-prep kit.

2.3. Bs production

One carbon source (factor A: 12–14 g/L of glycerol) and two nitrogen sources (factor B: (NH₄)₂SO₄ 0.75–1.5 g and factor C: peptone from casein enzyme digest 2–4 g/L) were evaluated (Tables 1 and 2) and referred to as the peptone/glycerol–Bs medium. Cultures of both strains were carried out in triplicate using 500-mL flasks with 200 mL of liquid medium

TABLE 2

Factorial 2³ experimental design used to evaluate the glycerol as carbon source and (NH₄)₂SO₄ and peptone casein enzymatic digest as nitrogen sources on Bs production of the strains SM3 and SMRG-5

Run	Variables in coded levels			Responses of the strain SM3				Responses of the strain SMRG-5			
	Glycerol	(NH ₄) ₂ SO ₄	Casein peptone	Surface tension ^a (dynes/cm)	Surface tension ^b (dynes/cm)	Emulsion index ^a (%)	Emulsion index ^b (%)	Surface tension ^a (dynes/cm)	Surface tension ^b (dynes/cm)	Emulsion index ^a (%)	Emulsion index ^b (%)
1	-1	-1	-1	28.4 ± 0.20	28.901	75.1 ± 0.50	75.16	25.2 ± 0.23	25.23	89.7 ± 0.24	78.62
2	1	-1	-1	27.4 ± 0.30	27.401	76.9 ± 0.20	76.84	26.5 ± 0.21	24.15	84.7 ± 0.25	78.62
3	-1	1	-1	27.4 ± 0.30	27.379	76.0 ± 0.30	75.94	27.6 ± 0.21	27.49	78.6 ± 0.22	78.62
4	1	1	-1	27.5 ± 0.36	27.499	76.2 ± 0.36	76.26	26.4 ± 0.24	28.73	79.9 ± 0.23	78.62
5	-1	-1	1	27.6 ± 0.20	27.605	74.1 ± 0.50	74.04	35.4 ± 0.32	33.05	60.5 ± 0.24	78.62
6	1	-1	1	26.6 ± 0.26	26.605	78.9 ± 0.26	78.96	28.3 ± 0.33	28.29	77.8 ± 0.25	78.62
7	-1	1	1	27.5 ± 0.15	27.495	76.2 ± 0.35	76.26	27.7 ± 0.31	30.03	78.9 ± 0.26	78.62
8	1	1	1	26.5 ± 0.28	26.495	79.9 ± 0.28	79.82	27.6 ± 0.23	27.59	78.9 ± 0.25	78.62
9	0	0	0	28.3 ± 0.32	27.36	71.9 ± 0.32	76.66	27.6 ± 0.24	28.07	78.4 ± 0.31	78.47
10	0	0	0	27.3 ± 0.20	27.36	71.8 ± 0.46	76.66	27.2 ± 0.21	28.07	78.5 ± 0.32	78.47
11	0	0	0	27.5 ± 0.11	27.36	71.5 ± 0.41	76.66	27.3 ± 0.24	28.07	78.5 ± 0.31	78.47

Coded values for glycerol -1 = 12 g/L, 0 = 13 g/L, +1 = 14 g/L.

Coded values for (NH₄)₂SO₄ -1 = 0.75 g/L, 0 = 1 g/L, +1 = 1.5 g/L.

Coded values for casein peptone -1 = 2 g/L, 0 = 3 g/L, +1 = 4 g/L.

^aExperimental data.

^bEstimated data.

and incubated for 96 H. The effect of medium composition was analyzed with respect to growth and Bs production, employing a 2³ factorial design for both *S. marcescens* strains. A 2^k factorial design provides all the possible combinations of a possible set of variables (factors) with a fixed number of levels in each complete test involving the interactions of each factor to be analyzed.

The main effects of the evaluated factors on the response were:

$$\beta_i = (Y_i^+) - (Y_i^-),$$

where β_i is the effect of the i th factor on the response, and y_i^+ and y_i^- are the mean responses for the upper (+) and lower (-) levels of the i th factor. The interactions of two factors were also calculated by this equation. The general equation is a first-degree polynomial:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon,$$

where Y is the estimated response, β_0 is the general mean, $\sum \beta_i X_i$ is the sum of the main effects of the factors, $\sum \beta_{ij} X_{ij}$ is the sum of the two-factor interaction effects, and ε is the lack of fit of the model (error).

2.3.1. Analysis of carbon source (glycerol) consumption

The bacterial culture was centrifuged (560 g at 4 °C for 15 Min) and the cell-free culture was considered the supernatant. The supernatant was filtered (membranes with 0.45- μ m diameter pores of polyvinyl difluoride; Millipore, Bedford, MA, USA) and 5 μ L was analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Agilent Technologies 1100; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), with a refraction index factor. A Supelcogel C610-H cationic exchange column was used at 40 °C, with a 6 mM sulfuric acid solution as the mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/Min.

2.4. Extraction and purification of Bs

The supernatant was acidified with 6 N HCl and adjusted to pH 2. The extraction was performed with two volumes of ethyl acetate (2:1 v/v) by vigorous shaking during 30 Min and then left to stand overnight at 4 °C; this process allowed the separation of the two phases. The organic phase was removed, and the process was repeated. The Bs extracts were concentrated in a rotavapor (BÜCHI R-124) at 60 °C. The viscous amber product was considered the crude Bs. The crude Bs was purified by column chromatography using silica gel 60 (230–400 mesh; Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) and developed in

a solvent gradient system: chloroform–acetonitrile (90:10), acetonitrile–acetone (90:10), acetone–methanol (90:10), and methanol–acetic acid (90:10); 12 fractions were collected from the crude Bs extracts from both strains (SM3 and SMRG-5). The fractions were pooled, and the solvent was evaporated.

2.5. Bs chromatography profiling

2.5.1. Thin layer chromatography of *S. marcescens* SM3 and SMRG-5 crude Bs extracts

Preliminary characterization of the Bs was performed by the thin layer chromatography (TLC) method. Silica gel (F254) plates were prepared, and a sample of crude Bs was placed on the silica plate. The Bs was separated on the plate using chloroform–methanol–water (99:8:2). The compounds on the plate were detected after spraying with ninhydrin to detect amino groups as red spots. The appearance of yellow spots with vanillin and iodine vapor indicated the presence of the protein and lipid portions of the Bs, respectively.

2.5.2. HPLC analysis of *S. marcescens* SM3 and SMRG-5 crude Bs extracts

The samples were subjected to HPLC analysis to determine the profile of each crude Bs. A gradient system was used with an XDBC-18 Agilent column (150 × 4.6 mm, 3.5 μm). The employed solvent system was acetonitrile–water (HPLC grade). The run time was 45 Min, and the compounds were detected at a wavelength of 215 nm with a UV detector.

2.5.3. GC–MS analysis of purified Bs

GC–MS analysis of the Bs was realized by using a modified version of Chandran and Das [22]. The purified Bs was mixed with 5% HCl–methanol reagent. After the reaction was stopped with 1 mL of water, the samples were extracted with methanol and injected into the GC–MS model 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a capillary inlet and mass selective detector set to scan from m/z 45 to m/z 800 at a scan rate of 1.2 scans per second, and the oven temperature was programmed from 5 °C/Min–250 °C during 3 Min to 10 °C/Min–285 °C during 20 Min. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/Min and a split ratio of 5:1 at 40 °C/Min.

2.6. Bs activity assays and characterization

2.6.1. ST reduction and emulsion index

The reduction of the ST of the supernatants was measured using the ring method with a Du-Nouy tensiometer (Fisher Scientific Surface Tensiometer 20). The emulsion index (EI₂₄) was defined as the percentage of emulsified kerosene generated after 2 Min in a vortex shaker and left to stabilize for 24 H; the emulsion was measured according to the Cooper and Goldenberg method [23].

2.6.2. Hemolytic activity analysis

The hemolytic potential of the Bs was evaluated with human erythrocytes. The hemolytic activity was determined in 5 μL by using an aliquot of the crude Bs extract produced by each strain added to 0.195 mL of erythrocytes. For the extraction

of erythrocytes, 5 mL of fresh human blood was centrifuged at 560 *g* for 10 Min at 4 °C. The cellular precipitate was washed three times with an isotonic solution (injectable CS-C 17.7% PISA). The hemolytic activity was determined by absorbance readings at 620 nm. Purified Bs was analyzed in blood agar plates containing 5% (v/v) total blood. Hemolytic activity was identified with the presence of clear zones (halos) around the extracted Bs [24].

2.6.3. Determination of critical micellar concentration

The critical micellar concentration (CMC) was determined by plotting the ST function of different Bs concentrations according to the protocol reported by Guerra-Santos et al. [8].

2.7. Benzo [α] pyrene removal assays

The best media for Bs production (previously determined, section 2.3) were used to evaluate the Benzo [α] pyrene (B[α]P) removal by both strains. The liquid medium composition described in this study was performed in 500-mL shaking flasks with a final volume of 200 mL supplemented with 36 ppm of B[α]P. Medium with B[α]P and no inoculum was used as the control. The cultures were incubated for 15 days at 30 °C with shaking at 150 rpm. The growth kinetics were determined by measuring the optical density at 620 nm at defined time intervals. The hydrocarbon residues were extracted three times with dichloromethane from the culture supernatant. All experiments were performed in triplicate [18].

2.8. Statistical analysis

All experiments were performed independently, and the differences between the treatments were evaluated by analysis of variance (ANOVA, $P = 0.05$) using Design-Expert version 7.0.1 (Stat Inc., Minneapolis, MN, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Polyphasic identification of *S. marcescens* strains

In this study, the SM3 (pigmented) and SMRG-5 (pigmentless) strains were biochemically and microbiologically characterized (Bergey's manual, Table 1).

The strains were also identified via molecular analysis with the amplification and sequencing of the rRNA 16S and *gyrB* genes. The sequences are in the process of being submitted to GenBank (NCBI). The SM3 (red) and isogenic SMRG-5 (white mutant) were identified as *S. marcescens* (Supporting Information Fig. S1).

3.2. Bs production by SM3 and SMRG-5

The effect of the type and concentration of the carbon and nitrogen source was analyzed for both strains with the aim of increasing the Bs activity. Additionally, the influence of these sources on the biochemical characteristics of the secreted Bs was evaluated.

The wild-type SM3 showed a swarming behavior in high carbon and nitrogen concentrations, while its mutant strain SMRG-5 presented swarming in low concentrations of the same

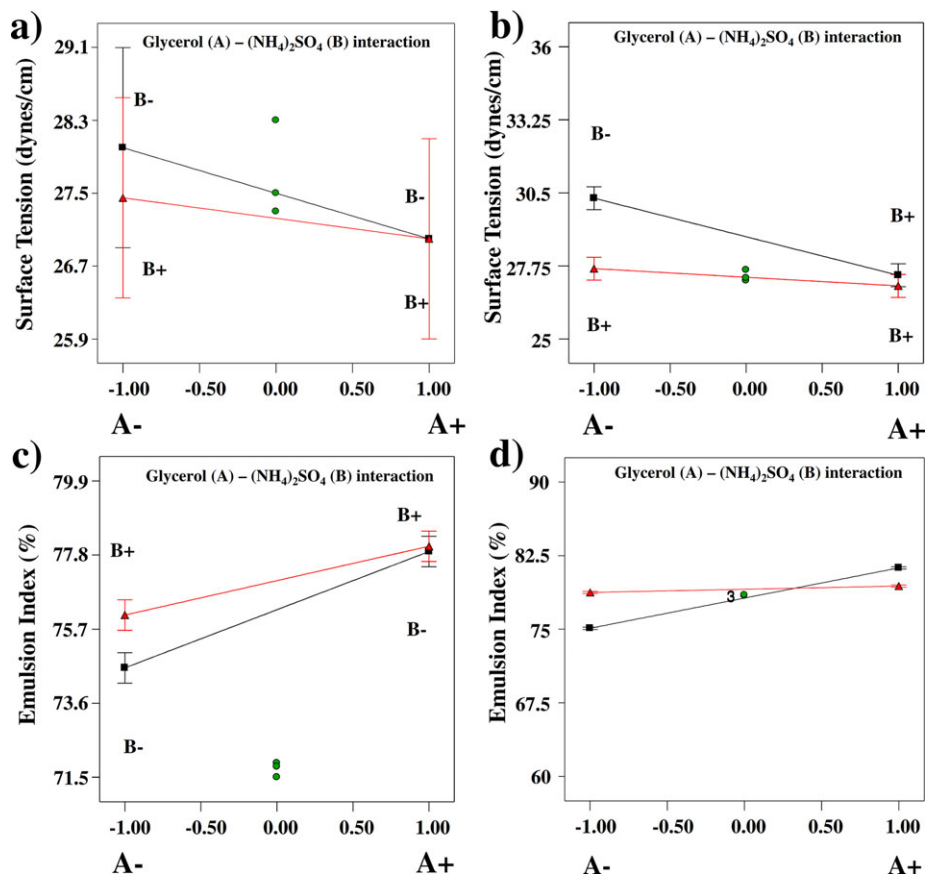


FIG. 1

Relevant factor interactions affecting surface tension and emulsion index in both *S. marcescens* strains: (a) Effect of the interaction of glycerol and (NH₄)₂SO₄ with respect to surface tension in SM3 and (b) effect of the interaction of glycerol and (NH₄)₂SO₄ with respect to surface tension in SMRG-5. (c) Effect of the interaction of glycerol and (NH₄)₂SO₄ with respect to the emulsion index in SM3 and (d) effect of the interaction of glycerol and (NH₄)₂SO₄ with respect to the emulsion index in SMRG-5.

nutrients (Supporting Information Figs. S2a and S2b). These findings suggested the presence of a tenso-active agent when both strains were grown in media that favored Bs production in the presence of high and low nutrient concentrations. Swarming motility is intrinsically surface-linked dependent and a cell density dependent phenomenon, and various extracellular compounds such as Bs facilitate surface motility [25]. In this work, the swarming motility and Bs production increased after 72 H of culture. Swarming locomotion has been well studied in nutrient-rich media and semisolid surfaces. However, up to now, this phenomenon has not been studied in optimum Bs production culture conditions, as carried out in the present study.

3.2.1. Effect of carbon and nitrogen concentrations on Bs production with respect to ST

The effect of glycerol as the carbon source and (NH₄)₂SO₄ and peptone casein as the nitrogen source on Bs production was

studied using a 2³ factorial design. Both strains were evaluated individually with respect to the ST reduction and EI₂₄ (Table 2).

With the aim of understanding the significance of the effect of each factor, it was necessary to deduce the nature of the interactions. Bs production by both *S. marcescens* was influenced by the carbon and nitrogen concentration. However, ANOVA showed that the effect of the studied factors was significant (strain SM3: *F* test, *P* < 0.001 and SMRG-5: *P* < 0.0335), while the lack of fit of the model was not (strain SM3: *F* test, *P* = 0.89 and SMRG-5: *F* test, *P* = 0.0160). An analysis of the most significant effects is shown in the following equations with respect the ST reduction for both strains (SM3—Eq. (1) and SMRG-5—Eq. (2); each factor was previously described in Section 2.3), where each equation was reduced to:

$$\text{ST (dynes/cm)} = 27.36 - 0.36A - 0.14B - 0.31C - 0.14AB - 0.14AC + 0.088BC - 0.14ABC \quad (1)$$

$$\text{ST (dynes/cm)} = 28.07 - 0.88A - 0.78B + 1.67C + 0.58AB - 0.92AC - 1.32BC + 1.18ABC \quad (2)$$

An analysis of the interaction of two factors, the significance value and the standard deviation at a low level (–) and high level (+) of each response (ST reduction and EI₂₄), is shown in Figs. 1a–1d.

The interaction between glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the ST of SM3 is shown in Fig. 1a. When glycerol was used at a high concentration (14 g/L) and the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was low (1.5 g/L), the ST reduction was considerably reduced. However, a drastic reduction in ST was observed when both factors were at high levels. Given that the values of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were negative (-0.36 and -0.14 , respectively), it can be concluded that high concentrations of the carbon and nitrogen sources favored Bs production of the strain SM3. Similar results were obtained by Wu et al. [26] who reported that Bs production was favored with inorganic nitrogen sources at high concentrations in *P. aeruginosa*. However, the nitrogen used in this work was less than the concentration used by those authors. With respect to the glycerol–peptone interaction, it can be deduced that there was no significant effect on the Bs production (see ANOVA in Supporting Information Table S1a). This observation could be explained by the fact that in some cases the organic nitrogen sources can stimulate cell growth but not necessarily Bs production [26]. The interaction of both factors involved with respect to the SMRG-5 strain is shown in Fig. 1b. ST reduction was not affected by the glycerol concentration when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was high (14 g/L). However, when the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration was low (–), ST notably decreased when 12 g/L was used. Given that the values of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were negative (-0.88 and -0.78 , respectively), it can be concluded that low concentrations of the carbon and nitrogen sources favored Bs production of the chemical mutant SMRG-5.

3.2.2. Effect of carbon and nitrogen concentrations on Bs production with respect to EI_{24}

The analysis of the interactions in relation to the EI_{24} is shown in Figs. 1c and 1d. The increase in carbon and nitrogen concentrations increased the emulsion percentage for the SM3 strain. The ANOVA shows that the effect of each factor studied was significant (strain SM3: *F* test, $P < 0.05$, strain SMRG-5: *F* test, $P < 0.0001$), while the lack of fit of the model was not significant. An analysis of the significant effects in terms of the coded factors is presented in Eqs. (3) and (4) (SM3 and SMRG-5, respectively).

$$EI_{24}(\%) = 76.66 + 1.31A + 0.41B + 0.61C - 0.34AB + 0.81AC + 0.36BC \quad (3)$$

$$EI_{24}(\%) = 78.63 + 1.70A + 9.95B - 4.60C - 1.37AB + 2.63AC + 4.43 \quad (4)$$

The analysis of the interactions in relation to the EI_{24} is presented in Figs. 1c and 1d. The increase in the carbon and nitrogen concentrations of the medium enhanced the emulsion capacity of SM3 (Fig. 1c). However, for SMRG-5, the effect of the carbon and nitrogen concentrations was the opposite; low concentrations of carbon and nitrogen favored emulsion (Fig. 1d).

Figures 2a–2d illustrate the response surface with respect to the ST reduction and EI_{24} in function of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (the main significant factors) for both strains. Figures 2a and 2b show the response surface with respect to the ST reduction in function of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in medium that contained peptone (4 g/L) for both strains. Figures 2c and 2d show the response surface with respect to the EI_{24} also in function of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

According to the model, for the wild-type SM3, culture medium 8 (Table 2), containing high glycerol concentration (14 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.5 g/L), and peptone casein enzymatic digest (4 g/L), was the best medium for maximum Bs production. Under these conditions, a ST reduction of 68 to 26.5 ± 0.28 dynes/cm was registered, which was similar to the estimated value (Fig. 2a). Likewise, in the model corresponding to the isogenic strain SMRG-5, culture medium 1 (Table 2), containing glycerol 12 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 g/L, and peptone casein enzymatic digest 0.5 g/L, was the best medium (without experimental domain) to increase Bs production, with the reduction of the ST from 25.2 ± 0.23 dynes/cm; there was no difference compared to the estimated value of 25.23 dynes/cm (Fig. 2b) (see ANOVA in Supporting Information Table S1b).

In relation to the model, the emulsion percentage with respect to the highest response surface is shown in Fig. 2c, with 79.9% emulsion for SM3. Figure 2d shows the response surface of EI_{24} of SMRG-5 in function of glycerol and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (significant factors). The best emulsion was 89.7%. The influence of a low carbon and nitrogen concentrations on these strains was associated with an increase in Bs production, as seen in the analysis of the factors evaluated in the ANOVA (Supporting Information Table S1b).

The difference between the carbon and nitrogen consumption in both strains was influenced by the chemical mutation with respect to the Bs activity and the absence of the secondary metabolite named prodigiosin. Similar observations have been made nitrogen limitation has been shown to play an important role in Bs production [27, 28]. In another study, Mouati et al. [29] observed that under optimum conditions of substrate concentration, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ levels, and other factors, the surfactant production increased. However, in this study, optimization was not necessary, since the results obtained were comparable with literature.

Diverse factors that promote Bs production have been studied, such as different concentrations of carbon and nitrogen sources, as well as the interaction of salts and minerals, in bacterial strains (including *S. marcescens*), which have been isolated from hydrocarbon-contaminated soils. Different experimental designs have been explored and implemented, permitting the evaluation of the factors that exert an effect on Bs production at different levels, thus optimizing Bs production [29].

In spite of the results obtained in this study using the 2^3 experimental design, the factors did not adjust to the model. However, the factors had an effect under the optimal conditions for increased Bs production. Optimized culture conditions

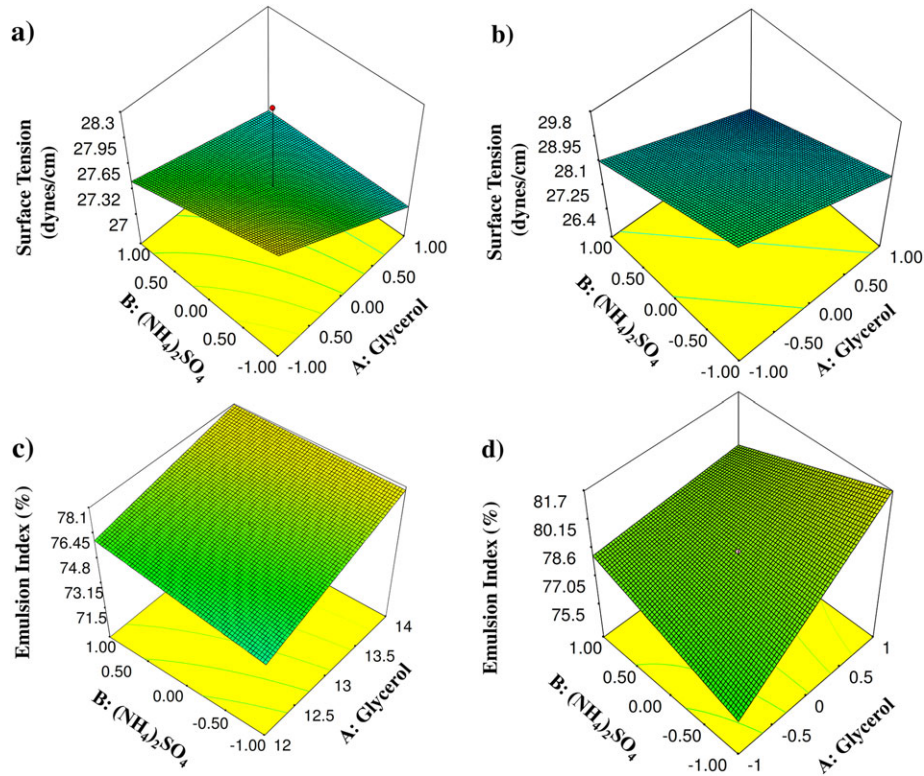


FIG. 2

Response surface methodology (RSM) showing the relationship between glycerol and $(NH_4)_2SO_4$ with respect to the surface tension and the emulsion index for both *S. marcescens* strains: (a) RSM showing the surface tension reduction for SM3, (b) RSM showing the surface tension reduction for SMRG-5, (c) RSM showing the emulsion index for SM3, and (d) RSM showing the emulsion index for SMRG-5.

such as those reported by Bidlan et al. [30] increased the Bs production of strain *S. marcescens* DT-1P when glycerol was used as the carbon source, as this substrate is a precursor for fatty acids and can thus be easily synthesized. Glycerol has also been used as a carbon source for producing Bs with *Pseudomonas* sp. (UCP0992), but at high concentrations (30 g/L) [31]. The Bs produced by this strain was favorable and competitive and showed potential for environmental application. Nonetheless, SM3 and SMRG-5 were able to produce Bs at lower concentrations of carbon and nitrogen, compared to other reports.

3.2.3. Microbial growth kinetics, carbon source (glycerol) consumption, and Bs production by SM3 and SMRG-5

Both strains were evaluated in the medium that favored their Bs production. In the presence of high carbon and nitrogen concentrations, the wild-type strain presented exponential growth during the first 72 H of culture (Fig. 3a), with a growth rate of $\mu = 0.0205 \text{ H}^{-1}$. In the same way, during the first 36 H of culture,

substrate consumption by SM3 was associated with the secretion of surface active substances. The relationship between the degradative capacity of the substrate and the gradual decrease in the ST was crucial during this incubation period, reaching 27.5 dynes/cm. Although glycerol is considered to be a substrate that generally limits growth, this was not the case for this strain (Fig. 3b). With respect to the SMRG-5 strain, a slightly slower growth rate was recorded ($\mu = 0.0168 \text{ H}^{-1}$) compared to the wild-type (SM3). For SMRG-5, low concentrations of the substrate resulted in an increase in Bs production, suggesting that Bs production in this strain was not associated with carbon and nitrogen concentration (i.e., at lower concentrations of the carbon and nitrogen sources, Bs production was greater) (Fig. 3a). The metabolic behavior of both strains was related to substrate consumption and bacterial growth during the first 24 H of culture, favoring the rapid reduction of the ST. Between 36 and 96 H, the ST continued to decrease slowly, reaching the lowest level of 26.7 dynes/cm after 96 H (Fig. 3c). The difference in bacterial growth of both strains suggests a correlation with the generated mutation of the SMRG-5 strain. Additionally, various *S. marcescens* Bs-producing strains have been reported to produce Bs during the first 3 days. Such is the case of *S. marcescens* UCP1549 that produced Bs in the first 72 H of culture and was reported to reduce the ST to 33.10 mN/m; however, 60 g/L of the carbon source was needed for Bs production [32]. The strains in this study exhibited improved production times under substrate-limiting conditions, with typical activity of a pure Bs.

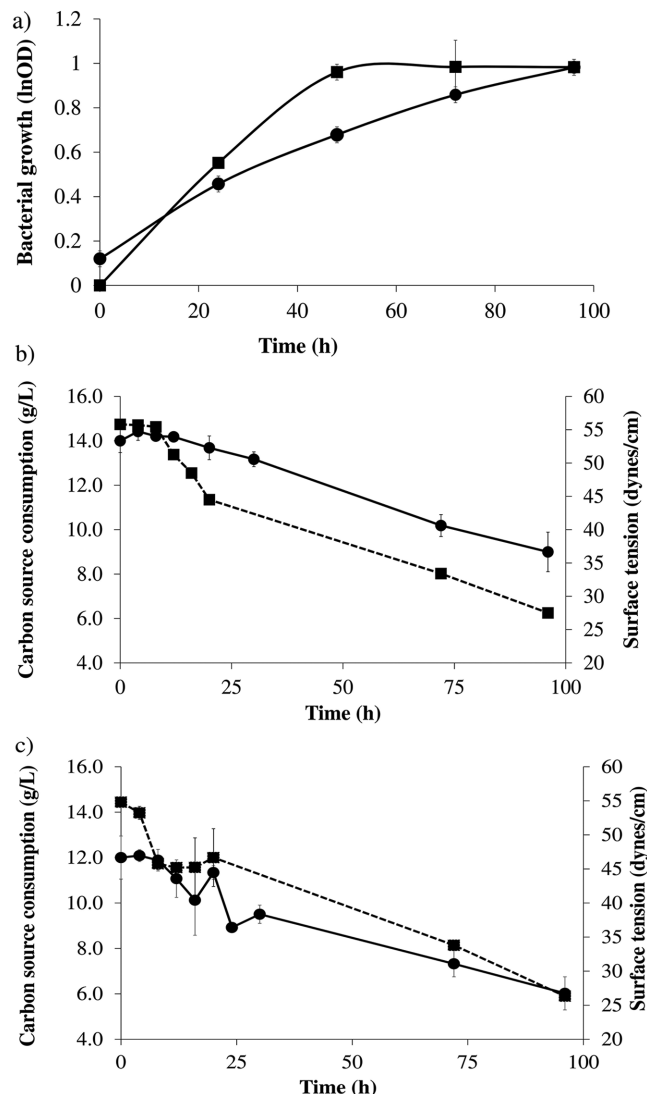


FIG. 3 Growth and substrate consumption kinetics. (a) Growth kinetics of SM3 (●) and SMRG-5 (■), (b) substrate consumption kinetics (●) and surface tension of SM3 (■), and c) substrate consumption kinetics (●) and surface tension of SMRG-5 (■).

3.3. Characterization of the Bs produced by *S. marcescens* SM3 and SMRG-5

The purification processes of Bs are affected by diverse factors, such as the secretion of certain metabolites, pigments, and proteins. Hence, in this study, white mutant strains that did not revert (in terms of pigment production) with unaffected Bs production were generated.

The surface properties of crude Bs were measured to estimate the extent of Bs activity with respect to ST reduction, EI_{24} , hemolytic activity, and CMC. A total of 4.8 ± 2 g and 5.9 ± 2 g/L (dry weight) of purified Bs was obtained from SM3 and SMRG-5, respectively. The crude Bs of SM3 and SMRG-5 presented ST values of 25.5 dynes/cm and 24.6 dynes/cm and

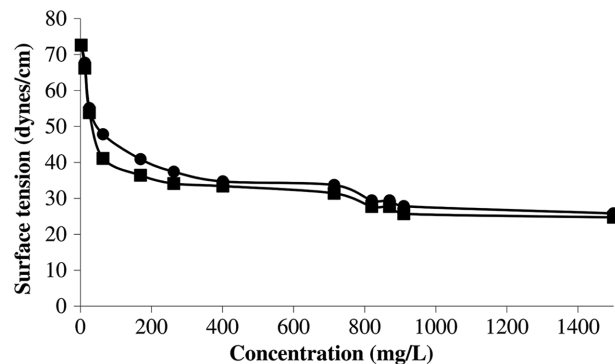


FIG. 4 Surface tension reduction versus concentration of the purified Bs from SM3 (●) and SMRG-5 (■).

EI_{24} values of 83.4% and 93.6%, respectively. The hemolytic activity was 78% for SM3 and 27% for SMRG-5. Bs recovery from SMRG-5 was 100%, while Bs recovery from SM3 was lower (about 80%) due to the presence of the red pigment. This result provides evidence that the secondary metabolite (prodigiosin) secreted by the SM3 strain affected the Bs purification process, resulting in more effective Bs purification from the isogenic SMRG-5 strain. Additionally, Tahzibi et al. [33] reported lower yields in Bs purification with *P. aeruginosa* MM1011 (1.5 g/L pure Bs). However, the mutant strain (PTCC1637) produced 12.5 g/L of pure Bs, 10-fold higher than the native strain. Other strains isolated from petroleum-polluted soils have been reported to produce Bs with sucrose as the carbon source. However, under these conditions ST was only reduced to 40 dynes/cm. *Serratia marcescens* strains have also been reported to completely emulsify olive oil [34]. Therefore, the production and purification yields from both of the *S. marcescens* strains reported in this work are competitive compared to previous reports without the need to purify the Bs, therefore they can be used as crude extracts.

3.3.1. Critical micellar concentration

CMC surfactants can change surface properties, with biochemical functions such as solubilization, emulsification, and humidifying activity, thus the concentration with which they are applied is important [10]. The CMC is an important physicochemical parameter used to evaluate Bs activity. A low CMC means that this is the minimal concentration of a surfactant required to form micelles. The results of the CMC of produced Bs by both strains are shown in Fig. 4.

A decrease in ST of 25.8 and 24.7 dynes/cm was observed for the SM3 and SMRG-5 Bs, respectively. At this point, the Bs CMC was 0.898 and 0.820 g/L, respectively. This CMC was lower compared to some commercially available chemical surfactants; for example, sodium dodecyl sulfate has a CMC value of 2.1 g/L [35]. The CMC for other surfactants from other bacterial genera have been reported for strains such as *P. aeruginosa* MM1011, which presented a CMC of 1 g/L and

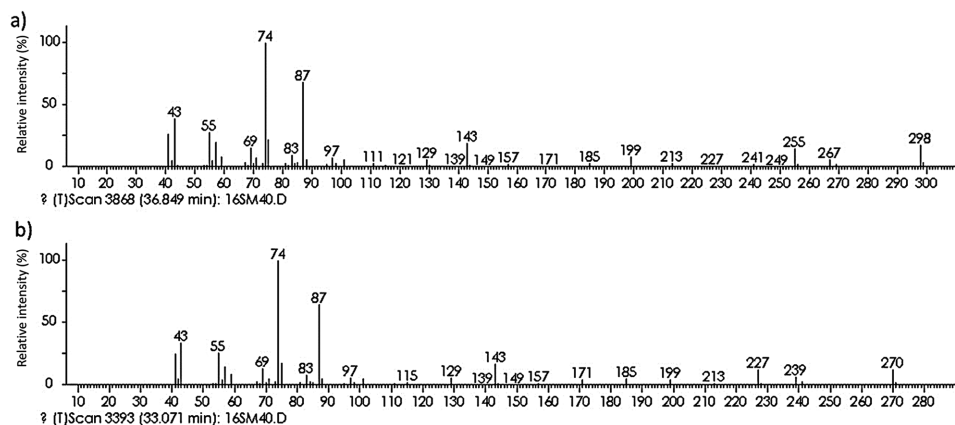


FIG. 5

Gas-mass chromatography spectra of Bs produced by (a) SM3 and (b) SMRG-5.

reduced the ST to values as low as 26.5 dynes/cm [36]. Thus, the CMC of the Bs produced by both strains suggests that they could be applied in lower quantities than synthetic surfactants.

Both Bs extracts presented 11 (SM3) and 12 (SMRG-5) distinct fractions after HPLC analysis (Supporting Information Fig. S3); all fractions presented ST reduction and hemolytic activity (Supporting Information Table S2). Similarly, the purified Bs from each strain were separated in silica gel columns, and the surface active compounds were detected in all collected fractions, as observed from TLC analysis (Supporting Information Fig. S4). Yellow spots detected with the sublimed iodine vapors of the Bs extract indicated the presence of some type of lipopeptide group. A single spot was detected with vanillin, and under the same conditions, ninhydrin also stained the Bs TLC plates, suggesting a free N-terminus. Matsuyama et al. [36] and Ibrahim et al. [37] reported negative staining results for the serrawettin W2 and W3 of the nonpigmented strains of *S. marcescens* with ninhydrin. TLC was performed using an ethyl acetate-methanol (90:10) solvent system. The purified fractions of Bs obtained from both strains were analyzed by GC-MS fingerprint (Fig. 5).

Three of 11 fractions obtained from the SM3 Bs revealed the presence of hexadecanoic acid and methyl ester (signal located in the 255 region, peak 4, Supporting Information Fig. S5; Fig. 5a). For SMRG-5, four of 12 fractions were identified as octadecanoic acid (signal located in the 270 region, peak 3, data not shown) (Fig. 5b). The predominant fatty acid esters present the molecular formula $C_{19}H_{38}O_2$ with 298.28 g/mol in the SM3, while that in SMRG-5 is $C_{17}H_{34}O_2$, with a molecular weight of 270.450 g/mol. The hydrophilic fractions for both strains were not analyzed by this assay. The type, characteristics, and composition of diverse Bs depend on the bacterial strain, the carbon source, and the processing strategy [38]. Reports have shown that the structure of the tenso-active agent produced by *P. aeruginosa* depended on the used substrate, in this case, palm oil [39]. Interestingly, in this study, the production of two different Bs molecules by the SM3 and SMRG-5 strains using

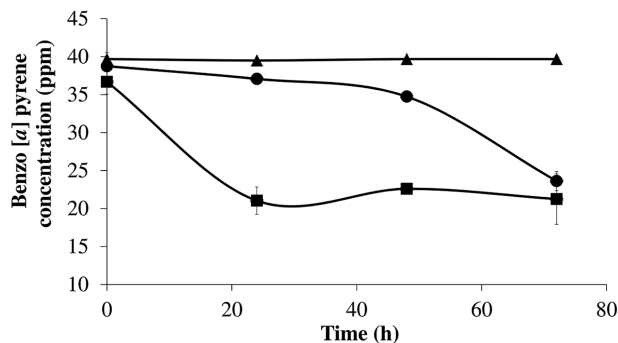
the same substrate was detected. The production of different Bs by the *S. marcescens* strains using the same substrates and their attractive biochemical properties imply great biotechnological potential for possible applications in area of bioremediation environmental such as microbial enhanced oil recovery.

The GC-MS profile of the biosurfactant of both strains revealed different types of fatty acid esters that are bound or free. The fatty acid esters detected in this study were comparable to those obtained by Matsuyama et al. and Ibrahim [36, 37]. The hexadecanoic and octadecanoic acids (SM3 and SMRG-5, respectively) observed in this study are consistent with data published by Peng et al. [40], who found a predominant hexadecanoic component in extracts obtained from *Rhodococcus* sp. TW53 isolated from deep water samples in the Pacific Ocean. On the other hand, octadecanoic acid has been detected, as the main component in the Bs extract obtained from the SMRG-5 strain was congruent with the GC-MS analysis reported by Ibrahim et al. [37] for their *S. marcescens* strain; they attributed their results to the substrate.

3.4. Benzo[α] pyrene removal by SM3 and SMRG-5

B[a]P removal was evaluated for 15 days, and the remaining hydrocarbon residues were extracted from the culture broth. The initial B[a]P concentration was adjusted to 36 ppm, and the removal percentage registered for both strains was 59% during the first 72 H. The findings are presented in Fig. 6.

Bs secretion during fermentation showed an improvement in the homogenous solubility in the culture medium. The results demonstrated that bacteria with the catabolic potential to degrade hydrophobic contaminants could interact synergistically with surfactant-producing strains to hasten the biodegradation. Kumari et al. [41] demonstrated that *Pseudomonas* sp. BP10 and *Rhodococcus* sp. NJ2 were able to degrade petroleum hydrocarbon (60.6 and 49.5%, respectively) after 30 days of incubation. Bs stability studies have indicated that the emulsion percentage and ST reduction in both the extracts of Bs remain constant after 9 months, with activity after being subjected to a range of temperatures (60–100 °C) (data not shown). Hence, the Bs studied in this work present potential for suitability in the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons under


FIG. 6

Benzo[α] pyrene removal kinetics. SM3 (●), SMRG-5 (■), and control Bap concentration (▲).

reservoirs with different salinity, pH, and high temperatures. In fact, Bs have been demonstrated to contribute significantly to the emulsification and solubilization of crude oil, therefore increasing its bioavailability for hydrocarbon-degrading strains. Moreover, the Bs-producing strains can participate in the biodegradation process, enhancing diesel degradation [31, 37]. According to the literature, hydrocarbon-tolerant bacteria such as *S. marcescens* degrade up to 70–90% of crude oil after 20 days of culture [36]. In this work, both SM3 and SMRG-5 were able to remove B[a]P (a highly toxic compound from the aromatic fraction) during the first 72 H of culture in media that favored Bs production. These results demonstrate the capacity of both strains to produce Bs and their potential application in the bioremediation of hydrocarbon-polluted sites.

4. Conclusions

Bacterial strains identified as *S. marcescens* SM3 and SMRG-5 increased Bs production in the presence of high and low concentrations of carbon and nitrogen sources, respectively. The Bs for both strains presented a low ST and high emulsifying activity. GC-MS analysis showed that although the Bs from each strain were of a lipopeptide nature, they were different (hexadecanoic and octadecanoic acids for SM3 and SMRG-5, respectively). The capacity of Bs to remove B[a]P was demonstrated after 72 H. Both strains presented great potential for application in the biodegradation and bioremediation of hydrocarbons.

5. Acknowledgements

N.S.R.-G. acknowledges a fellowship from CONACYT (MÉXICO) (CVU218502). Research funded by the National Council of Science and Technology of Mexico - Secretariat of Energy - Hydrocarbon Trust, project 201441. This is a contribution of the Gulf of Mexico Research Consortium (CIGoM). Special thanks are extended to M.B. Daniel Morales-Guzmán for his excellent technical assistance and L.I. Victor Martínez-Valdez for his assistance with image formatting. The authors declare no conflict of interest.

6. References

- [1] Marchant, R., and Banat, I.M. (2012) Trends Biotechnol. 30, 559–565.
- [2] Sulbarán, M.M., Bahsas, A., Velásquez, W., and Otoniel, J.R. (2005) Ciencia 13, 228–239.
- [3] Rodríguez, L., Banat, I.M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006) J. Antimicrob. Chemother. 57, 609–618.
- [4] Cortés-Sánchez, A.J., Hernández-Sánchez, H., and Jaramillo-Flores, M.E. (2013) Microbiol. Res. 168, 22–32.
- [5] Hošková, M.M., Ježdík, R., Schreiberová, O., Chudobab, J., Šír, M., and Čejková, A. (2015) J. Biotechnol. 193, 45–51.
- [6] Banat, L.M. (1995) Bioresour. Technol. 51, 1–12.
- [7] Cameotra, S.S., and Makkar, R.S. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 520–529.
- [8] Guerra-Santos, L.H., Kappeli, O., Fiechter, A., Kappeli, O., and Fiechter, A. (1984) Appl. Environ. Microbiol. 48, 301–305.
- [9] Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., and Desai, A. (2008) Bioresour. Technol. 99, 195–199.
- [10] Varjani, S.J., and Upasani, V.N. (2017) Bioresour. Technol. 232, 398–397.
- [11] Guo-Yin, P., Hu, Y.Y., Gu, R.R., and Lin, H. (2009) J. Colloid Interface Sci. 331, 356–363.
- [12] Monteiro, S.A., Sasaki, G.L., de Souza, L.M., Meira, J.A., de Araujo, J.M., and Mitchell, D.A., (2007) Chem. Phys. Lip. 147, 1–13.
- [13] Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., and Fracchia, L. (2010) Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 427–444.
- [14] Hossein-Ghohjvand, A.B., Farzaneh-Vahabzadeh, A., Alireza-Khodabandeh, S., Hossein, A., Markus, M.M., and Syldatk, C. (2013). Appl. Biochem. Biotechnol. 170, 1080–1093.
- [15] Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., and Hausmann, R. (2017). Biotechnol. J. 12, 1600561–1600561.
- [16] Chistofi, N., and Ivshina, I.B. (2002). J. Appl. Microbiol. 93, 915–929.
- [17] Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, K.I., Hara-Hotta, H., and Yano, I. (1992). J. Bacteriol. 174, 1769–1776.
- [18] Machin-Ramírez, C., Morales-Guzmán, D., Martínez-Morales, F., Odon, A.I., and Trejo-Hernández, M.R. (2010). Int. Biodeter. Biodegr 64, 538–544.
- [19] Kodama, Y., Indah Stiknowati, L., Ueki A., Ueki, K., and Watanabe, K. (2008). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 711–715.
- [20] Chaturvedula, T., Burla, S., and Appa, R.P. (2007). Curr. Microbiol. 54, 79–84.
- [21] Bergey, D.H., Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.
- [22] Chandran, P., and Das, N. (2010). Int. J. Eng. Sci. Technol. 2, 6942–6953.
- [23] Cooper, D.G., and Goldenberg, B.G. (1987). Appl. Environ. Microbiol. 53, 224–229.
- [24] Bayoumi, R.A., Haroun, B.M., and Chazal, E.A., Mahe, Y.A. (2010). Aust. J. Basic Appl. Sci. 4, 3484.
- [25] Allison, C.P., and Hughes, C. (1991). Sci. Prog. 75, 403–422.
- [26] Wu, J.-Y., Yeh, K.-L., Lu, W.-B., and Lin, C.-L., Chang, J.S. (2008). Bioresour. Technol. 99, 1157–1164.
- [27] Arino, S., Marchal, R., and Vandecasteele, J.P. (1996). Appl. Environ. Microbiol. 45, 162–168.
- [28] Vigneshwaran, C., Jerold, M., Vasantharaj, K., and Sivasubramanian, V. (2016). J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. 8, 152–160.
- [29] Mouati, F.E., Abo Elsoud, M.M., and Moharam, M.E. (2016). Biotechnol. Rep. 9, 31–37.
- [30] Bidlan, R., Deepthi, N., Rastogi, N.K., and Manonmani, H.K. (2010). J. Microbiol. 2, 705–716.
- [31] Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., and Sarubbo, L.A. (2010). Coll. Surf. B 79, 174–183.
- [32] Alves, T.S., Salgado, J.P., Andrade, R.F.S., Montero-Rodríguez, D., Ferreira, W.B., Almeida, M.M., Campos Takaki, G.M., and Araujo, H.W.C (2014). Brit. Biotechnol. J. 4, 708–719.
- [33] Tahzibi, A., Kamal, F., and Mazaheri, M. (2003). Iran. Biomedic. J. 8, 25–31.
- [34] Anyanwu, C.U., Obi, S.K.C., and Okulo, B.N., (2010). Ur Nat. 8, 1–11.
- [35] Chen, J., Wang, X.J., Hu, J.D., and Tao, S. (2006). Environ. Sci. 27, 154–159.

- [36] Matsuyama, T., Kaneda, K., and Yano, I. (1986). *Proc. Mass. Spectrum Soc. Japan* 11, 125–128.
- [37] Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., and Umar, S. (2013). *Int. Biodeter. Biodegr* 81, 28–34.
- [38] Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espiny, M.J., and Manresa, M.A. (1989). *Biotechnol. Lett.* 11, 871–874.
- [39] Gong, Z., Peng, Y., and Wang, Q. (2015). *Biotechnol. Lett.* 37, 2033–2038.
- [40] Peng F, Wang Y, Sun F, Liu Z, Lai Q, and Shao Z (2008). *J. Appl. Microbiol.* 105, 698–705.
- [41] Kumari, B., Singh, S.N., and Singh, D.P. (2012). *Process Biochem.* 47, 2463–241.