



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA
BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN
BACTERIAS MARINAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

IPB. ANDRÉS DURÁN JARAMILLO

Director de Tesis: DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

Codirector de Tesis: DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ



CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2019

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 del Dr. Fernando Martínez Morales y codirección 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 Numero 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

COMITÉ TUTORAL:

Director de Tesis

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB- UAEM)

Codirector de Tesis:

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

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

Dr. Marco Antonio Rogel Hernandez (CCG- UNAM)

Dr. Lorenzo Segovia Forcella (IBT- UNAM)

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Centro de Investigación en Biotecnología, por permitirme iniciar mis estudios de posgrado además de facilitar el desarrollo del presente estudio.

Dr. Fernando Martínez y a la Dra. María del Refugio Trejo por aceptarme y darme la confianza de pertenecer a su grupo de investigación, además de su dirección, enseñanzas, compromiso y apoyo para cumplir cada una de las metas trazadas en este proyecto.

A mi comité tutotal, la Dra. Irene, Dr. Lorenzo y Dr. Marco Antonio por todo el apoyo y opiniones en pro de obtener una buena investigación.

Al Dr. Leobardo Serrano por permitirme trabajar en las instalaciones a su cargo, y a la Dra. Celia Flores por la información y conocimientos suministrados sobre la técnica de qPCR relativa, además de permitirme utilizar sus equipos a cargo.

A los Administrativos del CEIB, como la Biol. Fernanda, Ing. Jezer, Víctor Martínez entre otros, que de una u otra forma hicieron parte de este proceso.

A mis amigos e integrantes del equipo de trabajo del Laboratorio De Biotecnología Ambiental, Dr. Brandt , Dra. Nashbly , Daniel , Vero, Nydia, Arianna, Enrique, Elian, Victoria , por los momentos compartidos, asesorías, lecturas de artículos los viernes y cooperación en el uso de las herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios por darme salud y permitirme cumplir esta meta.

A mi Esposa América por regalarme esa alegría y sonrisas a diario, darme esa voz de aliento y ser ese apoyo cada día que sentía que las necesitaba, además de darme todo su amor y sus opiniones a nivel científico en pro de mejorar. A mi Hija Violeta por ser el fruto de una hermosa relación, por regalarme todo su amor cada día desde su nacimiento y ser ese motor para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mi Familia, mis padres Alfonso y Zoraida, por ser siempre ese apoyo y estar hay cuando los he necesitado a pesar de la distancia y darme sus consejos y experiencias de vida para siempre salir adelante a pesar de los obstáculos que se presenten, a mi hermana Mariana por siempre ser ese apoyo incondicional y compañía cuando lo he necesitado.

Andrés Duran Jaramillo

CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	8
2.1 AMBIENTES MARINOS	8
2.1.1 Golfo de México	9
2.1.2 Diversidad bacteriana en el Golfo de México	10
2.2 BIOSURFACTANTES	11
2.3 CLASIFICACION DE LOS BIOSURFACTANTES	12
2.3.1 Glicolípidos	12
2.3.2 Lipopéptidos	13
2.3.3 Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros	13
2.3.4 Biosurfactantes poliméricos	14
2.3.5 Partículas de biosurfactantes	14
2.4 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN BIOSURFACTANTES	14
2.5 METODOS PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD BIOSURFACTANTE	15
2.6 PROPIEDADES DE BIOSURFACTANTES	15
2.7 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES	15
2.8 ANTECEDENTES DIRECTOS	18
3. JUSTIFICACION	19
4. HIPOTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos específicos	19
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
7. MATERIALES Y METODOS	21
7.1 Microorganismos	21
7.1.1 Identificación morfológica	21
7.1.2 Análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S	21
7.1.3 Prueba de Antibiograma	22
7.2 Medios de cultivo	22

7.3 Cinéticas de crecimiento de los aislamientos marinos	22
7.3.1 Pre-cultivo	22
7.3.2 Cinéticas de crecimiento	22
7.4 Evaluación de la actividad biosurfactante	23
7.4.1 Tensión superficial	23
7.4.2 Índice de emulsión	23
7.4.3 Prueba de hemólisis	23
7.4.4 Método en placa agar CTAB	23
7.5 Evaluación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes mediante la amplificación por PCR.	24
7.6 Validación de la expresión de los genes amplificados mediante la técnica de REAL- TIME PCR (qPCR)	24
8. RESULTADOS	25
8.1 Microorganismos	25
8.2 Identificación Morfológica	26
8.3 Análisis de la secuencia del Gen ribosomal 16S	27
8.4 Prueba de Antibiograma	29
8.5 Cinéticas de crecimientos de los aislamientos marinos	31
8.6 Evaluación de la actividad biosurfactante	32
8.7 Evaluación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes mediante la amplificación por PCR	34
8.8 Validación de la expresión de los genes amplificados mediante la técnica de REAL- TIME PCR (qPCR)	39
8.8.1 Estandarización de la REAL- TIME PCR (qPCR)	39
8.8.2 Análisis de la expresión de los genes identificados	41
9 DISCUSION	45
10 CONCLUSIONES	47
11 PERSPECTIVAS	48
12 BIBLIOGRAFÍA	49
13 ANEXOS.	56

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Porcentaje de abundancia de 13 clases de bacterias más abundantes utilizando secuencias del gen 16S rRNA	11
Figura 2. Molécula biosurfactante con su parte apolar (hidrofóbica) y polar (hidrofílica)	12
Figura 3. Estructuras de los glicolípidos más conocidos	13
Figura 4. Estrategia experimental del proyecto	20
Figura 5. Estaciones de muestreo del Golfo de México	29
Figura 6. Cepas bacterianas aisladas del Golfo de México	30
Figura 7. Halos de inhibición para algunas de las cepas bacterianas	33
Figura 8. Cinética de crecimiento 168h <i>Thalassospira</i> sp.	35
Figura 9. Cinética de crecimiento 168h <i>Bacillus</i> sp.	35
Figura 10. Índice de Emulsión (IE ₂₄) para la cepa <i>Thalassospira</i> sp. a diferentes horas de la cinética de crecimiento de 168 h	37
Figura 11. Índice de Emulsión (IE ₂₄) para la cepa <i>Bacillus</i> sp. a diferentes horas de la cinética de crecimiento de 168 h	37
Figura 12. Gen <i>ppsD</i> implicado posiblemente en la biosíntesis de la plipastatina identificado en la anotación del genoma de <i>Thalassospira</i> sp utilizando el programa Artemis	40
Figura 13. Operon para la biosíntesis de la plipastatina encontrado en <i>Bacillus subtilis</i>	40

	pág.
Figura 14. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>ppsD</i>	41
Figura 15. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>gyrB</i>	42
Figura 16. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>rpoD</i>	42
Figura 17. Curva de amplificación para el fragmento del gen <i>ppsD</i>	43
Figura 18. Curva melting para el fragmento del gen <i>ppsD</i>	44
Figura 19. Niveles de expresión del gen <i>ppsD</i> mediante qPCR	44

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Aplicaciones de los biosurfactantes en las diferentes industrias	20
Tabla 2. Aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México	25
Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México	31
Tabla 4. Análisis BLAST de las secuencias del 16s ARN ribosomal de los aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México..	32
Tabla 5. Antibiograma a cepas bacterianas aisladas del Golfo de México	34
Tabla 6. Screening de actividad biosurfactante en bacterias marinas	36
Tabla 7. Características de los genomas ensamblados de las cepas marinas.	38
Tabla 8. Análisis antiSMASH para los genomas secuenciados	39
Tabla 9. Oligonucleotidos para la amplificación en qPCR	41

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Tinción de Gram	48
ANEXO 2. <i>Quick-gDNA</i> [™] Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)	51
ANEXO 3. Protocolo para extracción de RNA (QIAGEN modificado)	52

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos representan el 70% de la biosfera de la tierra, estos ecosistemas son extremadamente complejos y contienen una gran diversidad biológica (Hewitt *et al.*, 2008; Devi *et al.*, 2011). Debido a estos ambientes complejos, los microorganismos marinos han tenido que adaptarse a las condiciones físicas, químicas y biológicas que se encuentran en el medio ambiente oceánico (por ejemplo: Presión, temperatura, salinidad, micronutrientes), para ello han desarrollado estrategias de adaptación y síntesis de nuevos metabolitos que no suelen estar presentes en microorganismos de origen terrestre (Carvalho, C.C y Fernandes, P. 2010). Por lo tanto, el ecosistema marino es uno de los mayores recursos para el descubrimiento de nuevas biomoléculas entre ellas antibióticos, enzimas, vitaminas, fármacos, bioemulsificantes (BE), biosurfactantes (BS), entre otros (Shekhar *et al.*, 2015).

Algunas bacterias marinas producen BS (moléculas orgánicas que presentan propiedades tensoactivas), que ayudan a transportar sustratos poco solubles en agua aumentando su biodisponibilidad. Sin embargo, para los BS se han descrito otras funciones relacionadas con la unión a metales pesados, “quorum sensing” y la formación de biofilms (Carvalho, C.C & Fernandes, P. 2010). Debido a estas características ha crecido el interés en los biosurfactantes como biomoléculas con usos biotecnológicos, estos compuestos pueden tener aplicaciones en biorremediación; como nuevos tipos de antibióticos y fármacos, así como en la industria textil, papelera y cosmética (Jackson *et al.*, 2015). Además son de gran importancia debido a su diversidad estructural y funcional (Rodrigues *et al.*, 2006). Los biosurfactantes tienen varias ventajas sobre sus contrapartes sintéticas: son biodegradables y no se acumulan en el ambiente, tienen bajo nivel de toxicidad haciéndolos candidatos perfectos para su uso en biorremediación (Franzetti *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 AMBIENTES MARINOS

Los ecosistemas marinos representan el 70% de la superficie de la tierra, lo cual está comprendido por océanos y mares. Estos ecosistemas son altamente dinámicos y están interconectados por una red de corrientes superficiales y profundas. Existen factores como la salinidad y la temperatura que dan lugar a la formación de capas estratificadas y corrientes que

con ayuda de las surgencias en algunas regiones pueden ser mezcladas creando una heterogeneidad vertical y lateral en estos ambientes marinos, estos ecosistemas marinos se pueden clasificar relacionándolos con las zonas de la vida (ej.: pelágicos, asociados a las masas de agua, y bentónicos, asociados a los fondos marinos) Las diversas condiciones que pueden encontrar en este ecosistema (salinidad, presión, temperatura, etc.) permiten una amplia distribución de los microorganismos marinos los cuales van a presentar características específicas de acuerdo a las condiciones de cada ecosistema o zona oceánica (Lara-Lara, J.R., *et al.* 2008)

2.1.1 Golfo de México

El Golfo de México es una frontera internacional de México, Estados Unidos y Cuba, hacia la región del Gran Caribe en la zona noroccidental tropical, subtropical y templada del Océano Atlántico. Cinco entidades federativas de Estados Unidos bordean el Golfo (Florida, Alabama, Misisipi, Luisiana y Texas) y suman alrededor de 2 934 km de litoral de la Unión Americana. A su vez cinco estados mexicanos bordean el Golfo y uno en la costa caribe (Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo), lo que representa cerca de 3 200 km de costa. Entre México y Estados Unidos, aproximadamente 55 millones de personas viven en los estados costeros del Golfo (40 millones en Estados Unidos y 15 millones en México). Más de 80% del petróleo y más de 95% del gas natural mexicano se produce en las costas del Golfo de México.(Lara-Lara, J.R., *et al.* 2008)

El Golfo está localizado en una zona de transición entre clima tropical y subtropical, entre los 18° y 30° N, y 82° y 98° W. Es una cuenca semicerrada que se comunica con el Océano Atlántico y con el Mar Caribe, por el estrecho de Florida y por el canal de Yucatán, respectivamente (Monreal Gómez y Salas de León 1997). Su batimetría varía considerablemente, alcanzando profundidades cercanas a los 4 000 m en su región central. La parte occidental tiene una extensión de norte a sur de 1 300 km, mientras que las regiones central y oriental promedian 900 km.

La superficie del Golfo de México, incluyendo el cuerpo de agua y los humedales costeros de México y Estados Unidos, es de ca. 1 942 500 km². Solo el cuerpo de agua tiene una superficie aproximada de 1 507 639 km². La profundidad promedio del Golfo es de ca. 1 615 m, y el volumen de agua es de aproximadamente 2 434 000 km³ (Wiseman y Sturges 1999).

En el suroeste del Golfo de México, sobre la plataforma y el talud Continental, son comunes los sitios naturales de emanación de hidrocarburos fósiles y de gas metano. Es importante destacar que estas emanaciones naturales constituyeron inicialmente el único medio de detección en superficie de los grandes yacimientos actualmente sujetos a explotación. Aparte de su obvia relevancia como fuentes potenciales de gas e hidrocarburos, en el ambiente marino las emanaciones también representan fuentes permanentes de contaminación (MacDonald *et al.* 1993). Tanto los hidrocarburos fósiles como el gas metano representan productos biogénicos que pueden ser empleados en el metabolismo de bacterias hidrocarbonoclásticas y metanogénicas; a través de mecanismos quimiosintéticos, estos microorganismos, tienen la capacidad de transformar estos productos en fuentes importantes de carbono orgánico, el cual puede posteriormente ser transferido a través de una trama trófica de organismos heterótrofos, asociada a una fuente natural de emisión de hidrocarburos (Soto *et al.*, 2004)

2.1.2 Diversidad bacteriana en el Golfo de México

Estudios posteriores al derrame de petróleo en el Golfo de México, se centraron principalmente en el destino del petróleo en la columna de agua, además de estudiar la contribución de ciertos microorganismos a la degradación del petróleo en una columna de hidrocarburos de aguas profundas (Camilli *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2012) observando que hay una respuesta rápida de los miembros de las Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria (Figura 1) (Lamendella *et al.*, 2014) a las aportaciones de degradación de hidrocarburos. Específicamente, hubo un aumento inicial de la abundancia relativa de miembros de Oceanospirillales (Hazen *et al.*, 2010; Mason *et al.*, 2012), seguidos de los miembros de los géneros Colwellia y Cycloclasticus.

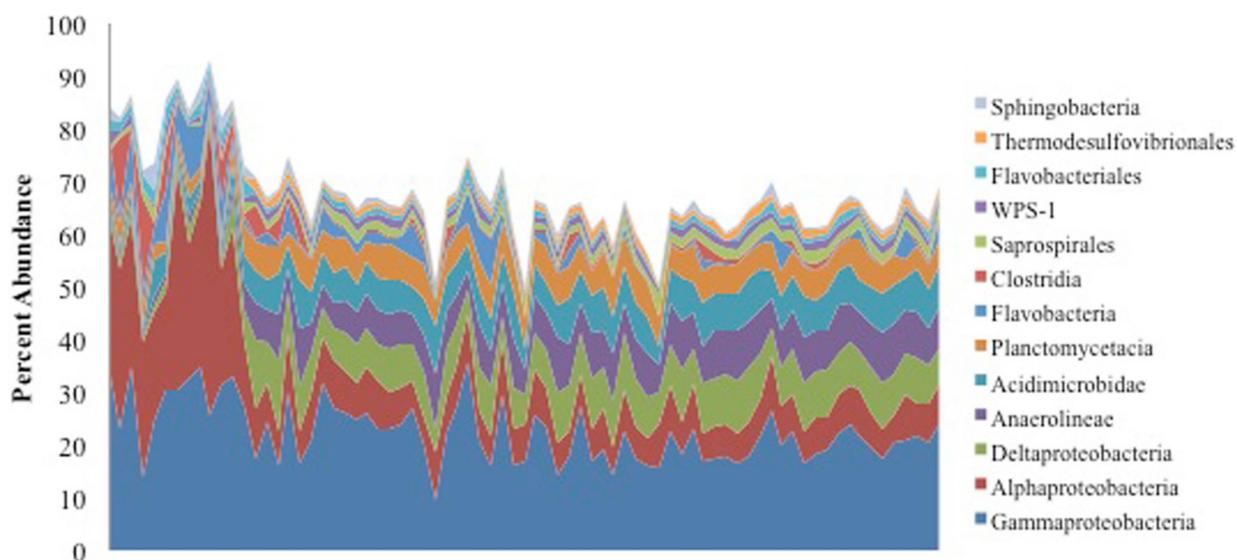


Figura 1. Porcentaje de abundancia de las 13 clases de bacterias más abundantes utilizando secuencias del gen 16S rRNA.(Lamendella *et al.* , 2014)

En la actualidad, el ecosistema marino es uno de los mayores recursos para el descubrimiento de nuevas biomoléculas entre ellas antibióticos, enzimas, vitaminas, fármacos, bioemulsificantes (BE), biosurfactantes (BS) (Shekhar *et al.*, 2015)

2.2 BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes son moléculas orgánicas que presentan propiedades tensoactivas. Estos compuestos son de carácter anfifílico, teniendo una parte hidrofílica, así como una parte hidrofóbica (Santos *et al.*, 2016) (Figura 1). La parte hidrofílica puede ser un grupo éster, hidroxilo, fosfato, carboxilo o carbohidrato y puede ser neutro o cargado negativamente, mientras que la parte hidrofóbica es un ácido graso que varía en tamaño de 8 a 18 carbonos. Debido a su naturaleza anfifílica, los biosurfactantes tienden a acumularse en las interfaces (aire-agua y aceite-agua) y superficies. Como resultado, los biosurfactantes reducen las fuerzas de repulsión entre fases diferentes en las interfaces o superficies permitiendo que las dos fases se mezclen con mayor facilidad, reduciendo la tensión superficial (líquido-aire) e interfacial (líquido-líquido) (Maier, R. M. 2003).

Los biosurfactantes como monómeros, son añadidos a la solución, en donde la superficie o la tensión interfacial disminuirá hasta que la concentración del biosurfactante alcanza lo que se conoce como la concentración micelar crítica (CMC). La CMC, es la concentración de

biosurfactante en la que se forman conjuntos moleculares organizados, conocidos como micelas y corresponde al punto en el que el biosurfactante alcanza el valor estable más bajo en la Tensión superficial. Por ejemplo, un biosurfactante competente puede reducir la tensión superficial entre el agua y el aire de 73 mN / m a menos de 30 mN / m (Maier, R. M. 2003). Además estas moléculas presentan otras propiedades físicas y químicas (temperatura, capacidad emulsificante, tolerancia al pH y fuerza iónica).

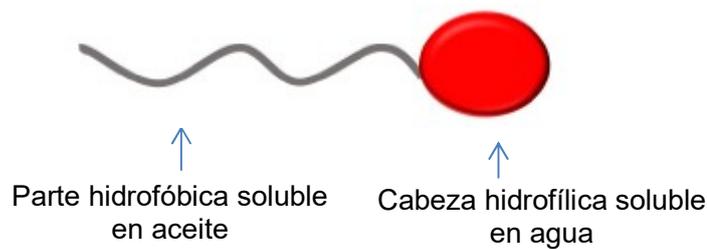


Figura 2. Molécula biosurfactante con su parte apolar (hidrofóbica) y polar (hidrofílica)

2.3 CLASIFICACION DE LOS BIOSURFACTANTES

La mayoría de los biosurfactantes son de carácter aniónico, mientras que los que contienen grupos amino son de carácter catiónico. En su estructura hay una porción hidrofóbica la cual posee ácidos grasos de cadena larga y una porción hidrofílica que puede ser un carbohidrato, péptido cíclico, un aminoácido, un ácido carboxílico de fosfato o alcohol. Además la masa molar de los biosurfactantes generalmente oscila entre 500 y 1500 Da (Bognolo, 1999). Los biosurfactantes generalmente se clasifican por su origen microbiano y composición química (Banat *et al.*, 2010; Vijayakumar *et al.*, 2015) como se muestra a continuación:

2.3.1 Glicolípidos

Entre los glicolípidos más conocidos se encuentran los ramnolípidos, sofrorolípidos, lípidos de manosileritritol y los lípidos de trehalosa (Figura 3). Los glicolípidos son hidratos de carbono que contienen ácidos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxialifáticos. Las bacterias marinas como *Alcaligenes* sp., son capaces de producir lípidos de glucosa. El componente lipofílico consiste en cuatro ácidos β -hidroxidecanoicos unidos entre sí por enlaces éster y acoplados glucosídicamente en el C-1 de la glucosa. *Alcanivorax borkumensis* también produce un lípido de glucosa aniónico con una cadena lateral oxacil tetramérica. Se sabe que la fuente de

carbono influye en la estructura del glicolípido. Por ejemplo, *Arthrobacter* sp. SI 1 produce un disacárido de trehalosa (trehalosa tetraéster) que es acilado por tres ácidos grasos (C8-C14) y un grupo succinilo cuando la fuente de carbono es mihagol-S. Sin embargo, los dicorinomicolatos de trehalosa (diéster de trehalosa) son producidos cuando se usa etanol (Maneerat, S ., 2005)

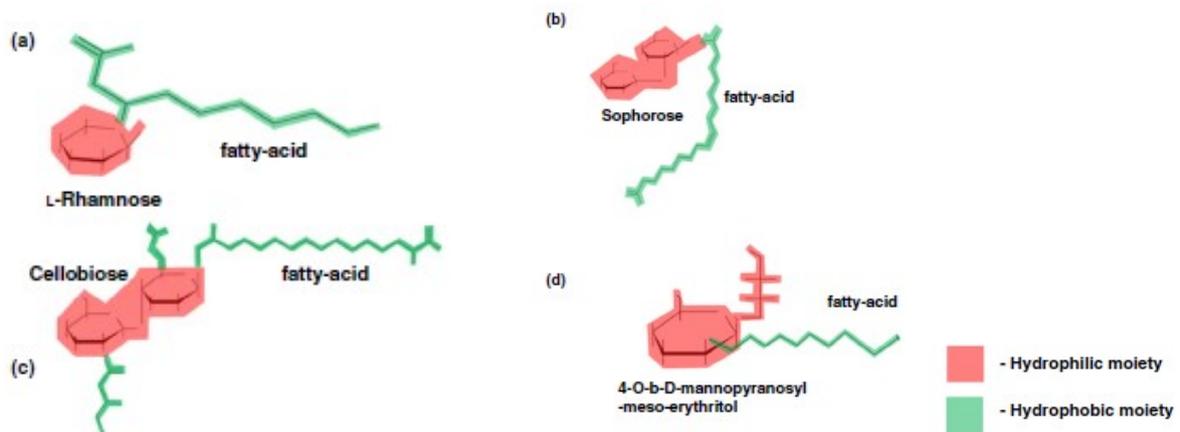


Figura 3. Estructuras de los glicolípidos más conocidos. (a) ramnolípidos, (b) sofrolípidos, (c) lípidos de celobiosa y (d) lípidos de manosileritritol. (Imagen tomada de Jackson *et al.*, 2015),

2.3.2 Lipopéptidos

Los lipopéptidos, como por ejemplo, la surfactina de *Bacillus subtilis*, consisten en una cadena cíclica de varios residuos de aminoácidos de largo (2-14 aa) y una cadena de alquilo como la parte hidrófoba (8-16 carbonos). Los lipopéptidos presentan, además de sus propiedades tensoactivas, actividades farmacológicas como por ejemplo antimicrobiana, antitumoral y propiedades inmunosupresoras (Thies *et al.*, 2014).

2.3.3 Ácidos grasos, fosfolípidos y lípidos neutros

Diferentes bacterias y levaduras producen grandes cantidades biosurfactantes de ácidos grasos y fosfolípidos durante el crecimiento en n-alcanos. Las vesículas ricas en fosfatidiletanolamina son producidas por *Acinetobacter* spp. las cuales forman microemulsiones ópticamente transparentes de alcanos en agua. Estos biosurfactantes son esenciales para aplicaciones médicas (Gautam y Tyagi 2006).

2.3.4 Biosurfactantes poliméricos

Emulsan, alasan, liposan y otros complejos proteicos de polisacáridos son los biosurfactantes poliméricos mejor estudiados. El emulsan es un emulsionante para hidrocarburos en agua en concentraciones tan bajas como 0.001% a 0.01% (Lang,S., 2002). El liposan es un emulsionante extracelular soluble en agua sintetizado por *C. lipolytica* y está compuesto por un 83% de carbohidratos y un 17% de proteínas y este posee aplicaciones como emulsionante en la industria alimentaria y cosmética (Chakrabarti, S., 2012).

2.3.5 Partículas de biosurfactantes

Las vesículas de membrana extracelular particionan los hidrocarburos para formar una microemulsión, la cual desempeña un papel importante en la captación de alcanos por las células microbianas.

2.4 MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN BIOSURFACTANTES

Existe una variedad de microorganismos que producen biosurfactantes, ya sea secretada extracelularmente o unidos a componentes celulares, principalmente durante su crecimiento en sustratos inmiscibles en agua (Camillos *et al.*, 2008). Los biosurfactantes producidos por bacterias, hongos, y levaduras tienen diversas estructuras químicas incluyen glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos (Costa *et al.*, 2006).

Una clase importante de biosurfactantes son los glicolípidos, que incluye a los ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos (Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. 2016). Algunos de los ramnolípidos han sido descritos en *P. aeruginosa* (Maier y Soberón-Chávez, 2000) y el género *Burkholderia* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Los lípidos de trehalosa son producidos por un número de géneros estrechamente relacionados, incluyendo *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Arthrobacter*, todos pertenecientes a la división Firmicutes (Satpute *et al.*, 2010). Otro tipo de glicolípidos son los soforolípidos que son producidos por varias especies de *Candida* y un grupo recientemente identificado son los llamados lípidos de manosileritritol que son producidos por *Candida antarctica* y *Ustilago maydis* (Bodour *et al.*, 2003; Nitschke M., and Costa, 2007).

Una segunda clase importante de biosurfactantes son las lipoproteínas como la surfactina, iturina, fengicina y lichenisina, las cuales son producidas por *Bacillus* spp (Ramkrishna, 1997; Satpute *et al.*, 2010). Otros géneros que producen lipoproteínas incluyen *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Además existen otros tipos de biosurfactantes, entre los cuales se encuentran los biosurfactantes poliméricos y donde sus organismos productores incluyen los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Candida*, *Halomonas*, *Methanobacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces* y *Sulfolobus* (Cortés-Camargo y Barragán-Huerta, 2013; Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal, 2013).

2.5 METODOS PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD BIOSURFACTANTE

Los biosurfactantes son estructuralmente un grupo muy diverso de biomoléculas como se menciona anteriormente, como por ejemplo: los glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos o fosfolípidos. Por lo tanto, la mayoría de los métodos para el análisis general de cepas productoras de biosurfactantes se basan en los efectos físicos de los tensoactivos. Alternativamente, se puede explorar la capacidad de las cepas para interferir con las interfases hidrofóbicas. Por otro lado, los métodos de selección específicos como el ensayo colorimétrico de agar CTAB son adecuados sólo para un grupo limitado de biosurfactantes. También existen métodos cualitativos y cuantitativos entre los cuales encontramos: la prueba de hemólisis, el método de colapso por gota, evaluación de la capacidad emulsificante y medición de la tensión superficial (Shah *et al.* , 2016; Amallesh *et al.*, 2012)

2.6 PROPIEDADES DE LOS BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes poseen una serie de propiedades que los hacen unas moléculas muy atractivas para la industria y otros sectores, dentro de estas propiedades se destacan: La actividad superficial e interfacial, tolerancia a la temperatura, tolerancia a pH, fuerza iónica, baja toxicidad, forman emulsión, son específicas, son moléculas biodegradables, tienen biocompatibilidad y digestibilidad (Santos *et al.*, 2016).

2.7 APLICACIONES DE LOS BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes tienen una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas como lo es en la industria del petróleo, alimentos, bebidas, cosméticos, detergentes, textiles, pinturas, minería,

farmacia y nanotecnología. Actualmente, el principal mercado es la industria del petróleo. Los biosurfactantes se pueden utilizar para la recuperación de residuos de petróleo en tanques de almacenamiento, en recuperación mejorada de petróleo, limpieza de derrames de petróleo y la biorremediación del suelo y el agua. En la Tabla 1 observamos un resumen de las aplicaciones de los biosurfactantes en las diferentes industrias.

Tabla 1. Aplicaciones de los biosurfactantes en las diferentes industrias. (Santos *et al.*, 2016)

INDUSTRIA	APLICACIÓN	ROL DE LOS BOUSURFACTANTES
Ambiental	Biorremediación de suelos y agua	Emulsificación de aceites, disminución de la tensión interfacial, dispersión, detergencia, formación de espuma, inhibición de la corrosión en aceites combustibles y equipo.
Petróleo	Recuperación mejorada de petróleo; Desemulsificación	La emulsión de los aceites, la baja de la tensión interfacial, desemulsificación de emulsiones oleosas, reducción de la viscosidad, humectación de superficies sólidas,
Minería	Operaciones de limpieza de metales pesados; Remediación del suelo; Flotación	Humectación y formación de espuma, colectores y espumadores, eliminación de iones metal de soluciones acuosas, suelo y sedimentos, secuestradores de metales pesados.
Textiles	Preparación de fibras; Teñido e impresión; Acabado de textiles	Humectación, penetración, solubilización, emulsificación, detergencia

Continuación de la Tabla 1. Aplicaciones de los biosurfactantes en las diferentes industrias (Santos *et al.*, 2016)

INDUSTRIA	APLICACIÓN	ROL DE LOS BOUSURFACTANTES
Alimentaria	Emulsificación y desemulsificación; Ingrediente funcional	Solubilización de aceites aromatizados, control de consistencia, emulsificación, agente humectante, Formacion de espuma, espesante.
Medicina	Microbiológico; Productos farmacéuticos y terapéuticos	Agentes antiadherentes, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirales, vacunas, terapia génica, moléculas inmunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrol; Fertilizantes	Humectación, dispersión, suspensión de plaguicidas en polvo y fertilizantes, la emulsificación de soluciones de plaguicidas, la facilitación de mecanismos de biocontrol de microbios, aumento de la biodisponibilidad de nutrientes.
Cosmética	Productos de salud y belleza	Emulsificación, agentes espumantes, solubilización, agentes humectantes, limpiadores, mediadores de la acción enzimática
Limpieza	Detergentes de lavado	Detergentes y desinfectantes para lavar, mojar, esparcir, inhibición de la corrosión
Nanotecnología	Síntesis de nanopartículas	Emulsificación, estabilización

2.8 ANTECEDENTES DIRECTOS

Dentro de los genes que han sido descritos para la biosíntesis de algunos biosurfactantes se encuentran el gen *sfp* en *Bacillus* spp que codifica para una Fosfopanteteinil transferasa requerida para la biosíntesis no-ribosomal de la surfactina (Jacques., 2011). Un estudio realizado sobre 37 cepas de *Bacillus* spp por Porob *et al.*, 2013, amplificó el gen *sfp* en un total de 25 aislamientos, varios de ellos de *B. tequilensis*. El gen *sfp* caracterizado tenía un marco de lectura abierto de 675 pb que codifica para 224 aminoácidos, con un 99% de similitud con el gen *sfp* de *B. subtilis*. Además, observo dominios conservados de la familia PPTasa (Fosfopanteteinil transferasa) tipo *sfp* de proteínas como P1a, P1b, P2 y P3 implicadas en la biosíntesis de policétidos y péptidos no ribosómicos.

Otros biosurfactantes como iturina, fengicina y surfactina fueron descritos en varias cepas de *Bacillus* spp. Plaza *et al.*, 2015 caracterizaron los genes que codifican para las enzimas que están involucradas en la síntesis de estos biosurfactantes mediante PCR y evaluó los productos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Los ramnolípidos son otro tipo de biosurfactantes descritos en *Pseudomonas aeruginosa*, Ochsner *et al.*, 1994, aislaron, caracterizaron y expresaron los genes *rhlAB* que codifican para una ramnosiltransferasa involucrada en la biosíntesis de los ramnolípidos.

Funston *et al.*, 2016 caracterizo la producción de un ramnolipido en *Burkholderia Thailandensis* E264, además evaluó la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de ramnolipidos a diferentes horas, observando que estos tenían su mayor expresión en la fase estacionaria tardía la cual iniciaba a las 144 horas.

Actualmente en el laboratorio de biotecnología ambiental del CEIB- UAEM han sido aislados diversos géneros bacterianos de ambientes marinos con potencial en la producción de biosurfactantes. Sin embargo, se desconocen los genes involucrados en la biosíntesis de estos biosurfactantes, al igual el momento en el que estos genes son expresados.

3. JUSTIFICACION

Teniendo en cuenta que en otros microorganismos se han identificado diversos genes que están involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes el uso de herramientas moleculares ayudaría a hacer un estudio rápido para la identificación de estos genes en las nuevas bacterias aisladas de ambientes marinos presentes en el laboratorio, y además permitiría validar la expresión de estos genes identificando la etapa en la cual se están expresando.

4. HIPOTESIS

La expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de los biosurfactantes es inducida por fuentes de carbono durante su formación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y evaluar la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas del laboratorio de biotecnología ambiental CEIB-UAEM.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono para la formación de biosurfactantes en bacterias marinas
- Detectar e identificar genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas
- Validar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes mediante la técnica de REAL- TIME PCR en bacterias marinas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Este proyecto será realizado en tres etapas (Figura 4) que corresponden a:

1° etapa: Se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de cultivo marino utilizando diferentes fuentes de carbono (glicerol, hexadecano y keroseno), tomando muestras en diferentes tiempos para evaluar la formación de biosurfactantes por métodos cualitativos (prueba de hemólisis y CTAB) y métodos cuantitativos (índice de emulsión y tensión superficial).

2° etapa: Una vez fueron identificada(s) la(s) cepa(s) y se ajustaron las condiciones para la formación de biosurfactantes, se realizó la evaluación de genes involucrados para la biosíntesis de biosurfactantes mediante la amplificación por PCR en tiempo final. La amplificación positiva indicará que los genes podrían estar involucrados en la biosíntesis de estos biosurfactantes.

3° etapa: Los genes que amplifiquen en PCR tiempo final; será validada su expresión genética mediante PCR en tiempo real, cuantificando su expresión relativa en 5 periodos diferentes de la cinética de crecimiento: tiempo inicial (12h), fase exponencial (24h), fase estacionaria temprana (48h) , y fase estacionaria tardía(96h, 168h).

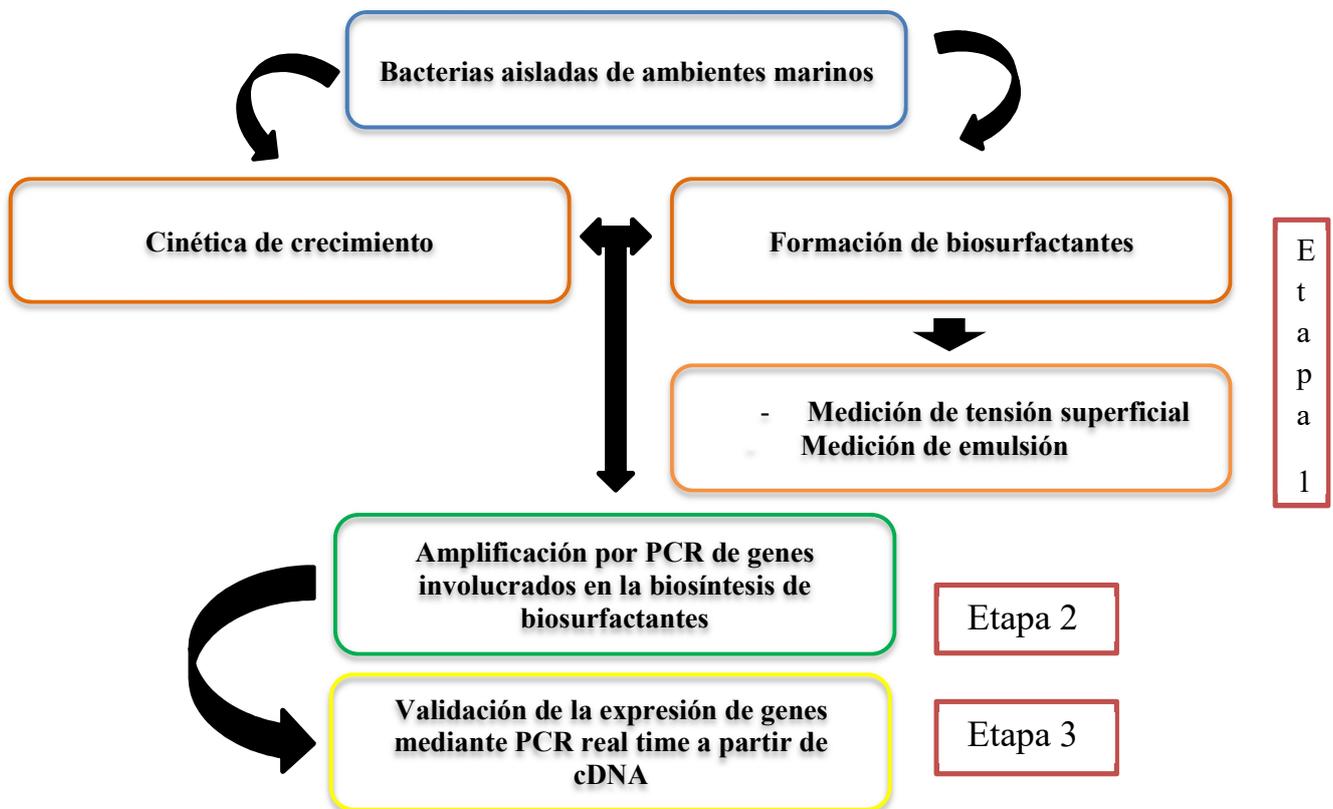


Figura 4. Estrategia experimental del proyecto

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Microorganismos

Los aislamientos a trabajar fueron aislados por el laboratorio de biotecnología ambiental CEIB-UAEM a partir de muestras de agua y sedimento provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México (Tabla 2). Las cepas fueron caracterizadas morfológicamente, molecularmente (secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal) y su resistencia a antibióticos (prueba de antibiograma).

Tabla 2. Aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México

Sitio/ Localización	Aislado	Código
C14 / Coatzacoalcos	12-1A -III	C14MCED-3
B6/Perdido	B6F(HC)A	-----
B6/Perdido	B6F(HC)B	-----
B6/Perdido	B6F(HC)C	-----
C12/ Coatzacoalcos	Cepa 14	C12FD-1
B5/Perdido	Cepa 33	B5MOD-1

7.1.1 Identificación morfológica

Se observó la morfología microbiana en placa, así como también se realizó tinción de Gram con el fin de determinar el tipo de pared celular, morfología y tamaño microscópico que presentaba cada uno de los microorganismos aislados. El protocolo empleado se observa en el anexo 1.

7.1.2 Análisis de la secuencia del Gen ribosomal 16S

Para la secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen ribosomal 16s, se obtuvo inicialmente el ADN genómico de las colonias bacterianas (50 ng/μl) utilizando el kit de extracción Quick-gDNA™ MiniPrep (Ver anexo 2), posteriormente se tomaron, 5 μl de ADN genómico los cuales fueron enviados a la empresa MacroGen- Korea para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST con el fin de

compararlas con las secuencias ya reportadas en la base de datos (NCBI), y con esto determinar el género al que pertenecían los microorganismos aislados.

7.1.3 Prueba de Antibiograma

Para la prueba de antibiograma donde se quería evaluar la resistencia a diferentes antibióticos se partió de un pre-cultivo crecido en medio marino líquido a 25 °C, a 150 rpm, toda la noche. Una vez crecidos los pre- cultivos se ajustó el cultivo a una OD₆₀₀ de 0.5, para utilizarlos en la prueba del antibiograma. Una vez tenemos la densidad óptica ajustada para cada aislamiento de 0.5, tomamos 100 ul de cada cultivo y lo llevamos a tubos q contienen 4.9 ml de medio marino semisólido los cuales serán vertidos sobre las cajas de medio marino sólido, con el fin de formar una capa sobre el medio sólido que va a contener el cultivo bacteriano. Ya solidificado el medio con el cultivos, se procedió a colocar los set de antibióticos (sensidiscos) en cada una de las cajas con los diferentes aislamientos. Como control de crecimiento estarán las cajas de medio sólido con la capa de cada cultivo bacteriano. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente, hasta observar sensibilidad (halos de inhibición) o resistencia a los diferentes antibióticos. Posteriormente, se midieron los radios (en mm), de los halos de inhibición o ausencia debido a la resistencia a esos antibióticos.

7.2 Medios de cultivo

Para la formación de biosurfactantes se cultivaron las cepas bacterianas en medio marino como control (10 g Sales marinas SIGMA-ALDRICH (S9883), 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona por litro) y medio marino suplementado con cada una de las diferentes fuentes de carbono; glicerol al 4% (p / v), hexadecano al 1 o 4% (p / v) y keroseno al 1 o 4% (p / v).

7.3 Cinéticas de crecimiento de los aislamientos marinos

7.3.1 Pre-cultivo: De cada aislamiento crecido en medio marino sólido a 25 °C y 30°C, se tomó una colonia aislada para inocular en 20 ml de medio líquido marino e incubar a 15°C y 30°C a 150 rpm, toda la noche.

7.3.2 Cinéticas de crecimiento: Utilizando los pre-cultivos de cada aislamiento se ajustaron los cultivos a una densidad óptica de 0.05 en matraces de 500 ml con un volumen final de 200 ml

de medio de cultivo marino (control) y medio marino suplementado con las diferentes fuentes de carbono: glicerol al 4% (p / v), hexadecano al 1% y 4% (p / v), keroseno al 1% y 4% (p / v). Cada cultivo se realizó por triplicado y se incubo a 15°C y 30°C a 150 rpm, monitoreándolos durante un periodo de 168 horas.

7.4 Evaluación de actividad biosurfactante: Se evaluó la formación de biosurfactantes utilizando las técnicas de: medición de la tensión superficial, la evaluación de la capacidad emulsificante, actividad hemolítica y agar CTAB.

7.4.1 Tensión superficial: Para la medición de la tensión superficial cada 24 horas se tomaron alícuotas de 3ml de cada cultivo, centrifugando a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C, con el fin de obtener el sobrenadante libre de células. Este sobrenadante se tomó y fue utilizado para medirle la tensión superficial utilizando el equipo Force Tensiometer - K20.

7.4.2 Índice de emulsión: El índice de emulsión se determinó adicionando en un tubo de ensayo 3mL de Kerosene y 2mL del sobrenadante libre de células, el tubo se agito a alta velocidad durante 2 minutos en vórtex, dejándolo reposar durante 24 h. El índice de emulsificación se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (cm) dividido por la altura total de la columna de líquido (cm), utilizando la siguiente ecuación:

$$IE_{24} = \frac{\text{Altura de la emulsión formada (cm)}}{\text{Altura total de la solución (cm)}} \times 100\%$$

7.4.3 Prueba de hemólisis: Los cultivos fueron evaluados en placas de agar sangre, que contenían medio marino con un 5 % (v/v) de sangre humana, sembrando en la placa 20ul de cultivo de cada aislamiento. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 25 °C por 1- 4 días, hasta observar la presencia de halos transparentes alrededor de la gota del cultivo indicando así la actividad hemolítica.

7.4.4 Método en placa agar CTAB: De cada aislamiento se sembraron 20ul en Agar Siegmund y Wagner constituido por una base mínima de sales (NaNO₃, 1g/L; KH₂PO₄, 0,1 g/L; MgSO₄.7H₂O, 0,1 g/L; CaCl₂, 0,1 g/L; extracto de levadura, 0,2 g/L; pH 6,5) con glicerol al 2%, bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) 0,2 g/L y azul de metileno 0,005 g/L (Siegmund y

Wagner, 1991). La presencia de biosurfactantes se identificó por la presencia de un halo azul alrededor de las colonias después de 2 días de incubación a 25 °C.

7.5 Evaluación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes mediante la amplificación por PCR

La evaluación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes se realizó mediante la amplificación por PCR. Inicialmente se enviaron a secuenciar las bacterias marinas aisladas en el laboratorio con el fin de buscar genes implicados en la biosíntesis de biosurfactantes, una vez recibidas las secuencias se analizaron, ensamblándose y anotándose el genoma para cada una de ellas, se analizó cada genoma mediante el programa antismash (Medema *et al.*, 2011) y la anotación de cada genoma con el programa Artemis (Carver *et al.*, 2012) con el fin de encontrar genes relacionados con biosurfactantes, una vez analizados los genomas de cada bacteria se diseñaron oligonucleótidos a partir de las regiones conservadas para cada gen relacionado con biosurfactantes identificado. Seguidamente, se extrajo el DNA genómico de aquellos aislamientos donde se identificó la presencia de biosurfactantes, utilizando el kit *Quick-gDNA™* Miniprep siguiendo las indicaciones del fabricante (ver anexo 2). El DNA genómico obtenido fue utilizado como templado para amplificar cada gen mediante la reacción de PCR.

7.6 Validación de la expresión de los genes amplificados mediante la técnica de REAL-TIME PCR

Los genes de los biosurfactantes que fueron amplificados en PCR tiempo final, fue validada su expresión genética mediante PCR en tiempo real. Para ello, inicialmente se estandarizó su amplificación en el equipo de qPCR, con el fin de conocer las condiciones y programa de termociclado a utilizar, además de conocer la curva melting para cada gen a evaluar, para este paso se utilizó el gen *ppsD*. Una vez fue estandarizada la amplificación, se extrajo el RNA utilizando el protocolo de Qiagen modificado (ver Anexo 3), a partir de cultivo líquido inducido con la fuente de carbono que favoreció la formación de biosurfactante y al medio marino líquido que fue utilizado como control, tomando muestras en 5 periodos diferentes de la cinética de crecimiento: tiempo inicial (12h), fase exponencial (24h), fase estacionaria temprana (72h), y fase estacionaria intermedia (96h), y fase estacionaria tardía (168h).

Posteriormente, con el RNA total obtenido para cada tiempo, se realizó la síntesis de primera cadena de DNA (cDNA) utilizando el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA, este cDNA fue utilizado como templado para las amplificaciones por PCR en tiempo real.

Los oligonucleótidos utilizados para la validación en PCR tiempo real, fueron diseñados a partir de las secuencias conservadas (región de adenilación) de los genes identificados para la biosíntesis de biosurfactantes. Una vez fueron diseñados los oligonucleótidos se amplificaron utilizando la técnica de qPCR, la amplificación se realizó utilizando el kit Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. La expresión de los genes para los biosurfactantes se cuantificó por el método de la curva estándar por cuantificación relativa y el análisis de los datos se realizó siguiendo el método estadístico de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesto por Livak *et al.*, 2001, para medir si los niveles de expresión se dan en la fase exponencial o durante la fase estacionaria.

8. RESULTADOS

8.1 Microorganismos

Las 6 cepas estudiadas fueron aisladas por el laboratorio de biotecnología ambiental CEIB-UAEM a partir de 90 muestras entre agua y sedimento provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del Golfo de México (Figura 5).

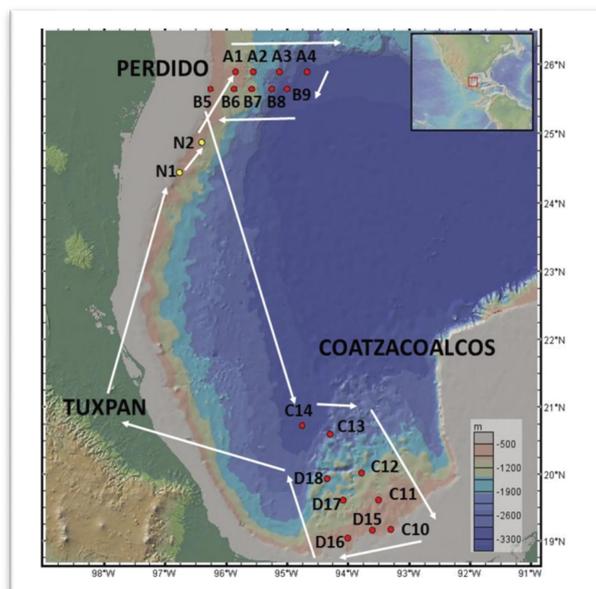


Figura 5. Estaciones de muestreo del Golfo de México

8.2 Identificación morfológica

A las 6 cepas estudiadas se les realizó tinción de gram obteniendo como resultado que la mayoría eran bacilos gram negativos, a su vez fue evaluada su morfología en caja, obteniendo diferentes morfologías a nivel macroscópico. (Figura 6) (Tabla 3).

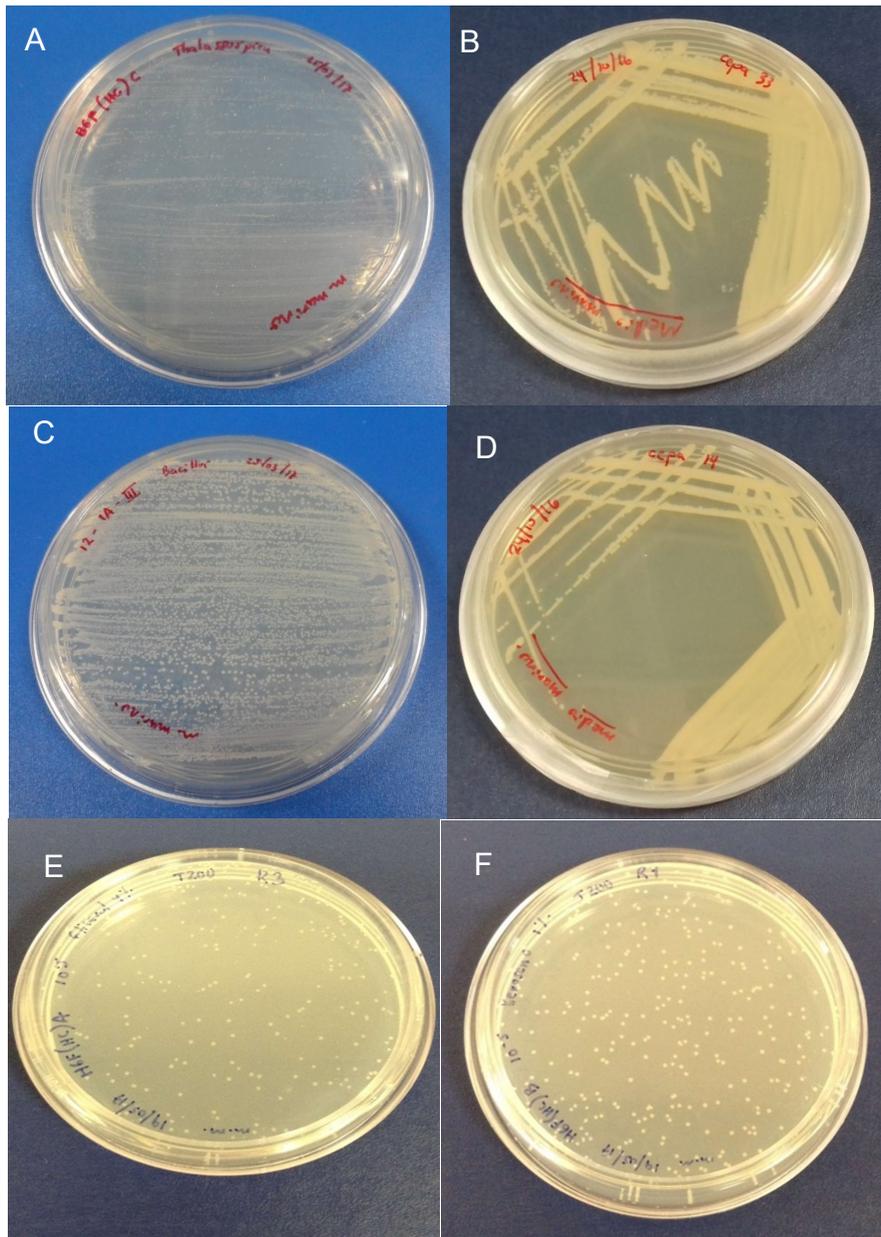


Figura 6. Cepas bacterianas aisladas del Golfo de México. **A.** B6F(HC)C (*Thalassospira* sp.), **B.** Cepa 33 (*Pseudoalteromonas* sp.), **C.** 12-1A-III (*Bacillus* sp), **D.** Cepa 14 (*Pseudoalteromonas* sp.), **E.** H6F(HC)A (*Thalassospira* sp.), **F.** H6F(HC)B (*Enterobacter* sp.).

Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México.

Sitio	Aislado	Código	Tinción de Gram y descripción microscópica	Morfología Macroscópica
C14	12-1A-III	C14MCED-3	Gram+, Bacilos grandes	Colonias Blancas cremosa, brillante y planoconvexas
B6	B6F(HC)A	-----	Gram -, poseen una forma alargada pequeña	Colonias Blanca-Rosadas cremosas, de forma convexa y brillante
B6	B6F(HC)B	-----	Gram -, bacilos muy pequeños	Colonia pequeña blanca cremosa, brillante de forma convexa y borde liso
B6	B6F(HC)C	-----	Gram -, poseen una forma alargada pequeña	Colonia blanca-rosada cremosa, de forma convexa y brillante
C12	Cepa 14	C12FD-1	Gram -, poseen forma bacilar	Colonia blanca-amarilla cremosa, de forma convexa brillante y borde liso
B5	Cepa 33	B5MOD-1	Gram -, poseen forma bacilar	Colonias blanca amarillas cremosa, de forma convexa brillante y borde liso

.8.3 Análisis de la secuencia del Gen ribosomal 16S

A partir de las secuencias de las regiones V3 y V4 del gen 16S del ARN ribosomal obtenidas de cada aislamiento, se analizaron mediante BLAST en la NCBI (Centro nacional para la información biotecnológica) obteniendo que el aislado 12-1A-III tenía una identidad del 98% con el género *Bacillus* sp.; para el aislado B6F(HC)A se obtuvo una identidad del 95% con el género *Thalassospira* sp.; en el aislado B6F(HC)B se observó una identidad del 97% con el género *Enterobacter* sp.; el aislado B6F(HC)C se observó una identidad del 95% con el género

Thalassospira sp.; y los aislados cepa 14 y 33 se observó una identidad del 99% con el género *Pseudoalteromonas* sp. (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis BLAST de las secuencias del 16s ARN ribosomal de los aislamientos provenientes de las zonas de Coatzacoalcos y Perdido del golfo de México.

Sitio	Aislado	Código	BLAST (16S ARN Ribosomal)	Cobertura (%)	Identidad (%)	Accesión
C14	12-1A-III	C14MCED-3	<i>Bacillus cereus</i> 03BB102, complete genome	96	98	CP009318 .1
B6	B6F(HC)A	-----	<i>Thalassospira</i> sp. CSE_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	95	KX027340 .1
B6	B6F(HC)B	-----	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain L25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91	97	JN700133 1
B6	B6F(HC)C	-----	<i>Thalassospira</i> <i>xiamenensis</i> M-5 = DSM 17429, complete genome	97	95	CP004388 .1
C12	Cepa 14	C12FD-1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93	99	KF170314 .1
B5	Cepa 33	B5MOD-1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	99	KF170314 .1

8.4 Prueba de Antibiograma

Para la prueba de antibiograma donde se quería evaluar la sensibilidad (halos de inhibición) o resistencia a diferentes antibióticos de las cepas trabajadas (Figura 7). Los resultados mostraron que las cepas B6F(HC)A y B6F(HC)C son altamente resistentes en comparación con los otros aislamientos que mostraron mayor sensibilidad. (Tabla 5).

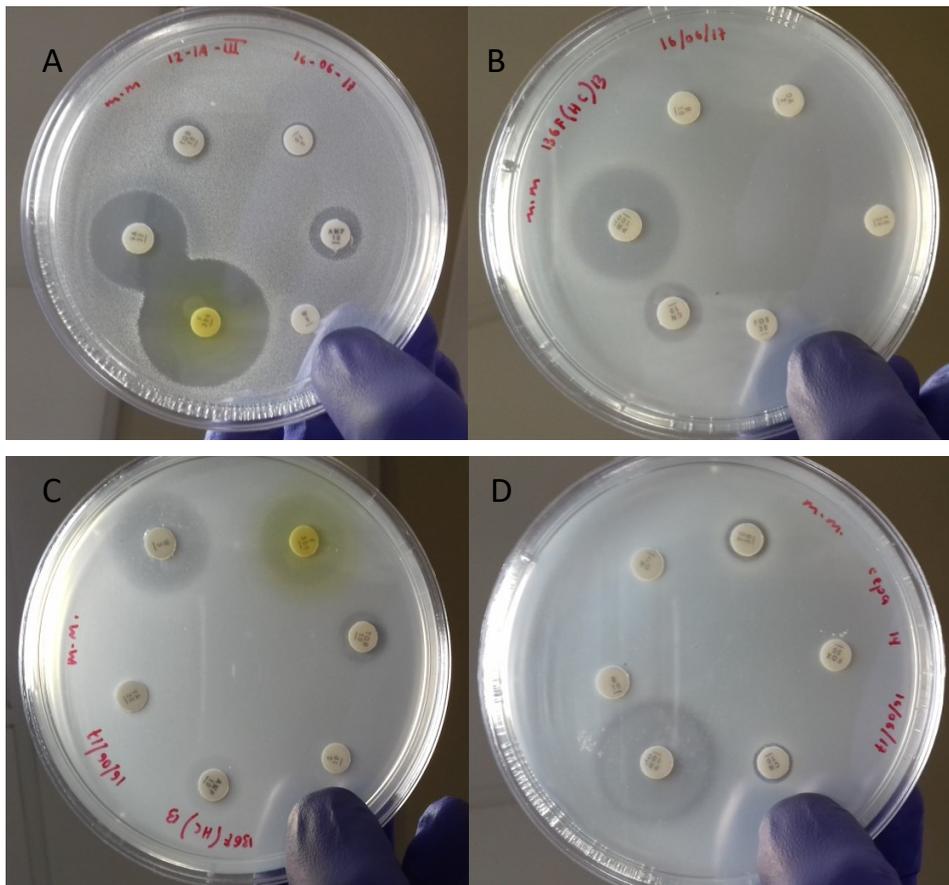


Figura 7. Halos de inhibición para algunas de las cepas bacterianas. A. *Bacillus* sp.; B - C. *Enterobacter* sp.; D. *Pseudoalteromonas* sp.

Tabla 5. Antibiograma a cepas bacterianas aisladas del Golfo de México

Antibiótico	Nomenclatura/conc entración (ug)	Cepas bacterianas					
		Cepa 14	Cepa 33	12-1A-III	B6F(HC)A	B6F(HC)B	B6F(HC)C
Tetraciclina	TE30 / 30 ug	4.5mm	4.5mm	3.5mm	5mm	R	5mm
Cloranfenicol	C30/ 30 ug	14.5mm	14mm	13mm	5.5mm	11mm	6mm
vancomicina	VA30/ 30 ug	4.5mm	4.5mm	10mm	R	R	R
Polimixina B	PB300/ 300 unid.	7.5mm	7.5mm	R	9mm	6.5mm	9.5mm
Bacitracin	B10/ 10 unid.	R	R	4.5mm	R	R	R
Eritromicina	E15/ 15 ug	10mm	10mm	7mm	R	R	R
Nitrofurantion	F300/ 300 ug	R	R	14mm	R	10mm	R
Tobramicina	TOB10/ 10 ug	3.5mm	3.5mm	5mm	R	6mm	R
Trimethoprima	W5/ 5 ug	8mm	9mm	R	R	10.5mm	R
Neomicina	N30/ 30 ug	4.5mm	4mm	6.5mm	R	5.5mm	R
Gentamicina	CN10/ 10 ug	4mm	4mm	5mm	R	6.5mm	R
Estreptomina	S10/ 10 ug	R	R	4mm	R	R	R
Ampicilina	AMP10 / 10 ug	8mm	8.5mm	6mm	R	5.5mm	R
Cefoxitina	FOX30/ 30 ug	R	R	R	R	R	R
Clindamicina	DA2/ 2 ug	R	R	9.5mm	R	R	R
Kanamicina	K30/ 30 ug	3.5mm	3.5mm	5.5mm	R	6mm	R
Piperacilina	PRL100/ 100 ug	11.5mm	10.5mm	13.5mm	R	11mm	R
Ácido nalidixico	NA30/ 30 ug	8.5mm	8mm	5.5mm	R	5.5mm	R

Cepa14= *Pseudoalteromonas* sp.

Cepa 33=*Pseudoalteromonas* sp.

12-1A-III= *Bacillus* sp.

B6F(HC)A= *Thalassospira* sp.

B6F(HC)B=*Enterobacter* sp.

B6F(HC)C=*Thalassospira* sp

8.5 Cinéticas de crecimiento de los aislamientos marinos.

En las cinéticas de crecimiento hechas en donde se comparó el medio marino con el medio marino suplementado con las diferentes fuentes de carbono, solo se obtuvo diferencias en cuanto a mayor crecimiento en el medio marino suplementado con glicerol al 4% en las cepas de *Thalassospira* sp. (Figura 8) y *Bacillus* sp. (Figura 9) a 30°C.

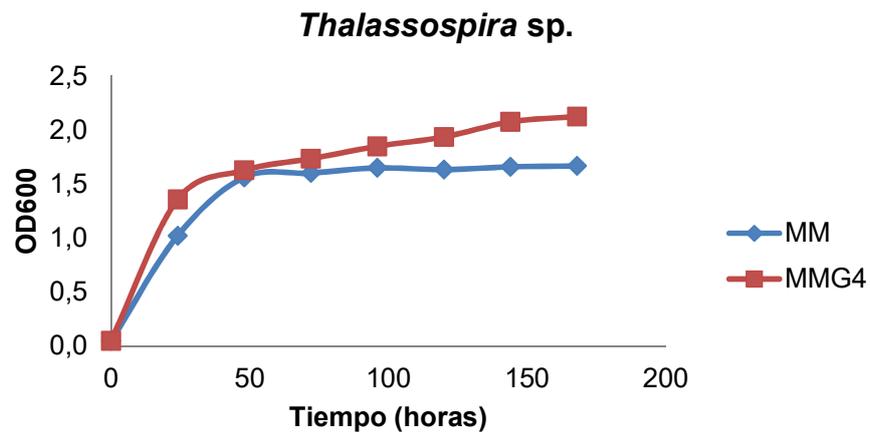


Figura 8. Cinética de crecimiento 168h *Thalassospira* sp. ♦Medio marino (MM). ■ Medio marino suplementado con glicerol al 4% (MMG4).

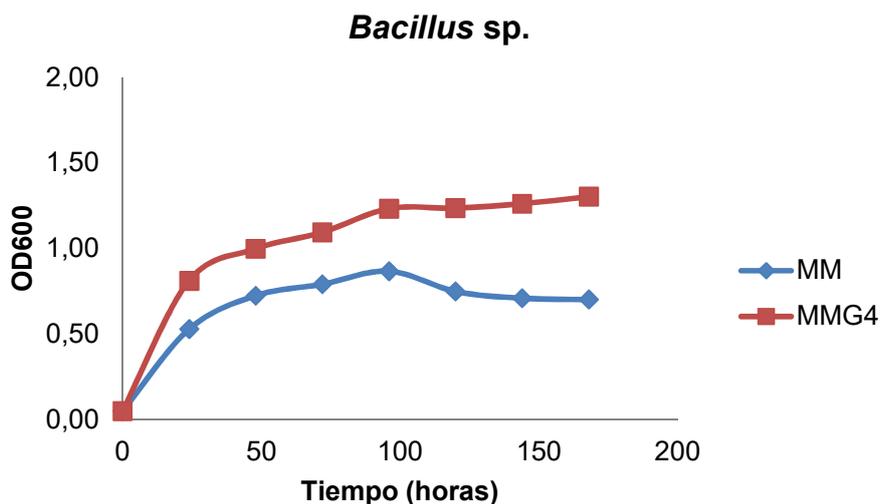


Figura 9. Cinética de crecimiento 168h *Bacillus* sp. ♦Medio marino (MM). ■ Medio marino suplementado con glicerol al 4% (MMG4).

8.6 Evaluación de actividad biosurfactante

El screening realizado en las bacterias marinas para medir la actividad biosurfactante fue evaluado mediante la capacidad emulsificante (IE_{24}), actividad hemolítica, agar CTAB y medición de la tensión superficial (Tabla 6). Donde se obtuvo para el IE_{24} a las 96 horas porcentajes de 7.4%, 9.0% y 4.0 % para las cepas de *Bacillus* sp., *Thalassospira* sp., y *Enterobacter* sp. en el MMG4 y no se obtuvo emulsión en los demás géneros bacterianos en las demás condiciones evaluadas. En la actividad hemolítica todas las cepas evaluadas presentaron un resultado positivo a excepción del género *Enterobacter* sp., siendo (β -hemolisis) los géneros de *Pseudoalteromonas* sp., y el género *Bacillus* sp., y (α -hemolisis) el género de *Thalassospira* sp. En el agar CTAB solo fue positivo para el género *Enterobacter* sp. y no hubo reducción de la tensión superficial en ninguna de las cepas bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 6. Screening de actividad biosurfactante en bacterias marinas.

Aislamiento	% IE_{24} (96 horas)						Actividad hemolítica	CTAB	Tensión superficial
	MM	MMG4	MMK1	MMK4	MMH1	MMH4			
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.(14)	-	-	-	-	-	-	(β -hemolisis)	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.(33)	-	-	-	-	-	-	(β -hemolisis)	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	-	7.4	-	-	-	-	(β -hemolisis)	-	-
<i>Thalassospira</i> sp	-	9.0	-	-	-	-	(α -hemolisis)	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	4.0	-	-	-	-	-	+	-
<i>Thalassospira</i> sp.	-	3.0	-	-	-	-	(α -hemolisis)	-	-

Los resultados obtenidos del screening para la evaluación de la actividad biosurfactante en las cepas con los medios marinos suplementados con las diferentes fuentes de carbono, muestran que con el medio MMG4 se promueve mayor emulsión para las cepas *Thalassospira* sp y *Bacillus* sp.

Con el fin de evaluar el porcentaje de IE₂₄ comparando los medios MM con MMG4 a diferentes tiempos hasta 168 horas en las cepas *Thalassospira* sp y *Bacillus* sp. se realizaron curvas de porcentaje de IE₂₄ y se observó que la cepa *Thalassospira* sp. en medio MMG4 tiene un porcentaje de IE₂₄ del 30% el doble comparado con el medio MM que fue del 15% (Figura 10). En la cepa *Bacillus* sp., se obtuvo solo en el medio MMG4 un porcentaje de IE₂₄ de 40% (Figura 11).

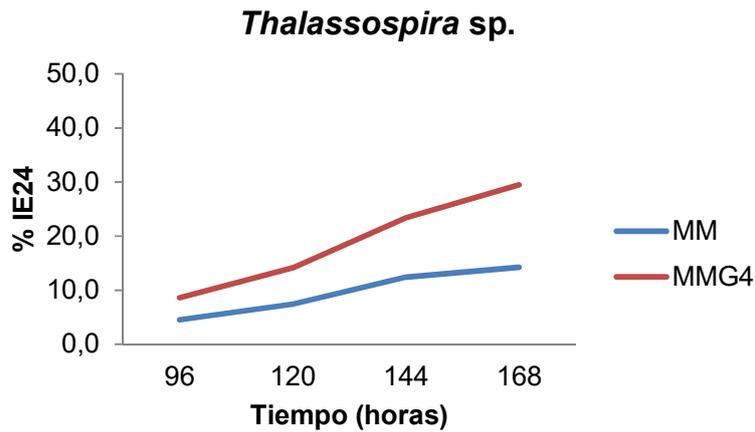


Figura 10. Índice de Emulsión (IE₂₄) para la cepa *Thalassospira* sp. a diferentes horas de la cinética de crecimiento de 168 h.

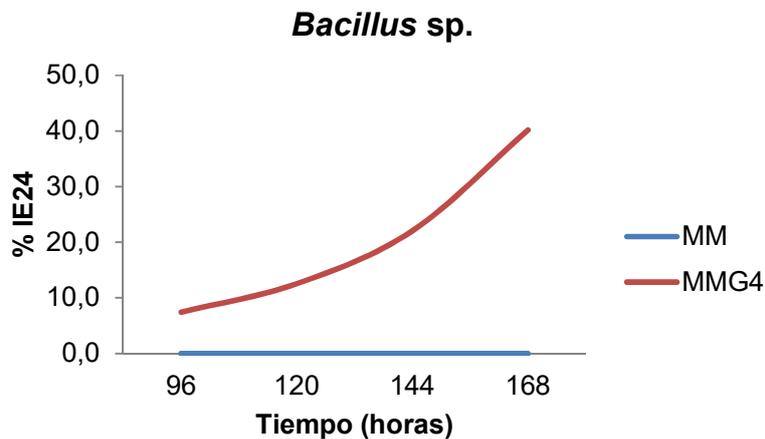


Figura 11. Índice de Emulsión (IE₂₄) para la cepa *Bacillus* sp. a diferentes horas de la cinética de crecimiento de 168 h.

8.7 Evaluación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes mediante la amplificación por PCR

Una vez obtenidas las secuencias de los genomas de las bacterias marinas trabajadas, a estas se les hizo un trabajo de minería en donde las secuencias fueron limpiadas, posteriormente se hizo el ensamblaje de cada genoma mediante el programa velvet y la anotación utilizando el programa Blast2GO. A continuación (Tabla 7) observamos algunas características de los genomas ensamblados.

Tabla 7. Características de los genomas ensamblados de las cepas marinas.

Cepa	Tamaño (Mb)	Contigs	Bases (pb)	tRNA	CDS
<i>Thalassospira</i> sp.	4.6	42	4782190	52	4437
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (2)	3.4	51	3503840	53	3123
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (14)	3.3	72	3464581	55	3064
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (33)	3.7	44	3865828	42	3459
<i>Enterobacter</i> sp.	4.8	118	5034410	64	4739

Una vez se tienen los ensamblajes para cada genoma se realizó análisis mediante el software gratuito antiSMASH (Medema *et al.*, 2011), el cual es un software que analiza cluster de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start> esto con el fin de evaluar si existía algún cluster de genes relacionados con biosurfactantes, en la (Tabla 8) observamos un resumen de los cluster de genes encontrados utilizando el antiSMASH. Utilizando este software no se encontraron cluster de genes relacionados con la biosíntesis de biosurfactantes, sin embargo se identificaron otros cluster de genes involucrados en otras actividades de interés.

Tabla 8. Análisis antiSMASH para los genomas secuenciados.

Cepa	Cluster de Genes									
	Cf_ put ativ e	Cf_fatty_ acid	Cf_ sacchar ide	T1pk- Arylpoly ene Nrps	Ter pen o	Ecto ina	Bact erici n	Nrps	Sideroforos	Thiopepti do
<i>Thalassospira</i> sp.	14	2	4	1	2	1	1	-	-	-
<i>Pseudoalterom onas</i> sp. (2)	12	1	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudoalterom onas</i> sp. (14)	13	2	1	1	-	-	1	-	-	-
<i>Pseudoalterom onas</i> sp. (33)	12	2	1	1	-	-	1	-	-	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	11	2	3	-	-	-	-	1	1	1

Se evaluó además la anotación de los genomas mediante el programa Artemis con el fin de buscar genes que estuvieran implicados en la biosíntesis de biosurfactantes encontrando que en el genoma de *Thalassospira* sp. había un gen relacionado con la biosíntesis del biosurfactante plipastatina el cual es el siguiente >B6FA1_00007 Plipastatin synthase subunit D (ppsD) el cual tiene un tamaño de 2727 nt (Figura 12) un poco más pequeño en comparación con el encontrado en *Bacillus subtilis* al realizarle un Blast protein a este gen encontrado, contra los genes en *Bacillus subtilis* se encontró una identidad del 45% en la secuencia con una cobertura del 70%. En la figura 13. Se muestra de forma esquemática el operon de la plipastatina en *Bacillus subtilis* y se indica con un círculo el gen encontrado en el genoma de la *Thalassospira* sp

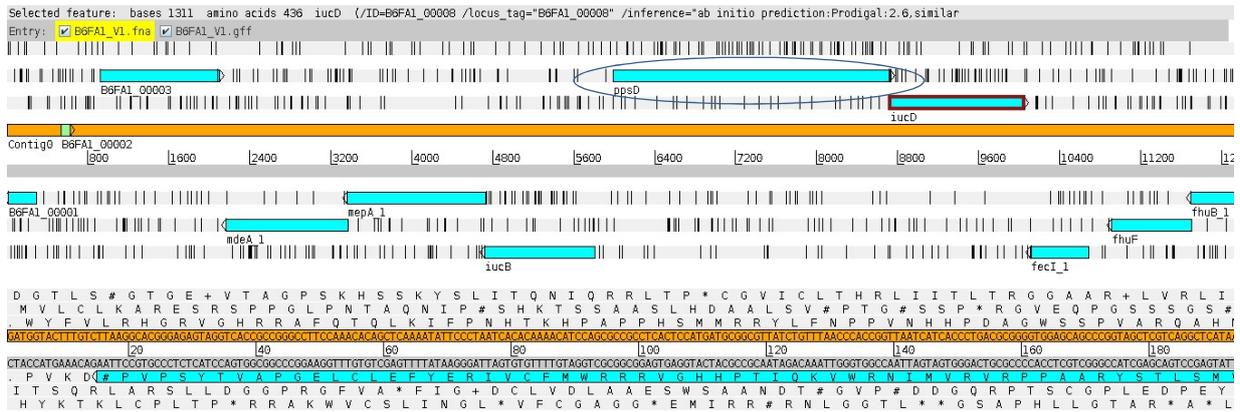


Figura 12. Gen *ppsD* implicado posiblemente en la biosíntesis de la plipastatina identificado en la anotación del genoma de *Thalassospira* sp utilizando el programa Artemis (Carver *et al.*, 2012).

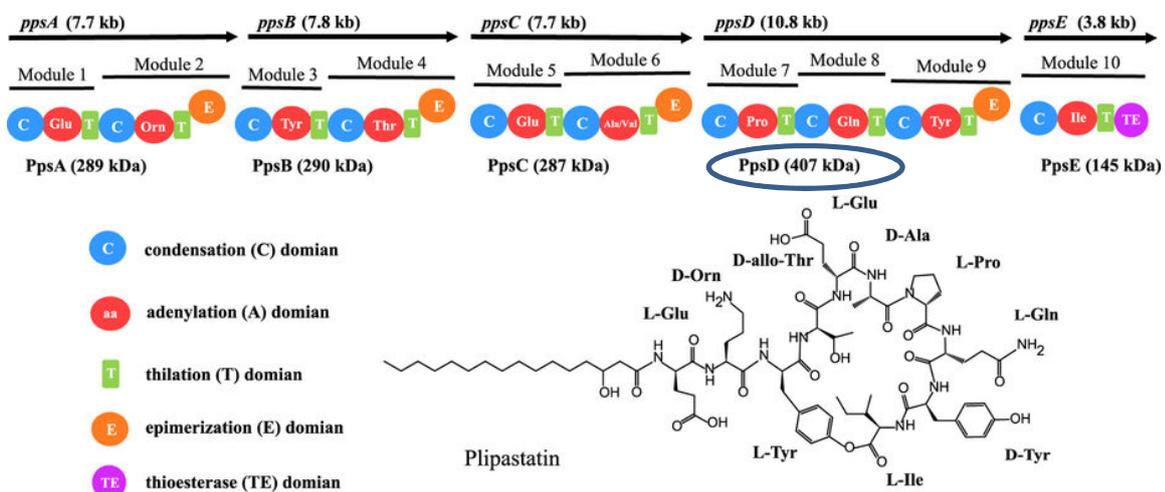


Figura 13. Operon para la biosíntesis de la plipastatina encontrado en *Bacillus subtilis*

Se diseñaron oligonucleótidos a partir de la región de adenilación (encargada de seleccionar y activar el próximo aminoácido en el operon) del gen *ppsD* identificado en el genoma de la cepa de *Thalassospira* sp. También se diseñaron oligonucleótidos de los genes *gyrB* y *rpoD* utilizados como genes normalizadores en qPCR (Tabla 9).

Tabla 9. Oligonucleotidos para la amplificación en qPCR

Target Gene	Forward /Reverse	Sequence (5´-3´)	Primer name	Target size (bp)
<i>ppsD</i>	F R	TTGGCCGGTTGGTTACGTGA TAACCCGCCATAACATTGGG	ppsDFor ppsDRe	178
<i>gyrB</i>	F R	GCTGGAACCTCAGAACCGACA CCCGAGGTTTCATACGCCTT	gyrBq F1 gyrBq R1	162
<i>rpoD</i>	F R	ACTGACCGAGCAGGTTCTTG GTCAACCATCTCGCCCTTCA	rpoDq Nu F1 rpoDq Nu R1	160

Los genes *ppsD*, *gyrB* y *rpoD*, amplificados con los oligonucleótidos (ppsDFor – ppsDRe), (gyrBq F1- gyrBq R1) y (rpoDq F1- rpoDq R1) dieron los productos esperados de 178 pb , 162 pb y 160 pb como se observa en las Figuras 14-16.



Figura 14. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *ppsD*. Carril 1: marcador de peso molecular GENE RULER 1 Kb; carril 2: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *ppsD*; carril 3: blanco de reacción.

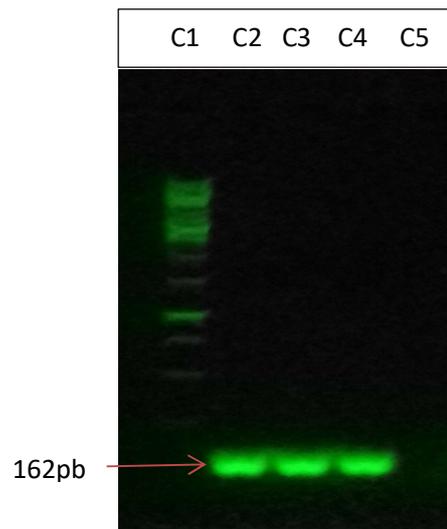


Figura 15. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *gyrB*. Carril 1: marcador de peso molecular GENE RULER 1 Kb; carril 2: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 57°C ; carril 3: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 60°C ; carril 4: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 63°C ; carril 5: blanco de reacción

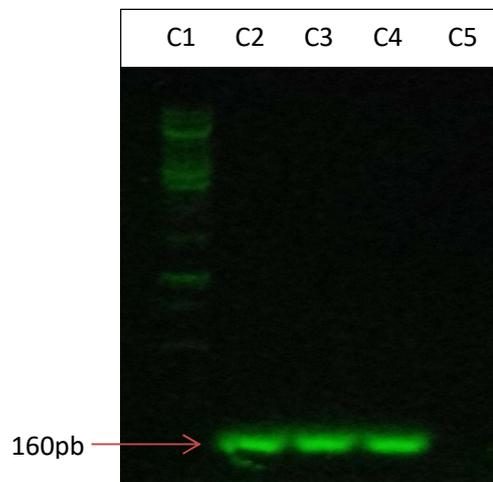


Figura 16. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *rpoD*. Carril 1: marcador de peso molecular GENE RULER 1 Kb; carril 2: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 57°C ; carril 3: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 60°C ; carril 4: Producto de PCR B6F(HC)A (*Thalassospira* sp.) fragmento del gen *gyrB* 63°C ; carril 5: blanco de reacción

8.8. Validación de la expresión de los genes amplificados mediante la técnica de REAL-TIME PCR (qPCR)

8.8.1 Estandarización de la REAL- TIME PCR (qPCR)

Una de las ventajas que presenta el trabajo de Tiempo Real es que no hay necesidad de visualizar el producto en agarosa debido a que este equipo posee un software que analiza los resultados y arroja una gráfica de amplificación que es la que me dice si las muestras amplificaron o no, posteriormente esta grafica se respalda mediante la curva melting que es la que me indica si el producto amplificado corresponde a el amplicón esperado o hay algún tipo de contaminación.

En los análisis mostrados de la curva melting para el fragmento del gen *ppsD* se puede determinar que el pico de temperatura melting tiene un rango que varía entre 80-83

En la figura 17, se observa la curva de amplificación correspondiente al producto obtenido con los iniciadores *ppsDFor* - *ppsDRe* correspondiente a un fragmento del gen *ppsD* y en la figura 18 , se observa la curva melting que valida la técnica y confirma que las amplificaciones corresponden a el fragmento del gen *ppsD* estudiado.

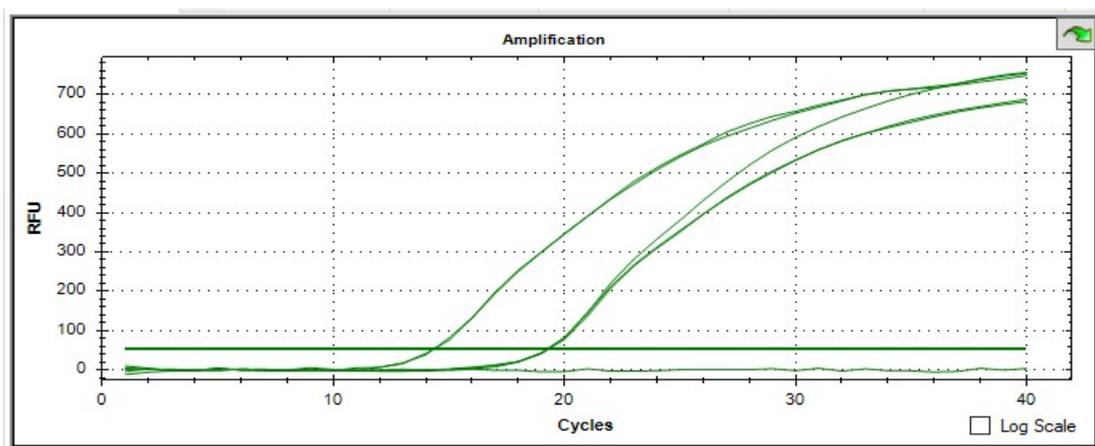


Figura 17. Curva de amplificación para el fragmento del gen *ppsD*

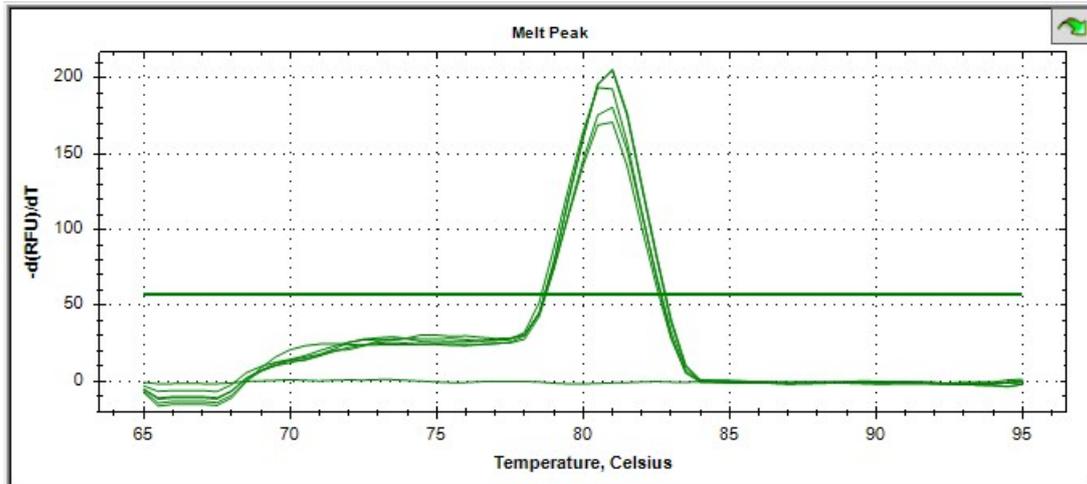


Figura 18. Curva melting para el fragmento del gen *ppsD*.

8.8.2 Análisis de la expresión de los genes identificados

Una vez estandarizada la técnica de qPCR, se evaluó la expresión del gen *ppsD*, en los diferentes periodos de tiempo seleccionados en la cinética de crecimiento, utilizando como genes normalizadores a *gyrB* y *rpoD* siendo el *gyrB* el gen escogido como normalizador debido a que mantuvo su amplificación constante en todas las réplicas en ambos tratamientos. La técnica de cuantificación usada para analizar los datos fue el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ reportada por Livak, 2001.

La gráfica de expresión obtenida para el gen evaluado se observa en la Figura 19.

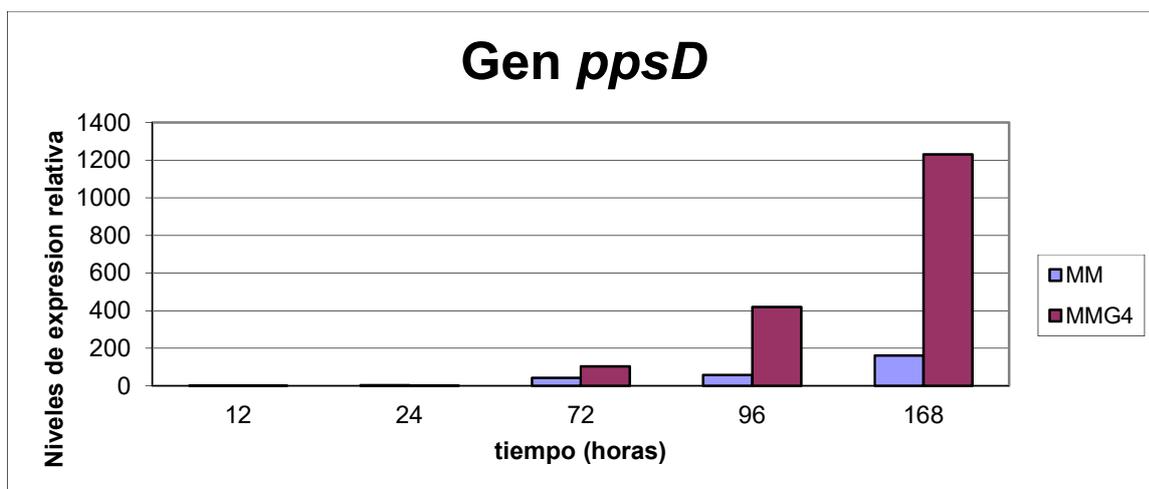


Figura 19. Niveles de expresión del gen *ppsD* por qPCR

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Los ecosistemas marinos se han convertido en una de las mayores fuentes de explotación de compuestos de gran valor para la industria y otros campos como el ambiental, farmacéutico y alimentario entre otros, debido a que existen microorganismos ubicuos que son capaces de sintetizar estos componentes, debido a que las condiciones en el mar (pH, salinidad y temperatura) son muy variables y en momentos extremas dependiendo de la zona donde se encuentren (Shekhar *et al.*, 2015) y esto hace que estos microorganismos se vean obligados a realizar cambios a nivel fisiológicos para sobrevivir a su vez que realizan síntesis de metabolitos. En particular en el área de biotecnología ambiental la búsqueda e identificación de nuevos y mejores metabolitos entre ellos los BS de estas fuentes marinas ha sido muy activa, como por ejemplo la identificación de la bacteria *Alcanivorax borkumensis* capaz de degradar hidrocarburos y producir BS (Yakimov *et al.*, 1998), y de géneros como *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Myroides*, *Bacillus* sp. productores de BS (Satpute *et al.*, 2010). El potencial es muy amplio debido a la abundancia de bacterias en el ambiente marino tanto en la zona pelágica como en la béntica. Sin embargo a pesar que los datos metagenómicos reflejan esa riqueza, a nivel de laboratorio se han aislado de forma cultivable menos del 1% de las bacterias. Lo que indica el potencial que aún tiene ese ambiente en la búsqueda de nuevos BS.

En este trabajo se recolectaron muestras tanto de sedimento como de la columna agua del Golfo de México con la finalidad de aislar bacterias productoras de BS. en donde ya por estudios metagenómicos se ha observado una gran diversidad de microorganismos, como por ejemplo en el lado norte del golfo se han observado algunos géneros abundantes entre los cuales se destacan *Erythrobacter*, *Rhodovulum*, *Stappia*, *Thalassospira*, entre otros que hacen parte de las Alphaproteobacterias, *Ralstonia* de las Betaproteobacterias, y *Saccharophagus degradans* de las Gammaproteobacteria, que pueden llegar a degradar pequeños aromáticos y además de degradar celulosa y otros compuestos (Liu Z, and Liu J., 2013), mientras que en el lado sur del golfo las clases más abundantes son las Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Clostridia, Nitrospira, Phycisphaera y Actinobacteria. (Godoy- Lozano *et al.*, 2018). En una primera etapa de aislamiento se obtuvieron bacterias cultivables con potencial productor de BS, por los resultados preliminares con ensayos específicos para BS, entre las cuales se destacan los géneros de *Bacillus*, *Enterobacter* y *Thalassospira* los cuales son géneros que han sido

observados anteriormente mediante análisis metagenómicos en el golfo de México, pero que en el caso del género *thalassospira* sp. es el primer reporte de aislado además de ser identificada su actividad BS, para la parte sur del golfo de México.

Se sabe que la calidad y productividad de los BS están determinadas por la cepa bacteriana y sus condiciones de crecimiento, siendo factores muy importantes la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH, temperatura, salinidad, y agitación. En este trabajo evaluamos distintas fuentes de carbono entre las cuales se encontraban el hexadecano 1%, kerosene 1% y glicerol 4%, observando que la fuente de carbono que aumentaba la producción de los BS era el glicerol a una concentración del 4%, lo cual se ha visto también en otros trabajos que utilizan otros modelos bacterianos y observan que la mayor producción de los BS es utilizando una concentración del 3% (Putri. M and Hertadi R. 2015; Silva *et al.*, 2010) la utilización del glicerol para aumentar la producción de BS puede deberse a la facilidad de incorporarse a rutas metabólicas que con llevan a la biosíntesis de BS, en este caso se incorporan a rutas que llevan a la formación de la parte hidrofóbica del BS (Santos *et al.*, 2016).

Una vez identificada la actividad BS en el aislado de *Thalassospira* sp. se buscaron los genes involucrados en la biosíntesis del biosurfactante, para esto se llevaron a cabo varias estrategias, siendo la secuenciación y anotación del genoma de esta bacteria la que nos dejaría ver el gen (*ppsD*) relacionado con la biosíntesis de la plipastatina la cual es un lipopéptido de carácter no ribosomal identificado por primera vez en *Bacillus subtilis* strain 168. Este gen se ha visto que es muy importante en la producción de la plipastatina ya que una mutación de este gen en el operon causa inmediatamente una baja producción del compuesto (Batool *et al.*, 2011)

En este trabajo se observó que la expresión del gen *ppsD* implicado en la biosíntesis de la plipastatina empezaba cuando ya finalizaba la fase estacionaria temprana (96 h) y tenía su pico máximo de expresión siendo de 8 veces mayor en el medio marino con glicerol 4% comparado con el medio marino, durante la fase estacionaria tardía (168 h); comparado con el trabajo de *Burkholderia thailandensis* E264 (Funston *et al.*, 2016) donde evalúan la expresión de los genes implicados en biosíntesis de ramnolipidos, se observa lo mismo que observamos en nuestro trabajo, que estos genes tienen también su expresión máxima en la fase estacionaria tardía correlacionándose esto con lo que se observa normalmente en algunos microorganismos que es la formación de metabolitos secundarios en esta etapa de su crecimiento.

10. CONCLUSIONES

- El uso de glicerol como fuente de carbono suplementaria a una concentración del 4 % incrementa la actividad biosurfactante en comparación con el medio marino.
- En el análisis del genoma de *Thalassospira* sp. se identificó el gen >B6FA1_00007 anotado como Plipastatin synthase subunit D (*ppsD*) con un tamaño de 2727 nt, el cual está relacionado con la biosíntesis del biosurfactante plipastatina, descrito anteriormente en *Bacillus subtilis*.
- En el intervalo de tiempo evaluado hay un pico máximo de expresión a las 168 h, del gen *ppsD* siendo de 8 veces en el medio marino con glicerol 4% comparado con el medio marino.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el gen *ppsD* mediante expresión heteróloga con el fin de corroborar su actividad biosurfactante.
- Obtención y purificación de la molécula plipastatina.

12. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mawgoud, A.M.; Lépine, F.; Deziel, E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323–1336.
- Amalesh S, Pinski P, Anupam M, Chandrima S, Asif L, Das M. (2012). Estimation of biosurfactants activity of Alkaline protease producing bacteria isolated from municipal solid waste. *Cent Europ J of Exper Bio.* 1:26-35.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 427–444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Batool, M., Khalid, M. H., Hassan, M. N., & Fauzia Yusuf, H. (2011). Homology modeling of an antifungal metabolite plipastatin synthase from the *Bacillus subtilis* 168. *Bioinformation*, 7(8), 384-7.
- Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31.
- Bodour, A.; Drees, K.; Maier, R. (2003). Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6): 3280-3287.
- Bognolo, G.(1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 152, 41–52.
- Camilios, D.; Meira, J.; de Araújo, J.; Mitchell, D.; Krieger, N. (2008). Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(3): 441-448

- Camilli, R., Reddy, C.M., Yoerger, D.R., VanMooy, B.A.S., Jakuba, M.V., Kinsey, J.C., et al. (2010). Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at Deep water horizon. *Science* 330, 201–204. doi:10.1126/science.1195223
- Carvalho, C.C.; Fernandes, P. (2010). Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Mar. Drugs* 8, 705–727.
- Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: An integrated platform for visualisation and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics.*, 28 (4): 464-469. 10.1093/bioinformatics/btr703.
- Chakrabarti, S. (2012) Bacterial Biosurfactant: Characterization, Antimicrobial and Metal Remediation Properties. Ph.D. Thesis, National Institute of Technology, Surat, India, March
- Costa, S.; Nitschke, M.; Haddad, R.; Eberlin, M.; Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochem* 41:483–488.
- Cortés-Camargo, S.; Barragán-Huerta, B. (2013). Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales* 6(1): 1-8.
- Devi, N. K., Rajendran, R., & Sundaram, S. K. (2011). Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bertolini, V., Raimondi, C., Piscitello, M., Papacchini, M., Bestetti, G. (2011). Phylogenetic characterization of bioemulsifier-producing bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65, 1095-1099.
- Gautam, K.K.; Tyagi, V.K. (2006) Microbial Surfactants: A review. *J. Oleo Sci.*, 55, 155–166.
- Gharaei-Fathabad E. (2011) Biosurfactants in pharmaceutical industry: A Mini – Review. *Ame J Dr Discov and Dev.*;1(1):58-69.

- Godoy-Lozano, E. E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R. M., Juarez, K., Segovia, L., Licea-Navarro, A. F., Gracia, A., Sanchez-Flores, A., ... Pardo-Lopez, L. (2018). Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology*, 9, 2528.
- Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., (2010). Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. *Science* 330, 204–208. doi:10.1126/science.1195979
- Hewitt, J. E., Thrush, S. F., & Dayton, P. D. (2008). Habitat variation, species diversity and ecological functioning in a marine system. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366(1), 116-122.
- Jackson, S.A., Borchert, E., O’Gara, F., and Dobson, A.D.W. (2015). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. *Curr Opin Biotechnol* 33: 176–182.
- Jacques, P. (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In *Biosurfactants: From Genes to Applications* ed. Soberon-Chavez, G. pp. 57–93. Berlin Heidelberg: Springer, Microbiology Monographs vol. 20.
- Lamendella, R., Strutt, S., Borglin, S., Chakraborty, R., Tas, N., Mason, O. U., ... Jansson, J. K. (2014). Assessment of the Deepwater Horizon oil spill impact on Gulf coast microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 5, 130.
- Lang, S.(2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.*, 7, 12–20.
- Lara-Lara, J.R.; Fuentes V.A; Guzman,C.B ;Castañeda , V.D;Briones, E.E (2008) Los ecosistemas marinos, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 135-159

- Liu Z, Liu J. (2013). Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. *Microbiologyopen* 2: 715
- Maier, R. M. (2003). Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Advances in applied microbiology*, 52, 101-121.
- Maier, R.; Soberón-Chávez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential environmental applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 54: 625-633.
- Maneerat, S. (2005). Biosurfactants from marine microorganisms. *Songklanakarin J Sci Technol*, 27(6), 1263-1272.
- Marchant R, Banat I (2012) Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett* 34(9):1597–1605. doi:10.1007/s10529-012-0956-x
- Mason, O.U., Hazen, T.C., Borglin, S., Chain, P.S.G., Dubinsky, E.A., Fortney, J.L., (2012). Meta genome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deep wáter Horizon oil spill. *ISME J.* 6, 1715–1727 doi: 10.1038/ismej.2012.59
- Medema M.H. Blin K. Cimermancic P. De Jager V. Zakrzewski P. Fischbach M.A. Weber T. Takano E. Breitling R. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences *Nucleic Acids Res.* Vol 39 W339 - W346
- McDonald IR, Guinasso NL Jr, Ackleson SG, Amos JF, Duckwort R, Sassen R, Brooks JM, (1993) Natural oil slicks in the Gulf of Mexico visible from space. *J. Geophys. Res.* 98: 16351-16364.
- Monreal Gómez, M.A. y D.A. Salas de León. (1997). Circulación y estructura termohalina del Golfo de México, en M.F. Lavín (ed.), *Contribuciones a la oceanografía física en México. Monografía 3. Unión Geofísica Mexicana, México*, pp. 183-199

- Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK.(2008) Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Cur Sci.*; 94:736-774.
- Nitschke M., and Costa, S.G.V.A.O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in food science and technology.* 18, 252-259.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19787-19795.
- Płaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K., & Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 1023-1034.
- Porob, S., Nayak, S., Fernandes, A., Padmanabhan, P., Patil, B. A., Meena, R. M., & Ramaiah, N. (2013). PCR screening for the surfactin (sfp) gene in marine *Bacillus* strains and its molecular characterization from *Bacillus tequilensis* NIOS11. *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 212-221.
- Putri M, Hertadi R. (2015) Effect of glycerol as carbon source for biosurfactant production by halophilic bacteria *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12 *Procedia Chem.*, 16, pp. 321-327
- Ramkrishna, S. (1997). Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 68, 263-270.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira G, & Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chem* 57: 609–618.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.

- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., & Chopade, B.A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology advances*, 28 4, 436-50 .
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265-268.
- Silva S.N.R.L., Farias C.B.B, Rufino R.D, Luna J.M., Sarubbo L.A. (2010) Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 79, pp. 174-183
- Shah, N., Nikam, R., Gaikwad, S., Sapre, V., & Kaur, J. (2016). Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3(1), 5-10.
- Shekhar, S.; Sundaramanickam, A.; Balasubramanian, T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1522–1554.
- Soto, I.A.; Sánchez García, S.; López Veneroni, D. (2004) Ambientes influidos por emanaciones naturales de hidrocarburos y gas en el suroeste del Golfo de México *Universidad y Ciencia*, vol. num. esp., núm., pp. 51-58
- Thies, S., Santiago-Schübel, B., Kovačić, F., Rosenau, F., Hausmann, R., Jaeger, K.E., (2014) Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 181: 27–30.
- Vijayakumar, S.; Saravanan, V.(2015) Biosurfactants-types, sources and applications. *Res. J. Microbiol.*, 10,181–192.

- Yañez-Ocampo, G.; Wong-Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *Bio Tecnología* 17(3): 12-28.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W., Luensdorf, H., & Timmis, K.N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 2, 339-48 .
- Wiseman, W.J., y W. Sturges. (1999). Physical oceanography of the Gulf of Mexico: Processes that regulate its biology, en H. Kumpf, K. Steidinger y K. Sherman (eds.), *The Gulf of Mexico large marine ecosystem: Assessment, sustainability, and management*. Blackwell Science, Malden, pp. 77-91

13. ANEXOS

Anexo 1. Tinción de Gram

La tinción de Gram involucró los siguientes pasos (Rodríguez *et al.*, 2005):

1. Tinción inicial. Las células se tiñeron con cristal violeta, el cual es el colorante primario. En este paso todas las células se tiñen de morado (1min). Posteriormente se realizaron lavados con agua.
2. Mordente. Se adicionó yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado (1 min). Posteriormente se realizaron lavados con agua.
3. Decoloración. Se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras. Este es el paso crítico de la tinción, pues si se exagera, decolora las Gram positivas y si se hace muy débil no decolora las Gram negativas (30 seg). Posteriormente se realizaron lavados con agua.
4. Contratinción. Se vuelve a teñir con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado a fucsia según el colorante empleado; en tanto, las bacterias Gram positivas no se afectan con la contratinción y permanecen moradas debido a lo intenso de esta coloración (2 min). Posteriormente se realizaron lavados con agua.

Anexo 2. Quick-gDNA™ Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH)

- 1.** Adicionar 4 volúmenes de **Genomic Lysis Buffer** para cada volumen de cultivo líquido (4:1). (eg. Adicionar 800 ul de Genomic Lysis Buffer a 200 ul de cultivo líquido). Mezclar brevemente por vortex, luego dejar reposar a temperatura ambiente por 5 – 10 minutos.
- 2.** Transferir la mezcla a **Zymo-Spin™ Column** que está contenida en un tubo de colección. Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se descarta el sobrenadante presente en el tubo de colección.
- 3.** Transferir la Zymo-Spin™ Column a un nuevo tubo de colección, y adicionar 200 ul de **DNA Pre-Wash Buffer** a la spin columna. Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto.
- 4.** Adicionar 50 ul de **g-DNA Wash Buffer** a la spin columna. Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto.
- 5.** Transferir la spin columna a un nuevo tubo de 1.5 ml. Adicionar $\geq 50 \mu\text{l}$ **DNA Elution Buffer o Agua Ultrapura** a la spin columna. Incubar de 2 -5 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugar por 45 segundos a 10000 rpm con el fin de eluir el DNA. El DNA eluido puede ser usado inmediatamente o ser guardado a -20°C hasta su futuro uso.

Anexo 3. Protocolo para extracción de RNA (QIAGEN modificado)

1. Agregar un volumen de RNALater equivalente al 10 % del volumen del cultivo bacteriano, una vez agregado se coloca en agitación por 5 minutos.
2. Centrifugar el cultivo bacteriano a 6000 x g por 8 minutos a 4°C (No usar más del 1×10^9 de bacteria) descartar el sobrenadante; y remover cuidadosamente cualquier resto de medio de cultivo utilizando una micropipeta si es necesario.
3. Una vez obtenido el pellet se adiciona un volumen apropiado de Buffer RLT* (700 ul a 5×10^9 de bacteria o 350 ul a $< 5 \times 10^8$ de bacteria), homogenizar con pipeta y luego dar vortex vigoroso de 5 a 10 segundos, una vez homogéneo se pasa esta mezcla a los tubos que contienen perlas de óxido de zirconio equivalente al pellet homogenizado.
4. Luego se adiciona a esta suspensión un volumen de 200 ul (lisozima + Tris/EDTA) e incubar 5 minutos en frío (hielo).
5. Transferir los tubos que contienen la suspensión de aproximadamente 900 ul y las perlas de óxido de zirconio al equipo utilizado para lisar tejidos (Bullet Bender Storm 24) por 5 minutos a su máxima velocidad.
6. Centrifugar por 10 segundos a 13.000 rpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml
7. **(Paso crítico)** Determinar el volumen del sobrenadante (vol. Aprox. 700 ul). Adicionar un volumen igual de etanol al 70%, y mezclar suavemente por pipeteo. No centrifugar. En este paso se coloca a descongelar la DNase I.
8. Transferir 700 ul del lisado , incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado a las RNeasy spin columna que se encuentra en un tubo de colección de 2 ml. Cerrar la tapa muy suavemente y centrifugar por 15 segundos a 10000 rpm , descartar el sobrenadante (Centrifugar 2 veces dependiendo de la cantidad de sobrenadante obtenido en el paso anterior).
9. Adicionar 350 ul del Buffer RW1 en la RNeasy spin columna. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar por 15 segundos a 10000 rpm para lavar la membrana de la spin columna. Descartar el sobrenadante.
10. **(Cambiar guantes)** Adicionar 10 ul de DNase I solución stock, a 70 ul de buffer RDD, mezclar gentilmente por inversión del tubo o también mezclando suavemente por pipeteo y si es necesario realizar un spin para bajar todo el contenido que pueda quedar en las paredes del tubo.

11. Adicionar la mezcla de DNase I obtenida en el paso anterior (80 ul) directamente en la membrana RNeasy spin column y cerrar suavemente, luego se coloca sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente por 25 minutos.
12. Adicionar 350 ul de Buffer RW1 a la RNeasy spin column. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar por 15 segundos a 10000 rpm, Descartar el sobrenadante.
13. Adicionar 500 ul del Buffer RPE a la RNeasy spin column. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar por 15 segundos a 10000 rpm para lavar la membrana de la spin column. Descartar el sobrenadante.
14. Adicionar 500 ul del Buffer RPE a la RNeasy spin column. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar por 2 minutos a 10000 rpm para lavar la membrana de la spin column.
15. Colocar la RNeasy spin column en un tubo nuevo de colección de 2 ml y descartar el tubo anterior con todo el sobrenadante obtenido. Cerrar la tapa suavemente, y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
16. **(Cambiar guantes)** Colocar la RNeasy spin column en un nuevo tubo de colección de 1.5 ml. Adicionar 30- 50 ul de RNase Free agua directamente sobre la membrana de la spin column. Cerrar la tapa suavemente , esperar 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 10000 rpm para eluir el RNA obtenido.
17. Cuantificar la concentración de las muestras obtenidas por nanodrop, y determinar la integridad del RNA obtenido por el bioanalyzer.

PUNTOS A TENER EN CUENTA ANTES DE COMENZAR LA EXTRACCION DE RNA

- Los pellets bacterianos pueden almacenarse a -70 ° C para su uso posterior o utilizarse directamente en el procedimiento
- Adicionar 10 ul de B- mercaptoethanol (B-ME) por cada 1 ml de Buffer RLT, y mezclar, una vez preparado sellarlo correctamente. Buffer RLT que contiene B- ME puede ser guardado a temperatura ambiente por hasta 1 mes. Este buffer antes de ser utilizado se **calienta a 60°C** paso opcional.
- Preparar soluciones stock de 10 ul de DNase I en tubos estériles de 1.5 ml.
- Si se realiza la opción de una primera lisis celular, se resuspende el pellet en 200 ul de lisozima recién preparada (20mg/ml in Tris/EDTA), e incubar 5 minutos en frio.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 de Mayo del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal)
Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández
Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN BACTERIAS MARINAS

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRÉS DURÁN JARAMILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 de Mayo del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal)
Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández
Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN BACTERIAS MARINAS

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRÉS DURÁN JARAMILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 de Mayo del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal)
Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández
Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN BACTERIAS MARINAS

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRÉS DURÁN JARAMILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 de Mayo del 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal)
Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández
Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN BACTERIAS MARINAS

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRÉS DURÁN JARAMILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 13 de Mayo del 2019.

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (Tutor principal)
Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Co Tutor)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández
Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Tesis: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE BIOSURFACTANTES EN BACTERIAS MARINAS

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRÉS DURÁN JARAMILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. MARCO ANTONIO ROGEL HERNÁNDEZ