

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE  
UN RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGMo1 AISLADA  
DEL GOLFO DE MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

NIDYA FABIOLA CURIEL MACIEL

ASESOR: MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CO-ASESOR: FERNANDO MARTÍNEZ MORALES

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2020

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Bajo la dirección de la Dra. María del Refugio Trejo Hernández y la co-tutoría del Dr. Fernando Martínez Morales.

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

## **COMITÉ REVISOR**

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

### **Director de Tesis**

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

### **Co-Director de Tesis**

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB-UAEM)

Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama (CIQ-UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT-UNAM)

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (CIQ-UAEM)

Dr. Marco Antonio Rogel Hernández (CCG-UNAM)

## **Agradecimientos**

Agradezco en el ámbito científico la oportunidad para realizar mis estudios de doctorado a la Dra. María Del Refugio Trejo Hernández y al Dr. Fernando Martínez Morales. Por la paciencia, comprensión y guía que me han brindado para la conclusión de este proyecto.

Mis agradecimientos también van dirigido a los integrantes del comité tutorial quienes con su experiencia me apoyaron en la realización de este proyecto. Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama, por su apoyo en la elucidación de la estructura química, Dr. Luis Caspeta Guadarrama por su apoyo en la parte de producción, Dr. Alexander Cardoso Taketa por su apoyo en la caracterización del producto obtenido.

El agradecimiento para el Dr. Jesús Silva Sánchez y la M.C. Margarita Sánchez Arias del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud pública. A demás a Lourdes Martínez Aguilar del laboratorio de Ecología Genómica CCG-UNAM. Al L.I Victor Martínez Valdez, a la Biól. Fernanda Cristina Barrera. De igual manera al CONACYT (No de becario CVU713861).

## *Agradecimientos*

Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma. Pedro Emmanuel gracias por creer siempre en mí, por tu amor, por apoyarme, por estar a mi lado en los momentos difíciles y gracias por darme el regalo más bello de mi vida que nuestro hijo. A ti Pedro Damián te agradezco por ser mi mayor motivo para levantarme cada día y ser la mejor persona y madre que puedo ser. Gracias por siempre recibirme en casa con una sonrisa.

A mis padres les agradezco su amor y las enseñanzas de ser siempre agradecido y nunca darme por vencida. Gracia mami por ser mi ejemplo de fuerza y amor a esta vida. A mis hermanos por su amor y apoyo a pesar de la distancia.

Gracias familia Martínez Ramírez por siempre apoyarme y cuidar a mi tesoro máspreciado.

Gracias a aquellas personas que hacen mis carcajadas más sonoras, mis sonrisas más brillantes y mi vida mejor.

Gracias por su cariño, amistad y enseñanzas mis queridas Nashbly Rosas y Verónica Teymennet, Alejandra Zayas.

Gracias con todo el corazón Carolina por ayudarme a confiar en que todo lo que me proponga lo puedo lograr, gracias Susana por ser mi amiga y mi refugio siempre que lo necesite.

A mis amigos y compañeros de aventuras científicas Dr. Brandt Bertrand, Victoria, Ariana, Daniel, Enrique, Andrés, Viri, Elian, Ángeles, gracias por siempre hacerme aprender y reír.

*Con todo mi amor a mi esposo y mi hijo*

*“Siempre Juntos Siempre Fuertes”*

**Índice General**

Resumen	1
1. Introducción general.	2
<b>Capítulo I.</b>	
1. Antecedentes	5
1.1 Diversidad microbiana del Golfo de México.	7
1.2 Características de los Bs.	9
1.3 Mecanismos de acción de los Bs.	11
1.4 Fuentes de Bs	13
1.5 Clasificación de Bs.	14
1.6 Bs glicolípidos.	15
1.6.1 Ramnolípidos	16
1.6.2 Lípidos de trehalosa.	17
1.6.3 Soforolípidos.	18
1.6.4 Lípidos de manosileritritol (MEL).	18
1.7 Producción de Bs	19
1.8 Aplicación de los Bs.	20
1.8.1 Aplicación de Bs en los procesos de Biorremediación.	21
1.8.2 Degradación de Hidrocarburos.	21
1.8.3 Otras Áreas de Aplicación de losBs.	22
<b>Capítulo II</b>	
2. Bacterias del genero <i>Enterobacter</i> productoras de Bs	25
2.7 Introducción	25
2.2 Antecedentes directos.	26
<b>Capítulo III</b>	
3.1 Justificación	29
3.2 Hipótesis	30
3.3 Objetivo.	30
3.3.1 Objetivos específicos	30
3.4 Estrategia experimental	31
<b>Capítulo IV</b>	
4. Aislamiento y selección de consorcios y análisis polifásico de las cepas productoras de glicolípidos	33
4.1 Introducción	33
4.2 Materiales y métodos	35
4.2.1 Descripción de toma de muestra	35
4.2.2 Medios de cultivo	36
4.2.3 Selección de consorcios y cepas bacterianas productoras de Bs.	36
4.2.3.1 Ensayo de placa de agar CTAB azul demetileno	37
4.2.3.2 Índice de emulsión (% IE <sub>24</sub> )	37
4.2.3.3 Tensión superficial (ST)	37

4.2.3.4 Actividad hemolítica	37
4.2.3.5 Prueba de colapso por gota	37
4.3 Identificación taxonómica de bacterias productoras de Bs.	38
4.4 Resultados y Discusión.	39
4.4.1 Selección de consorcios bacterianos con actividad Bs del Golfo de México.	40
4.4.2 Análisis polifásico de las cepas productoras de Bs	46
4.4.2.1 Identificación de cepas productoras de BS	46
4.4.2.2 Caracterización bioquímica de las cepas productoras de Bs	49
4.4.2.3 Ensayo de sensibilidad a antibiótico	51
4.5 Conclusiones	52
<b>Capítulo V</b>	
5. Establecimiento de las fuentes nutricionales y condiciones fisicoquímicas de cultivo (diseños experimentales) para la optimización de la producción de Bs glicolípidos.	55
5.1 Introducción	55
5.2 Materiales y métodos	57
5.2.1 Mejoramiento de la producción de Bs producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01 (Taguchi).	57
5.2.2 Mejoramiento de la producción de Bs producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01 (Box Behnken)	57
5.3 Producción, extracción, recuperación y purificación de Bs	59
5.4 Resultados y Discusión	60
5.4.1 Cinéticas de crecimiento en diferentes fuentes de carbono de <i>E. cloacae</i>	60
5.4.2 Evaluación de las condiciones nutricionales y de cultivo (Taguchi)	61
5.4.2.1 Análisis de varianza: Reducción de tensión superficial.	62
5.4.2.2 Análisis de varianza: % índice de emulsión (% IE <sub>24</sub> ).	63
5.4.3 Análisis de fuentes nutricionales y de cultivo (Box Behnken).	66
5.4.3.1 Análisis de varianza para el % de reducción de la TS.	66
5.4.3.2 Análisis de varianza para el % índice de emulsión	67
5.5 Cinética de producción de Bs por <i>E. cloacae</i> BAGM01	68
5.6 Conclusiones	73
<b>Capítulo VI</b>	
6.1 Caracterización de la estabilidad de Bs producido por <i>E. cloacae</i> BAGM01	75
6.1.1 Introducción	75
6.2 Material y métodos	76
6.2.1 Concentración micelar crítica.	76
6.2.2 Efecto de la temperatura, el pH y la salinidad de los BAGM01 Bs	76
6.3 Resultados y Discusión	77
6.3.1 Concentración micelar crítica	77
6.3.2 Efecto de la temperatura, el pH y la salinidad del extracto crudo Bs BAGM01.	78
6.3.2.1 Efecto de la temperatura.	78

6.3.2.1	Efecto del pH.	79
6.3.2.2	Efecto de la concentración de NaCl.	79
6.4	Conclusiones	83
<b>Capítulo VII</b>		
7.1	Análisis de la anotación funcional del genoma de <i>E. cloacae</i> BAGM01	85
7.1.1	Introducción	85
7.2	Materiales y métodos	88
7.2.1	Identificación de genes que participan en la síntesis de Bs y la degradación de alcanos.	88
7.3	Resultados y Discusión	89
7.3.1	Anotación funcional del genoma de <i>E. cloacae</i> BAGM01 e Identificación de genes relacionados con la síntesis de ramnolípidos y la degradación de alcanos.	89
7.3.1.1	Anotación funcional de genes relacionados con la producción de ramnolípidos.	89
7.3.1.2	Anotación funcional de genes relacionados con la degradación de hidrocarburos.	90
7.4	Genes metabólicos y fimbriales de la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01	92
7.5	Análisis del metabolismo general la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01	97
7.6	Análisis de múltiples alineamientos de la secuencia genómica conservada con reordenamientos del genoma de la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01.	98
7.7	Conclusiones.	100
<b>Capítulo VIII</b>		
8.1	Análisis e identificación de la estructura de los ramnolípidos BAGM01	102
8.1.1	Introducción.	102
8.2	Materiales y métodos.	103
8.2.1	Perfil de cromatografía de capa fina (TLC) de Bs BAGM01.	103
8.2.2	Método de derivatización y análisis por HPLC para la determinación de ramnolípidos en BAGM01 Bs.	104
8.2.3	Análisis de espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup> H).	104
8.2.4	Análisis de cromatografía de líquidos de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (UPLC-QTOF- MS).	105
8.3	Resultados y Discusión.	106
8.3.1.	Perfil cromatográfico de capa fina (TLC) del ramnolípidos BAGM01.	106
8.3.2	Método de derivatización y análisis por HPLC para la identificación de ramnolípidos producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01.	107
8.3.3	Análisis de espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H del ramnolípidos BAGM01.	108
8.3.4	Cromatografía líquida ultra presión acoplado a análisis de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (UPLC-QTOF-MS)	109
8.3	Conclusiones	112

<b>Capítulo IX</b>	
9.1 Degradación de hidrocarburos por la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01	115
9.1.1 Introducción	115
9.2 Materiales y Métodos	115
9.2.1 Ensayo de degradación	116
9.3 Resultados y Discusión	117
9.4 Conclusiones	119
<b>Capítulo X</b>	
10. Conclusiones finales	121
10.1 Perspectivas	122
<b>Capítulo XI</b>	
10.1 Bibliografía	124
Anexos.	133

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de diversidad y abundancia bacteriana en sedimentos marinos del Golfo de México a nivel clase.	8
<b>Figura 2.</b> Microorganismos marinos productores de Bs.	9
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de los biosurfactantes.	11
<b>Figura 4.</b> Estructura A) di-ramnolípido ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), B) glucolípido ( <i>Alcaligenes sp</i> ), C) trehalolípido de glicolípido ( <i>Arthrobacter sp</i> ).	16
<b>Figura 5.</b> Estructura de glicolípido de Trehalosa.	17
<b>Figura 6.</b> Estructura de glicolípido Soforolípido.	18
<b>Figura 7.</b> Estructura de glicolípido manosileritritol (MEL).	19
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento y evaluación de la actividad biosurfactante en medio MR-1, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Tensión superficial, Índice de emulsión.	27
<b>Figura 9.</b> Localización de sitios de muestreo de agua y sedimentos del Golfo de México.	35
<b>Figura 10.</b> Prueba de Colapso por gota.	38
<b>Figura 11.</b> Detección de actividad Bs en consorcios aislados del Golfo de México. A) Consorcios de columna de agua y B) consorcios de sedimentos. (mO= mínima de Oxígeno, Mf= máxima fluorescencia, fondo, Sed: Sedimento).	42
<b>Figura 12.</b> Efecto de diferentes fuentes de carbono A) Diesel, B) queso y C) Sacarosa en la reducción de la tensión superficial por consorcios aislados del Golfo de México.	44
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético de secuencias de rRNA de cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> aisladas de la columna de agua y sedimentos del Golfo de México. El árbol se construyó usando secuencias de la región comparable de las secuencias del gen de rDNA 16S disponibles en bases de datos públicas.	48
<b>Figura 14.</b> Morfología celular de <i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01, cultivo de 24 h, 150 rpm, 30 °C, en medio mínimo con sacarosa A) Bacilo corto B) flagelo.	49
<b>Figura 15.</b> Sensibilidad a antibióticos de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01	52
<b>Figura 16.</b> Cinética tensión superficial de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01 empleado diferentes fuentes fuente de carbono.	60
<b>Figura 17.</b> Cinética de actividad de Índice de Emulsión (%IE <sub>24</sub> ) de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01 empleado diferentes fuentes de fuente de carbono	61
<b>Figura 18.</b> Efectos sacarosa y temperatura sobre del % de reducción de TS	62
<b>Figura 19.</b> Efecto de Temperatura y NaCl sobre del%IE <sub>24</sub>	63
<b>Figura 20.</b> Efecto de tratamientos sobre el porcentaje de índice de emulsión.	64
<b>Figura 21.</b> Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que con efecto significativo sobre el porcentaje reducción de la TS.	67

A) superficie de respuesta máxima de la reducción de TS (%) y B) interacción de los factores sacarosa y NaCl sobre la reducción de TS (%).	
<b>Figura 22.</b> Superficie de respuesta máxima e interacción de factores con efecto significativo sobre el % IE24. A) superficie de respuesta máxima sobre el %IE24 y B) interacción de los factores sacarosa y temperatura sobre él %IE24.	68
<b>Figura 23.</b> Producción de Bs BAGM01. Evaluación de la tensión superficial e IE24 producido por <i>E. cloacae</i> BAGM01 cultivadas en medio optimizado a 30°C, 150 rpm.	69
<b>Figura 24.</b> Concentración micelar crítica A) extracto crudo de Bs BAGM01, B) ramnolípido comercial.	77
<b>Figura 25.</b> Efecto de A) temperatura, B) pH y C) salinidad, sobre la estabilidad del extracto crudo Bs de <i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01.	80
<b>Figura 26.</b> Ruta de síntesis de ramnolípidos.	85
<b>Figura 27.</b> Regulación de la síntesis de ramnolípidos.	87
<b>Figura 28.</b> Metabolismo general de la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01.	97
<b>Figura 29.</b> Análisis de múltiples alineamientos de secuencias genómicas conservadas con reordenamiento.	99
<b>Figura 30.</b> Placa de cromatografía de capa fina.	104
<b>Figura 31.</b> Fracciones de TLC del extracto crudo de <i>E. cloacae</i> BAGM01 revelado con UV, 1) Fracción 100% H <sub>2</sub> O, 2) Fracción 80: 20% 3) Extracto crudo BAGM01, 4) Control de ramnolípidos, 5) Fracción 60: 20%, 6) Fracción 100% Metanol a longitud de onda corta.	106
<b>Figura 32.</b> Caracterización de ramnolípidos por método derivatización y análisis por HPLC producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01. A) BAGM01 éster de Bs- <i>p</i> -bromofenacilo y B) compuestos de referencia ramnolípido-L- <i>p</i> -bromofenacil ester.	107
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ramnolípido por <i>E. cloacae</i> BAGM01 aislado de GoM.	109
<b>Figura 34.</b> Espectro de ESI-MS/MS en modo de ion negativo de fragmentación de momo-ramnolípido (Rha-C10-C10) ( <i>m/z</i> 503) producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01.	110
<b>Figura 35.</b> Perfil de degradación de petróleo libre de asfáltenos A) control abiótico, <i>E. cloacae</i> BAGM01 y C) <i>E. cloacae</i> BAGM01 más surfactante sintético 360 h, 150 rpm.	118

<b>Índice Tablas</b>	
<b>Tabla 1.</b> Valores de balance hidrofílico-lipofílico (HLB).	10
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los biosurfactantes y microorganismos que los producen.	15
<b>Tabla 3.</b> Consorcio aislado de sedimentos marinos y aguas de columna a diferentes profundidades.	41
<b>Tabla 4.</b> Análisis de alineación de nucleótidos (BLAST) a partir de secuencias parciales del ribosoma 16S.	47
<b>Tabla 5.</b> Caracterización Bioquímica de las cepas <i>E. cloacae</i> (API 20)	50
<b>Tabla 6.</b> Factores a evaluar en Diseño experimental Taguchi.	57
<b>Tabla 7.</b> Factores a evaluar en Diseño experimental Box Behnken.	59
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los tratamientos sobre la reducción de la TS	63
<b>Tabla 9.</b> Comparación de los valores predichos contra los obtenidos experimentalmente.	65
<b>Tabla 10.</b> Comparación de los valores predichos con los experimentales	68
<b>Tabla 11.</b> Análisis de la anotación funcional del genoma de la cepa <i>E. cloacae</i> BAGM01.	91
<b>Tabla 12.</b> Asignaciones químicas del espectro de <sup>1</sup> H RMN de ramnolípidos purificados en <sup>1</sup> H producidos por <i>E. cloacae</i> BAGM01.	94
<b>Tabla 13.</b> Composición química de variedades de ácidos grasos en los congeneres de ramnolípidos producidos <i>E. cloacae</i> BAGM01.	108
<b>Tabla 14.</b> Composición química de variedades de ácidos grasos en los congeneres de ramnolípidos producidos <i>E. cloacae</i> BAGM01	110

## RESUMEN.

La búsqueda de nuevos biosurfactantes (Bs) requiere el aislamiento de microorganismos de diferentes ambientes. El Golfo de México (GoM) es un área geográfica activa en la exploración y explotación de hidrocarburos. Estudios metagenómicos y microbiológicos recientes en esta área sugieren una riqueza potencial de nuevos microorganismos productores de Bs. En este trabajo, se aislaron diecinueve consorcios bacterianos del GoM a diferentes profundidades de la columna de agua y sedimentos marinos. La producción de Bs de cuatro consorcios bacterianos se detectó mediante la prueba de agar CTAB, su capacidad para reducir la tensión superficial (TS), presentar índice de emulsión ( $EI_{24}$ ) y actividad hemolítica. Estos consorcios bacterianos produjeron Bs en medios suplementados con queroseno, diesel o sacarosa. Las bacterias cultivables de estos consorcios se aislaron e identificaron mediante una caracterización polifásica. En algunos consorcios, *Enterobacter cloacae* fue la especie predominante. *E. cloacae* BAGM01 presentó actividad Bs en medio mínimo y fue seleccionada para mejorar la producción de Bs usando un diseño experimental de Taguchi y un Box Behnken. Esta cepa es capaz de crecer y presentar actividad Bs a 35 g/L de NaCl. El Bs disminuyó la TS a alrededor de  $34.5 \pm 0.56$  mN/m y presentó un  $EI_{24}$  de  $71 \pm 1.27\%$ . En la caracterización fisicoquímica este Bs mostró su estabilidad térmica, a pH alcalinos y a alta salinidad que le confieren características que son deseables en múltiples industrias. El análisis genómico de la cepa de *E. cloacae* BAGM01, mostró la presencia de genes *rhIAB* responsables de la síntesis de ramnolípidos y genes *alkAB* que están relacionados con la degradación de alcanos. Además de la presencia de otras enzimas como lipasas, esterases, quitinasas, que le confieren capacidades de utilización de diferentes sustratos. La molécula bioactiva se identificó como un ramnolípido cuyo congener mayoritario es el Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub> por los métodos de TLC, derivatización y análisis por HPLC, análisis de RMN <sup>1</sup>H y UPLC-QTOF-MS.

Palabras clave: Biosurfactantes, *Enterobacter cloacae*, Producción, Ramnolípidos.

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

La biosfera marina representa una vasta fuente natural de importantes productos, gracias a que la temperatura y la salinidad del agua (hasta 3,5 %) de las masas oceánicas varían (Lara-Lara *et al.*, 2008). Estos ecosistemas están en riesgo latente de contaminación por petróleo crudo como resultados de las actividades industriales, especialmente la de los combustibles fósiles (Raiger-Lustman & López, 2009). En el 2010 ocurrió un accidente denominado Deepwater Horizon en aguas profundas del norte del Golfo de México (GoM) donde se derramaron alrededor de 636 millones de litros de petróleo crudo provocando daños ecológicos importantes (Babcock-Adams *et al.*, 2017). Con este accidente la presencia de hidrocarburos de petróleo (TPH) en el agua del GoM alcanzó concentraciones en el rango de 202-206 µg/L (Sammarco *et al.*, 2013). Y en sedimentos se reportó la presencia de hidrocarburos en concentraciones que oscilan entre 534 y 6159 ng/g-1 para sedimentos superficiales y entre 325 y 1415 ng/g-1 para sedimentos subterráneos (Badcock-Adams *et al.*, 2017). La presencia de estos compuestos ha influenciado la estructura de las comunidades microbianas la cuales se han enriquecido con bacterias que degradan los hidrocarburos. A profundidades de 183 a 3740 m de la columna de agua, las clases de bacterias más abundantes fueron *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Clostridia*, *Nitrospira*, *Phycisphaera* y *Actinobacteria* (Godoy- Lozano *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos sitios son fuentes ricas de microorganismos que producen diversos metabolitos potencialmente novedosos como enzimas, terpenos, esteroides, policétidos, péptidos, alcaloides, saponinas, fenoles, porfirinas, y Biosurfactentes (Bs) por mencionar algunos (Deshpande *et al.*, 2010,

Kiuru *et al.*, 2014, Gallimore *et al.*, 2017). Los Bs tienen propiedades de reducir la tensión superficial e interfacial tanto en soluciones acuosas como en mezclas de hidrocarburos permitiendo la formación y estabilización de sistemas heterogéneos como las emulsiones, que a su vez permiten la solubilización de los hidrocarburos en agua por arriba de la concentración micelar crítica (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013). Esto mejora la disponibilidad de los hidrocarburos hacia los microorganismos y las plantas para que estos compuestos sean absorbidos, transformados y/o degradados (Pérez-Vargas *et al.*, 2010).

En este trabajo, se aislaron e identificaron diferentes cepas de *E. cloacae* de consorcios microbianos aislados en diferentes profundidades de la columna de agua y sedimentos en el Golfo de México. Particularmente, *E. cloacae* BAGM01 creció y exhibió actividad tensoactiva y emulsificante a altas concentraciones de NaCl (hasta 35 g/L) y también en diferentes sustratos de carbono (queroseno, hexadecano, aceite de girasol, diesel y diferentes carbohidratos). El Bs producidos por *E. cloacae* BAGM01 mostró una alta estabilidad térmica, una alta actividad a pH alcalino y a altas concentraciones de NaCl. El análisis genómico de la cepa *E. cloacae* BAGM01 demostró la presencia de genes relacionados con la síntesis de ramnolípidos y la utilización de alcanos. El análisis estructural del Bs purificado confirmó que la molécula es un ramnolípido y que el monoramnolípido (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) fue el congénere predominante.

# Capítulo I

## **I. ANTECEDENTES**

El petróleo es una sustancia compuesta por una mezcla compleja de hidrocarburos, los cuales se pueden dividir en 4 clases: saturados, aromáticos, asfáltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, esterres y porfirinas), y resinas (piridinas, quinolinas y amidas) que están formados hasta en un 90% de carbono e hidrogeno y otros en menos proporción por compuestos como el oxígeno, azufre y nitrógeno. En caso de derrame, la presencia de hidrocarburos en los cuerpos de agua causan daños ecológicos a los organismos expuestos, debido a su potencial toxicidad, por su estructura, propiedades químicas (alta hidrofobicidad, baja solubilidad y biodisponibilidad) que son recalcitrantes y pueden bioacumularse en el tejido adiposo de algunos organismos (García-Cruz y Aguirre- Macedo, 2014).

Estos compuestos presentan características de color oscuro, olor fuerte. Se encuentra en estado natural en yacimientos subterráneos en los estratos superiores de la corteza terrestre. Su destilación fraccionada da productos de gran importancia industrial como la gasolina, el queroseno, el alquitrán, los disolventes, etc. (Beltrán-Saavedra, 2015)

El petróleo puede ingresar al ambiente de manera natural a través de afloramientos mejor conocidos como chapopoterías o por derrames accidentales ocasionados por el hombre (Olguín *et al.*, 2012).

En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración que dependiendo del tipo de hidrocarburo, así como las condiciones del medio ambiente, sus características (temperatura, humedad, textura del suelo) y cantidad

vertida, afecta su disponibilidad (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2015).

La razón principal de la difícil degradación de los compuestos hidrofóbicos de alto peso molecular, es su baja solubilidad en agua, lo cual incrementa la adsorción de éstos al suelo o a otras partículas al unirse irreversiblemente y limita la disponibilidad de estas sustancias al ataque microbiano (Jiménez-Islas *et al.*, 2010). Por lo que es de suma importancia la búsqueda de soluciones que permitan remediar los problemas de contaminación causados por los derrames de crudo y que a la vez sean eco-compatibles con el ambiente. En este contexto se han realizado numerosos estudios que han permitido generar alternativas utilizando productos biodegradables como lo son los biosurfactantes (Bs) que son moléculas activas de superficie, sintetizados por una diversidad de microorganismos.

La demanda de Bs ha ido aumentando de manera constante debido a sus características fisicoquímicas, baja toxicidad, alta biodegradabilidad por lo que pueden sustituir a sus homólogos químicos (Riojas-González *et al.*, 2010).

Los Bs son compuestos tensoactivos producidos por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, generalmente son metabolitos secundarios excretados extracelularmente. Se desarrollan en una gran variedad de sustratos lo cual genera productos con características bioquímicas y estructurales diversas. Estas moléculas presentan una alta actividad de superficie, propiedades emulsificantes y dispersantes (Cortes-Camargo y Barragán-Huerta, 2013).

### **1.1. Diversidad microbiana del Golfo de México.**

En costas marinas, incluidas algunas del Golfo de México (Campeche, Veracruz), se desarrolla una gran actividad petrolera y en consecuencia han ocurrido derrames debido al transporte en plataformas petroleras. En esta zona de alto impacto de contaminación por petróleo se ha encontrado una gran diversidad microbiana. Los géneros bacterianos más reportados pertenecen a las *Gammaprotobacteria*, tales como *Marinobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, así como algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclastas como *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* y *Oleispira* (García-Cruz y Aguirre-Macedo 2015).

En el GoM la información disponible sobre la microbiota en sedimentos marinos es escasa. Covarrubias *et al.*, (2016), realizó un estudio en sedimentos marinos del GoM donde existe una alta actividad petrolera y en zonas donde se observan emanaciones naturales (chapopoterías) El dominio de bacterias que presentó mayor abundancia y diversidad en los sedimentos del fondo marino son *Crenarchaeota*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*. *Crenarqueota*, *Planctomycetes*, *Cloroflexi*, *Proteobacteria* y *Euryarqueota*. El estudio, reveló que no hay diferencias significativas en la composición de la comunidad microbiana en los sedimentos superficiales (0-30 cm) del GoM. En las estaciones donde se colectaron sedimentos a más de 30 cm de profundidad si se observó diferencias significativas con respecto a los sedimentos superficiales (Covarrubias *et al.*, 2016). En la figura 1 se observa la diversidad microbiana a nivel clase presente en GoM.

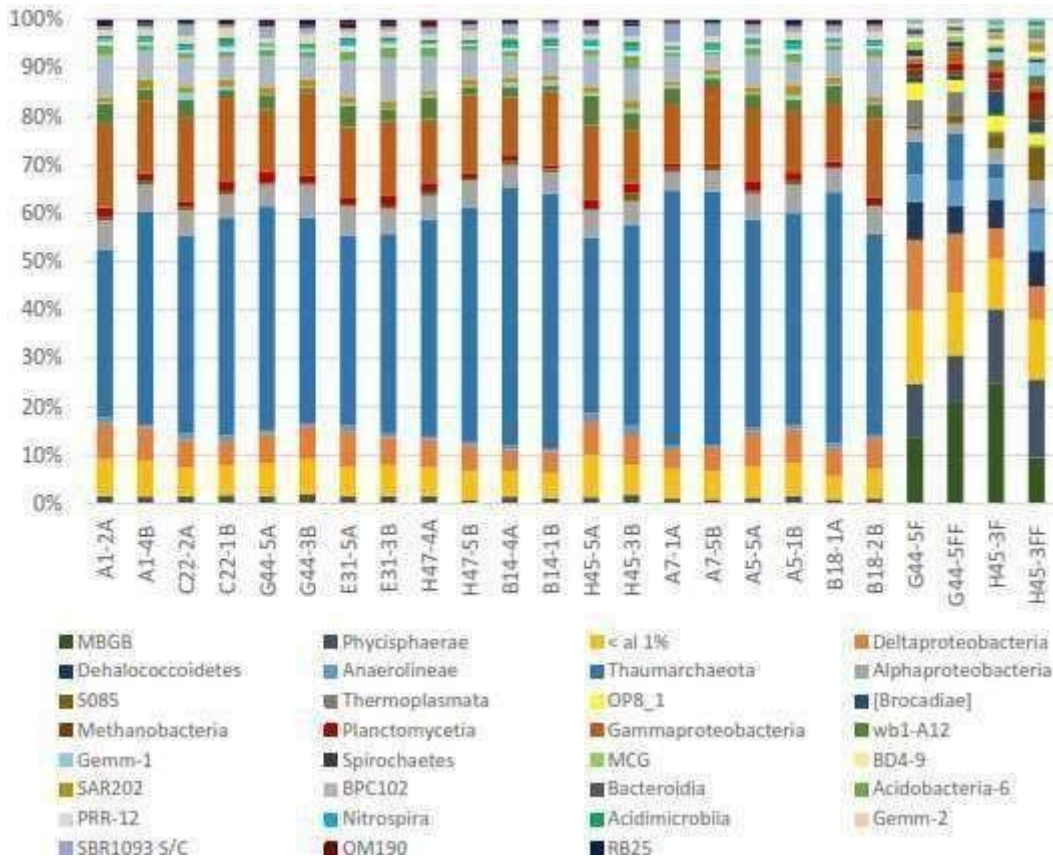


Figura 1. Representación gráfica de diversidad y abundancia bacteriana en sedimentos marinos del Golfo de México a nivel clase (Covarrubias *et al.*, 2016).

En sitios marinos contaminados con hidrocarburos se han aislado microorganismos y se ha demostrado que son capaces de degradarlos y producir Bs. Estos compuestos presentan características que tienen mayores ventajas sobre los surfactantes químicos como su biodegradabilidad, baja toxicidad, biocompatibilidad, especificidad, una alta actividad de superficie, propiedades emulsificantes, además de su capacidad de ser producidos a partir de sustratos renovables y económicos (Sulbarán-Mora *et al.*, 2005; Raiger-Lustman y López, 2009).

Deshpande *et al.*, (2010) reportó los tipos de Bs producidos por microorganismos marinos. Donde la mayor proporción está representada por los bioemulsificantes y glicolípidos.

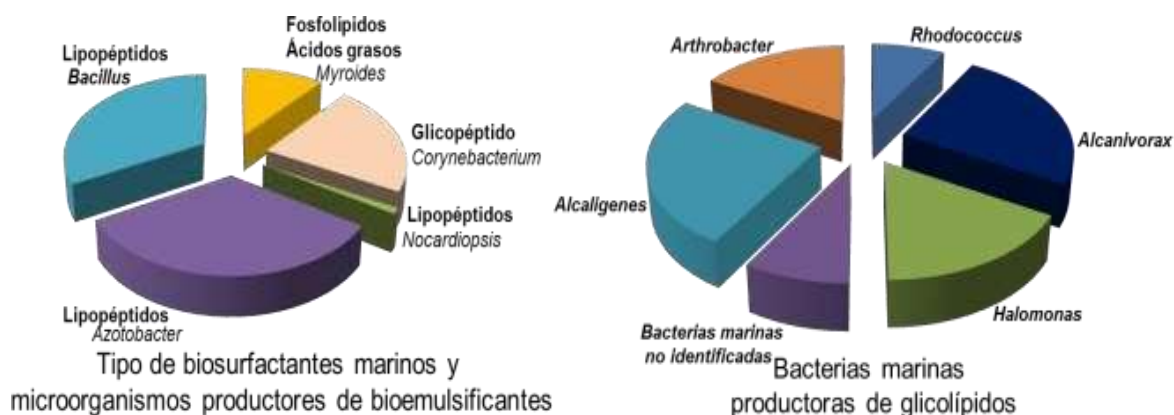


Figura 2. Microorganismos marinos productores de Bs (Deshpande *et al.*, 2010).

## 1.2. Características de los Bs.

Una molécula de Bs está constituida por una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. Esta última es usualmente una cadena hidrocarbonada, mientras la parte polar está formada por elementos como O, S, N, P; los cuales aparecen en grupos funcionales como alcohol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, carbohidratos y de esta forma puede hacer el papel de intermediario entre fases inmiscibles (Gómez-Martínez *et al.*, 2012).

El principal papel fisiológico de los Bs es el de permitir crecer a los microorganismos en sustratos inmiscibles en agua mediante la reducción de la tensión superficial de la interfase (aceite/agua)

Las propiedades de un tensoactivo o Bs son evaluadas principalmente por cuatro parámetros:

- a) Concentración micelar crítica (CMC): Indica la concentración de tensoactivo por debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente.
- b) Número de agregación (na): Indica el promedio de moléculas de tensoactivo que se encuentran formando las micelas.
- c) Punto de Nube: Es la temperatura a la cual el tensoactivo (generalmente no iónico) pierde su solubilidad en una solución acuosa, la cual a nivel macroscópico presenta una apariencia turbia, es decir, en forma de nube.
- d) Balance hidrofílico-lipofílico (HLB): Representa la capacidad de un tensoactivo para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua.

Tabla 1. Valores de balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

<u>Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)</u>	Aplicación
4-6	Emulsificante para sistemas agua aceite
7-9	Agentes humectantes
8-18	Emulsificante para sistemas aceite-agua
13-15	Detergentes
10-18	Solubilizadores

Los valores de HLB cercanos a 1 (tensoactivo ácido oleico) indican que el tensoactivo forma emulsiones estables en sistemas agua-aceite, mientras que valores de HLB cercanos a 20 (tensoactivo oleato de sodio) señalan su capacidad para formar emulsiones estables en sistemas aceite-agua. Estos parámetros indican el potencial del surfactante como agente emulsificante y de superficie, determinando su aplicación en diversas áreas, principalmente a nivel industrial y ambiental (Jiménez-Islas *et al.*, 2010).

### 1.3. Mecanismos de acción de los Bs.

La afinidad por las interfaces es lo que les otorga sus principales características como disminuir la tensión superficial cerca de 27 dinas/cm, reducir la tensión interfacial y aumentar la solubilidad, mejoran o incrementan la transferencia de masa de los contaminantes hidrofóbicos desde la fase sólida o líquida no acuosa hacia la fase acuosa al disminuir la tensión interfacial y mediante la acumulación de los compuestos hidrofóbicos dentro de las micelas (figura 3) (Thavasi, *et al.*, 2010; Raiger-Lustman y López, 2009).



Figura 3. Mecanismo de acción de los biosurfactantes.

Los Bs más eficientes tienen valores bajos de CMC, con respecto a sus homólogos químicos, es decir, se requiere menos agente tensoactivo para disminuir la tensión superficial. La CMC se define como la concentración mínima de Bs requerida para reducir la tensión superficial de agua e iniciar la formación de micelas (Rufino *et al.*, 2014).

Los Bs en concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica, existen fundamentalmente como monómeros y no contribuyen a aumentar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos. Mientras que, a concentraciones por arriba de la CMC, el Bs se agrega para formar micelas de tamaño coloidal que les permite el aislamiento de su parte lipofílica del agua. La formación de micelas permite que estos contaminantes se introduzcan en el núcleo hidrofóbico de las micelas y de esta manera se aumenta la solubilidad aparente de los compuestos en fase acuosa (Jiménez-Islas *et al.*, 2010). Lo anterior explica que la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos es proporcional a la concentración de los Bs cuando esta es mayor a la CMC; cuando se emplean concentraciones menores o cercanas a la CMC la adición del Bs no incrementa la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos. Además, se ha demostrado que, a concentraciones superiores a la CMC, los Bs disminuyen la adhesión de las bacterias a las partículas de suelo, de tal manera que ellas se comportan como si estuvieran en suspensión en un sistema de crecimiento sin la presencia del suelo (Kim *et al.*, 2001; Cassidy y Hudak, 2002).

Dos mecanismos son responsables de la transferencia de los compuestos hidrofóbicos HAPs de las micelas hacia los microorganismos:

- a) Difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de las micelas a la fase acuosa y de ésta se difunde hacia los microorganismos.
- b) Contacto directo entre las micelas y la membrana celular acompañada por la fusión a la membrana (Tiehm, 1994).

#### **1.4. Fuentes de Bs.**

Los Bs son producidos por diversos tipos de microorganismos capaces de desarrollarse en condiciones extremas como en ambientes salinos.

Se han aislado comunidades bacterianas de origen marino, entre ellas las que pertenecen a las familias de las *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Shewanellaceae*, *Alcanivoracaceae*, *Halomonadaceae*, *Oceanospirillaceae* y *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteraceae* para la producción de Bs (Covarrubias, 2016).

En el aislamiento de bacterias productoras de Bs se consideran diferentes pruebas que permiten identificar la presencia de un biomulsificante o un tensoactivo. Las pruebas más comúnmente utilizadas son: actividad hemolítica, índice de emulsificación, colapso por gota, reducción de la tensión superficial, dispersión de aceite etc.

Algunos estudios relacionados con la producción de Bs han demostrado que dependiendo de la fuente de carbono como carbohidratos (glucosa) o derivados del petróleo (asfáltenos, aromáticos), se han obtenido cepas que producen glicolípidos, donde la glucosa no mostró un incremento significativo en la producción de este Bs (Campos-Calderón *et al.*, 2015).

### **1.5. Clasificación de Bs.**

Los Bs se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza química, en lípidos, carbohidratos, aminoácidos, glicolípidos que a su vez se dividen en mono, di, tri y tetrasacáridos y lipopéptidos cíclicos (lípidos alhído a un polipéptido) (Rufino *et al.*, 2014).

De acuerdo con su peso molecular se clasifican en: compuestos de bajo peso molecular que son generalmente lipopéptidos, glicolípidos, aminoácidos modificados, ácidos grasos y compuestos de alto peso molecular que son polímeros extracelulares constituidos por polisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas o una mezcla compleja de estos biopolímeros como se presenta en la tabla 2. (Thavasi *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2007; Raiger-Lustman y López, 2009).

De acuerdo a su carga iónica se clasifican en: agentes aniónicos (carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato combinado con una cadena hidrocarbonada); agentes catiónicos (molécula lipofílica unida a un grupo hidrofílico: grupos amonio); agentes no iónicos (no se disocian en medio acuoso) y surfactantes anfóteros (combinado con una misma molécula con tendencia catiónica o aniónica) (Singh *et al.*, 2007).

Tabla 2. Clasificación de los Bs y microorganismos que los producen (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013).

Bajo Peso Molecular	Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i>
		Trehalídidos	<i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Mycobacterium spp</i>
		Saforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>
		Lípidos de Manosileritritol	<i>Candida antarctica</i>
	Lipopéptidos y lipoproteínas	Péptido-Lípidos	<i>Bacillus licheniformis</i>
		Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
		Subtilisina	
		Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
		Gramicidinas	<i>Bacillus brevis</i>
	Ácidos grasos, lípidos neutrales y fosfolípidos	Ácidos grasos	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Penicillium spiculisporuz</i>
		Lípidos neutrales	<i>Nocardia erithropolis</i>
		Fosfolípidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Alto Peso Molecular	Surfactantes poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
		Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
	Partículas surfactantes	Vesículas y fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

### 1.6. Bs glicolípidos.

Uno de los grupos más importantes de Bs son los glicolípidos, estos son generalmente Bs que contienen uno o más carbohidratos en combinación con largas cadenas de ácidos hidroxil alifáticos. Los glicolípidos más estudiados son los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas sp* (figura 4a), lípidos de manosileritriol sintetizados por *Pseudozyma antártica*, lípidos de trehalosa sintetizados por *Rhodococcus sp.*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.* y saforolípidos sintetizados por *Candida sp.*

Bacterias marinas como *Alcaligenes* sp., son capaces de producir glicolípidos, siendo la parte lipofílica cuatro ácidos  $\beta$ -hidroxidecanoicos, unidos por enlaces éster que se unen glicociladamente con el carbono 1 de la glucosa. Otra bacteria marina como *Alcanivorax borkumensis*, produce un lípido aniónico de glucosa, con una cadena oxiacil tetramérica, (Figura 4b); de igual manera *Arthrobacter* sp produce trehalosa con tres ácidos grasos y un grupo succinil (Figura 4c) (Maneerat, 2005).

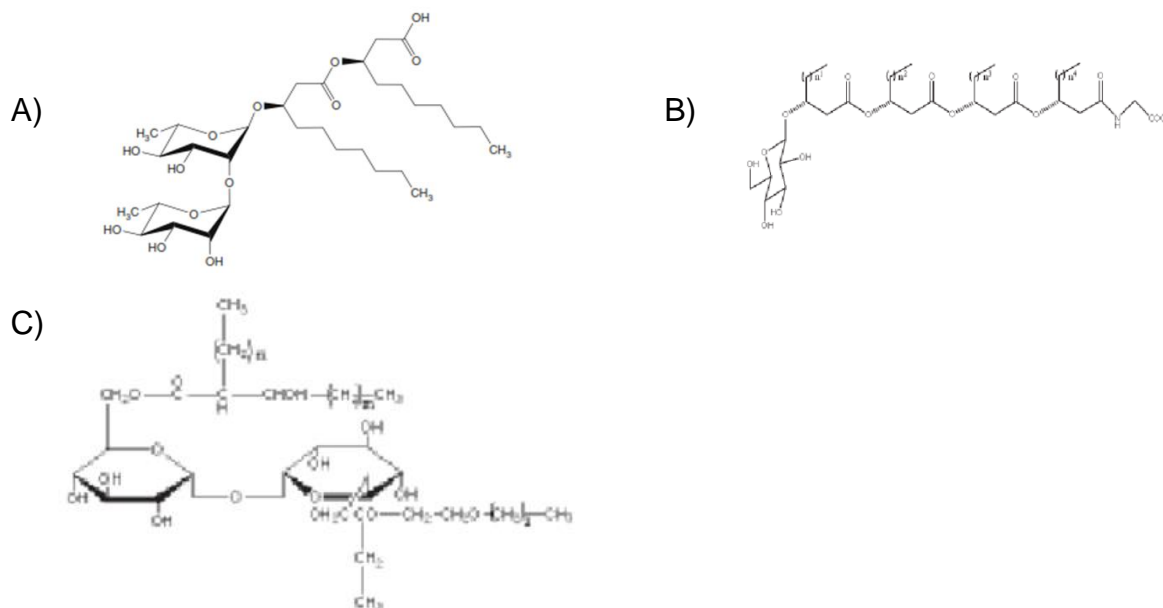


Figura 4. Estructura A) di-ramnolípido (*Pseudomonas aeruginosa*), B) glicolípido (*Alcaligenes* sp), C) trealolípido de glicolípido (*Arthrobacter* sp).

### 1.6.1. Ramnolípidos

Estas moléculas son un grupo de glicolípidos aniónicos compuestos de uno o más ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico unidos a través de puentes éter, acoplados por enlaces glicosídicos a una o dos moléculas de L-ramnosa, enlazadas entre sí, por uniones  $\alpha$ -1,2-glucosídicas (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). En algunos estudios como el de Jakovečić *et al.*, (2013) observaron que el ramnolípido producido por *Burkholderia plantarii* poseía tres ácidos grasos hidroxidecanoicos (Hošková *et al.*, 2013).

El carbohidrato es la parte polar no variable y la cadena de carbonos saturada es la parte variable no polar. Algunas cepas como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, son cepas no patogénicas capaces de producir ramnolípidos y forman micelas a una baja CMC de 15 mg/l y 22 mg/l, respectivamente, comparado con *P. aeruginosa* que tiene una CMC de 60 mg/l. El ramnolípidos se produce desde la fase lag hasta la fase estacionaria y en esa fase se observó la máxima concentración (Hošková *et al.*, 2013).

### 1.6.2. Lípidos de trehalosa.

Dentro del grupo de los glicolípidos también se encuentran los trehalolípidos otro importante grupo de Bs que contienen trehalosa. Los lípidos de trehalosa son Bs producidos por bacterias como los *Rhodococcus* sp. que, además de sus conocidos usos industriales y ambientales están ganando interés en su uso como agentes terapéuticos. Estos lípidos de trehalosa, presentan interesantes propiedades fisicoquímicas y biológicas que se han propuesto para aplicaciones industriales y ambientales, así como agente terapéutico dado que se ha reportado que tiene propiedades antivirales, su estructura se muestra en la figura 5 (Ortiz *et al.*, 2009).

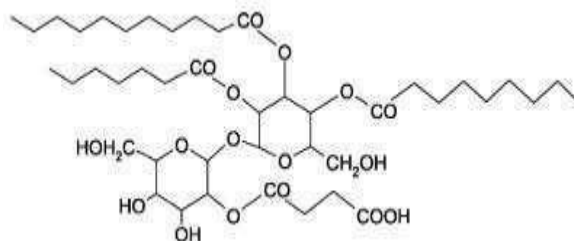


Figura 5. Estructura de glicolípidos de Trehalosa (Órtiz *et al.*, 2009).

Los microorganismos que sintetizan este tipo de glicolípidos son bacterias tales como *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp. y *Rhodococcus* sp.

La cepa *Rhodococcus erythropolis* produce una mezcla compleja de compuestos tensoactivos, que permanecen unidos a las células. Los constituyentes principales son moléculas de trehalosa pero las condiciones limitadas de nitrógeno también conducen a la producción aniónica de tetraésteres de trehalosa (Ortiz *et al.*, 2009).

### 1.6.3. Soforolípidos.

Los soforolípidos son moléculas que pertenecen al grupo de glicolípidos, estos son producidos por varios microorganismos no patógenos como especies de levaduras, tales como *Candida bombicola* ATCC 22214 (Oliveira *et al.*, 2014).

Estos compuestos están formados por soforosa, un disacárido de glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ - (1,2) (2'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranososa) unidas covalentemente a un ácido graso hidroxilado de cadena larga. Pueden observarse ligeras variaciones en el tamaño de la cadena de ácidos grasos y puede albergar uno o más insaturaciones y el grupo hidroxilo puede estar situado en posición terminal ( $\omega$ ) o subterminal ( $\omega$ -1). La figura 6 muestra un soforolípidos producidos por *C. bombicola*; (a) soforolípidos lactónico diacetilado; (b) soforolípidos de cadena abierta no acetilado (Oliveira *et al.*, 2014)

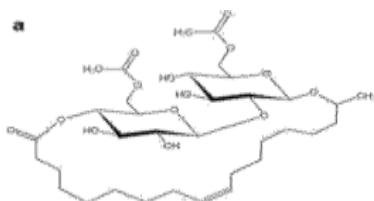


Figura 6. Estructura de Soforolípidos (Oliveira *et al.*, 2015).

### 1.6.4. Lípidos de manosileritritol (MEL).

Los lípidos de manosileritritol (MEL) son sintetizados por la levadura *Pseudozyma antártica* como una mezcla de cuatro componentes; MEL-A y MEL-B, MEL-C y

MEL-D como subproductos menores. La espina dorsal de esas moléculas es un disacárido de manosa-eritritol sobre el cual se acetilan cadenas de ácidos grasos cortas (2 a 8 átomos de carbono) o largas (10 a 18 átomos de carbono) (figura 7).

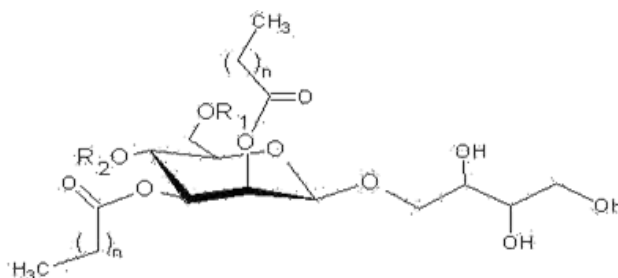


Figura 7. Estructura de glicolípido manosileritritol (MEL).

### 1.7. Producción de Bs.

La producción de Bs está significativamente influenciada por el tipo y concentración de nutrientes como las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y la presencia de ciertos elementos traza, así como las condiciones fisicoquímicas de cultivo tales como pH, temperatura, agitación (Jiménez-Islas *et al.*, 2010).

El uso de hidrocarburos para la producción de Bs está asociado a la capacidad de los microorganismos de poder utilizar estos compuestos como sustratos. Sin embargo, muchos investigadores consideran que los microorganismos degradadores de estos contaminantes hidrofóbicos, son capaces de utilizar los Bs producidos por otras especies para biodegradar estos contaminantes hidrofóbicos (Brown *et al.*, 1999; Christofi y Ivshina, 2002).

Los enfoques para la producción de Bs incluyen varias herramientas moleculares como la expresión heteróloga de los genes procedentes de bacterias que naturalmente los producen, tales como cepas de *Pseudomonas* (Holden *et al.*, 2002; Berti *et al.*, 2000) *Serratia* (Wei *et al.*, 2004.) *Bacillus* (Yussef *et al.*, 2007).

Se han empleado otros métodos moleculares como la clonación, secuenciación, expresión y caracterización de genes en géneros como *Escherichia coli*, la cual es el huésped comúnmente usado en biología molecular para la expresión de genes foráneos de manera funcional. La elección de esta cepa permite manipular el genoma proveniente de cepas potencialmente patógenas como *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp., empleando vectores de clonación y de expresión utilizando a *E. coli* como el huésped (Kaar *et al.*, 2008).

Subturani *et al.*, (2016) produjeron un Bs a partir de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* logrando una producción de 0.8g/L, en un medio mineral con 1% de glicerol y 1.3 g de sulfato de amonio a 37 °C, después de 9 días de incubación obteniendo una disminución de la tensión superficial de 32 mN/m y una CMC de 30 mg/L.

La cepa *P. fluorescens* produce Bs cuando es estimulada por la presencia de aceite vegetal, una combinación de nitrógeno orgánico/nitrógeno inorgánico, un alto nivel de inóculo y condiciones aeróbicas (Sastoque-Cala *et al.*, 2014).

Los estudios de Ábalos-Rodríguez, (2010) establecen que los aceites vegetales y residuos oleosos favorecen la producción de ramnolípidos por diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la presencia de los ácidos grasos, que son incorporados directamente a la  $\beta$ -oxidación facilitando la síntesis de grupo  $\beta$ -hidroxiácido y con ello la síntesis de una variedad de moléculas homólogas.

### **1.8 Aplicación de los Bs.**

El potencial de aplicaciones de los Bs, es muy elevado debido a sus características y en la actualidad la industria petrolera es donde tienen un mayor potencial estos compuestos, ya que son usados en la extracción de petróleo crudo, recuperación

mejorada de petróleo y procesos de biorremediación de contaminantes del medio ambiente (Thavasi *et al.*, 2010; Pattanathu y Edward, 2008).

### **1.8.1 Aplicación de Bs en los procesos de Biorremediación.**

La formación de micelas por la interacción de los Bs con los hidrocarburos favorece los procesos de biorremediación en sitios contaminados, porque mejoran su disponibilidad hacia los microorganismos y las plantas con el fin de absorberlos, transformarlos y/o degradarlos (Pérez-Vargas *et al.*, 2010).

Los métodos de recuperación mejorada de petróleo constituyen una alternativa de tratamiento a pozos y yacimientos petroleros con impacto en la producción, a la vez que garantizan extracciones más seguras y disminuyen los daños físicos y químicos a la formación del yacimiento. Mediante la presencia de microorganismos y los productos de su metabolismo en especial los Bs y polímeros facilitan la movilidad de los hidrocarburos en el interior del reservorio y permiten su extracción en un efecto sinérgico mejorando la productividad (Batista-García *et al.*, 2011).

### **1.8.2 Degradación de Hidrocarburos.**

Con el excesivo uso de combustibles y los productos derivados del petróleo crudo se ha incrementado la contaminación por derrames de esta compleja mezcla de compuestos orgánicos. Esto ocasiona un desequilibrio en el ecosistema e impacta de manera negativa al entorno ecológico. Cuando se presenta un derrame de estos contaminantes en el suelo, la mayoría de los compuestos alifáticos se pierden por volatilización o se degradan, mientras que algunos hidrocarburos policíclicos persisten en la superficie, generando un impacto negativo en virtud de sus características fisicoquímicas y sus efectos tóxicos para los seres vivos (Riojas- González *et al.*,

2010).

Los hidrocarburos policíclicos se encuentran entre los contaminantes de mayor impacto biológico debido a los efectos cancerígenos y mutagénicos que provocan en los sistemas vivos. La agencia de protección ambiental americana (EPA) seleccionó 16 de los HPA, llamados prioritarios debido a su alta toxicidad, entre los que se encuentran antraceno, fluoranteno y pireno (Petit *et al.*, 2013).

Ahora se sabe que durante el proceso de degradación del petróleo intervienen varias especies de bacterias que tienen afinidad por ciertos hidrocarburos como *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Mycobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Planococcus sp.*, *Rhodococcus sp.*, las cuales degradan alcanos, mono-aromáticos y poli-aromáticos respectivamente (García-Cruz y Aguirre- Macedo 2015).

### **1.8.3 Otras Áreas de Aplicación de los Bs.**

En áreas como la agricultura los Bs se emplean en la degradación de otros compuestos xenobióticos como los son los plaguicidas, dado que estos compuestos son de naturaleza hidrofóbica, por lo que el uso de Bs resulta prometedor en la biorremediación de sitios contaminados o en el tratamiento biotecnológico de residuos de plaguicidas (Rosa-Galván *et al.*, 2018).

Los Bs son ampliamente empleados en la industria de los alimentos por sus propiedades emulsificantes, antiadhesivas, solubilizantes, humectantes, espumantes, antimicrobianas, antioxidante, probiótica. Esto abre una ventana a su utilización como aditivos en el desarrollo de diversos productos en la industria de los alimentos, como una nueva gama de compuestos alternativos a los de origen químico que actualmente son usados (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013).

Otras industrias en las cuales los Bs son ampliamente utilizados son en la industria cosmética en las formulaciones de humectantes y jabones.

En aplicaciones biomédicas como coadyuvantes y como agentes de control antimicrobianos.

# Capítulo II

## 2. Bacterias del género *Enterobacter* productoras de Bs

### 2.1 Introducción

Las bacterias producen un amplio rango de productos extracelulares con diferentes propiedades y aplicaciones. Los Bs son compuestos extracelulares de carácter anfífilo producidos por bacterias y levaduras, especialmente cuando son crecidas en sustratos hidrofóbicos.

*Enterobacter* sp., MS16 produce un Bs compuesto por carbohidrato y ácidos grasos, el cual exhibe excelentes propiedades sobre la reducción de la TS. Los Bs producidos por esta bacteria tiene aplicaciones potenciales en recuperación mejorada de petróleo, biorremediación, industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y agrícola. En muchas de estas aplicaciones, la combinación de sus propiedades activas de superficie, así como el origen natural del producto mejora sus características para estas aplicaciones (Jadhav *et al*, 2011).

En costas marinas, incluidas algunas del GoM (Campeche, Veracruz) se ha encontrado una gran diversidad microbiana.

De los Bs producidos por bacterias uno de los más importantes a nivel biotecnológico son los ramnolípidos y la cepa productora más importante de este tipo de compuestos es *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, se ha visto que muchas bacterias de diferentes géneros también producen ramnolípidos incluyendo otras especies de *Pseudomonas* u otras que son taxonómicamente distantes como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudoxanthomonas* sp., *Pantoea* sp., *Renibacterium salmoninarum*, *Nocardioides* sp., *Tetragenococcus koreensis*, *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp. (Hošková *et al.*, 2014).

## 2.2 Antecedentes directos.

Rosas-Galván *et al.*, 2018 demostró que la cepa *Serratia marcescens* y 5 formas isogénicas presentan actividad Bs, al evaluar fuentes de carbono y nitrógeno para incrementar la producción Bs. Y reportó que esta cepa produce un Bs de tipo lipopéptido. En este trabajo se emplearon fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno demostrando que todas las fuentes de nitrógeno orgánico producen resultados similares, mientras que las fuentes inorgánicas de nitrógenos resultan significativamente diferentes en términos de tensión superficial y concentración de Bs. Demostrando que las fuentes de nitrógeno inorgánico principalmente las derivadas de los nitratos son más efectivas para la producción de Bs que las provenientes de nitrógeno amoniacal, además de que tiene la ventaja de ser de menor costo con respecto al nitrógeno orgánico (Rosas-Galván *et al.*, 2018).

Montes-Dorantes, (2015) estudió el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno, empleado glicerol, aceite vegetal, extracto de levadura y sulfato de amonio, a diferentes concentraciones, para observar el efecto sobre la producción de actividad Bs de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*; donde concluyó que la mejores fuentes para la producción de Bs fue el aceite vegetal y extracto de levadura a altas concentraciones, ya que presentaron un mayor porcentaje de índice de emulsión hasta de un 63.6% (figura 8). Al combinar glicerol y sulfato de amonio a bajas concentraciones se obtiene el mejor efecto en la disminución de la tensión superficial.

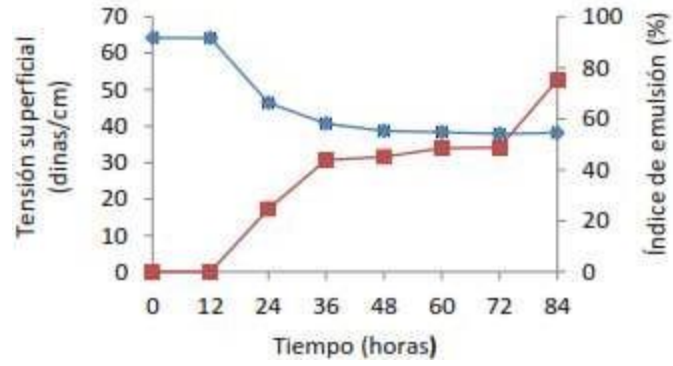


Figura 8: Cinética de crecimiento y evaluación de la actividad Bs en medio MR-1, *Pseudomonas aeruginosa*: Tensión superficial (■), Índice de emulsión (■)

# Capítulo III

### **3.1 JUSTIFICACIÓN**

El Golfo de México por ser una zona con una alta actividad tanto petrolera como marítima, está expuesta a la contaminación por hidrocarburo; dado que el petróleo crudo se encuentra entre los principales contaminantes de los sistemas marinos.

A raíz de la contaminación de los nichos marinos, por derrames de hidrocarburos o por afloramientos naturales (chapopoterías), nuevas investigaciones se están dirigiendo a la búsqueda de comunidades bacterianas que sean capaces de producir Bs, ya que estos han tomado una gran importancia en las tecnologías de biorremediación, y recuperación mejorada de crudo, por ser seguros y biodegradables.

En el grupo de investigación del laboratorio de biotecnología ambiental, del CEIB, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, han sido desarrollados trabajos donde se ha logrado el aislamiento de cepas productoras de Bs obtenidas de ambientes contaminados con hidrocarburos en suelo yaguas someras de Coatzacoalcos Veracruz. Por lo que es de suma relevancia explorar ambientes marinos ya que poseen características especiales como diferentes profundidades, presiones, niveles de salinidad que llegan hasta el 3.5 %, y variaciones de temperatura que van desde 18 °C a 4°C. Lo que permite encontrar una diversidad de microorganismos y una potencial fuente de comunidades bacterianas con cepas productoras de compuestos glicolípidos con capacidad de aumentar la biodisponibilidad de sustancias hidrofóbicas.

### **3.2 HIPÓTESIS**

Las cepas aisladas de agua y sedimentos del Golfo de México, tendrán la capacidad de producir compuestos ramnolípidos, que incrementen la biodisponibilidad de sustancias hidrofóbicas, previo a su biodegradación.

### **3.3 OBJETIVO.**

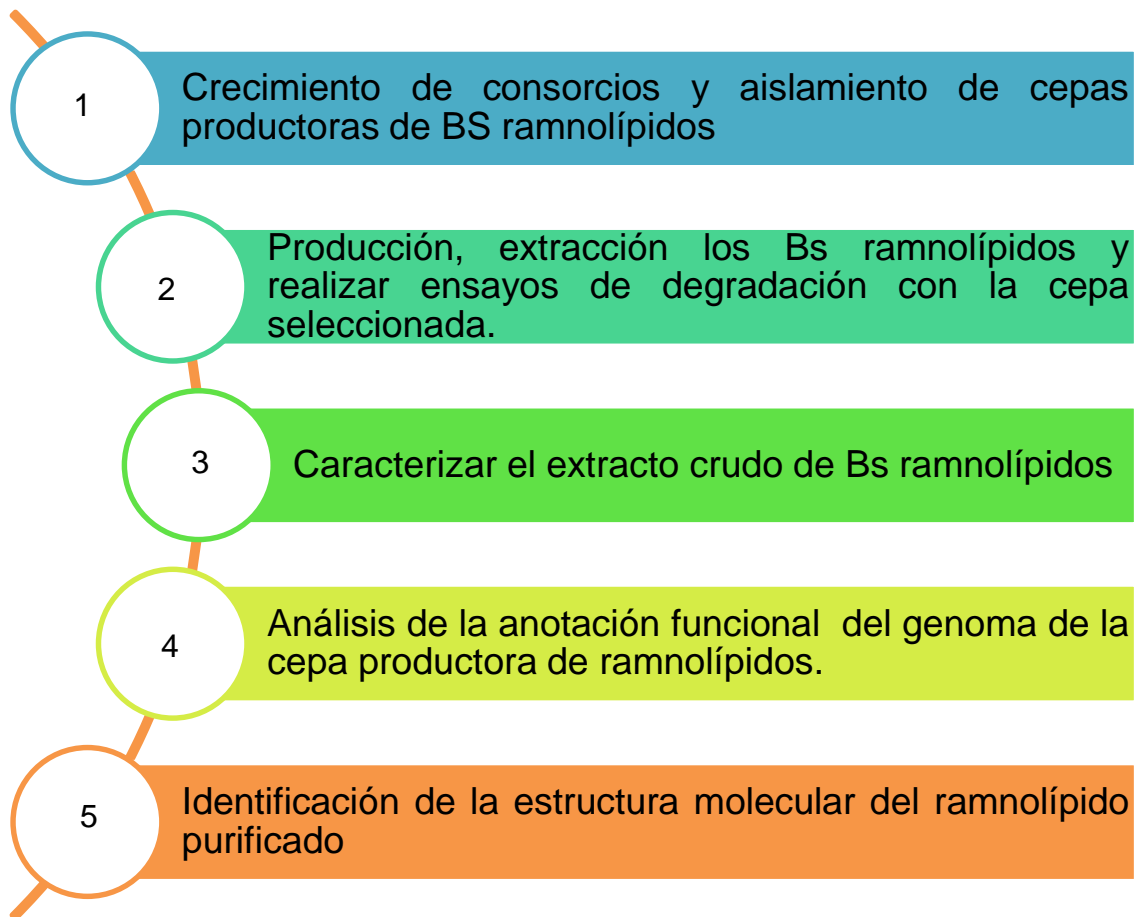
Producir, caracterizar, purificar e identificar los Bs ramnolípidos producidos por bacterias aisladas de columna de agua y sedimentos del Golfo de México.

#### **3.3.1 Objetivos específicos**

1. Aislar e Identificar consorcios y cepas productoras de Bs ramnolípidos provenientes de muestras de agua y sedimentos marinos (capítulo IV).
2. Mejorar la producción, extraer los Bs ramnolípidos de la cepa seleccionada (capítulo V).
3. Caracterizar la estabilidad fisicoquímica del extracto crudo de los Bs ramnolípidos (capítulo VI).
4. Determinar la anotación funcional del genoma de la cepa productora de ramnolípidos (capítulo VII).
5. Determinación de la estructura molecular del Bs proveniente de la cepa *E. cloacae* BAGM01 (capítulo VIII).
6. Realizar ensayos de degradación con la cepa *E. cloacae* BAGM01 (capítulo IX).

### 3.4 Estrategia experimental

El estudio se llevará a cabo en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



# Capítulo IV

#### 4. Aislamiento y selección de consorcios y análisis polifásico de las cepas productoras de glicolípidos.

##### 4.1. Introducción

Diversos géneros bacterianos han sido reportados como productores de Bs. Entre estos géneros están *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. La naturaleza química de los Bs depende en gran medida de los sustratos y del género bacteriano. Dentro de los Bs más importantes están los glicolípidos en particular los ramnolípidos. El productor más importante de estos glicolípidos es *Pseudomonas aeruginosa*, un conocido patógeno humano. Sin embargo, muchas bacterias han sido reportadas como productoras de ramnolípidos. Estas incluyen otras especies de *Pseudomonas* o especies que están taxonómicamente distantes como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudoxanthomonas* sp., *Pantoea* sp., *Renibacterium salmoninarum*, *Nocardioides* sp., *Tetragenococcus koreensis* o *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp. (Hošková *et al.*, 2013).

El género *Enterobacter* incluye especies como *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cancerogenus* y *Enterobacter cloacae*, estas cepas pertenecen a la clase de las *Gammaproteobacteria*, son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos (Xi *et al.*, 2018).

Este género es muy empleado en biotecnología para la producción de enzimas, Bs y otros metabolitos secundarios. Estas bacterias pueden producir diferentes tipos de Bs como lipopéptidos, iturinas, fengicinas, kurstakinas, surfactina y/o ramnolípidos al emplear diversos sustratos como hidrocarburos, residuos agro-industriales

y carbohidratos lo que favorece su rendimiento disminuyendo los costos de producción (Jadhav *et al.*, 2011; Hošková *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2018).

Estas bacterias productoras de Bs están ampliamente distribuidas en suelo, agua y en sedimentos, por lo que, es importante utilizar métodos que permitan evaluar su actividad Bs. Thavasi *et al.*, 2011 evaluó los métodos de detección de microorganismos productores de Bs que son una combinación de ensayos como la actividad hemolítica, el ensayo BATH, el método de colapso por gota, el ensayo de dispersión de petróleo, índice de emulsión y la medición de la TS. Estos métodos se consideran como pruebas tamiz para seleccionar los consorcios y cepa productoras de Bs. El orden de importancia de los métodos para realizar el tamiz es la medición de la TS, ensayo de colapso por gota, dispersión de aceite y el ensayo de índice de emulsión.

En este capítulo se describe el aislamiento de consorcios y cepas productoras de Bs de naturaleza glicolípida.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Descripción de toma de muestra

Este estudio se realizó en el GoM a bordo del buque oceanográfico "Justo Sierra" UNAMII, en 20 ubicaciones diferentes y a las siguientes profundidades: fluorescencia máxima (Mf: ~ 30 a 80 m), oxígeno mínimo (mO2: ~ 253 a 456 m), 1000 m, fondos marinos y sedimentos (muestreados de 40 a 60 cm de profundidad) como se muestra en la Figura 9. Las muestras utilizadas en este estudio fueron tomadas de la "región de Perdido" (98°W y 26°N) en GoM. (Anexo 1).

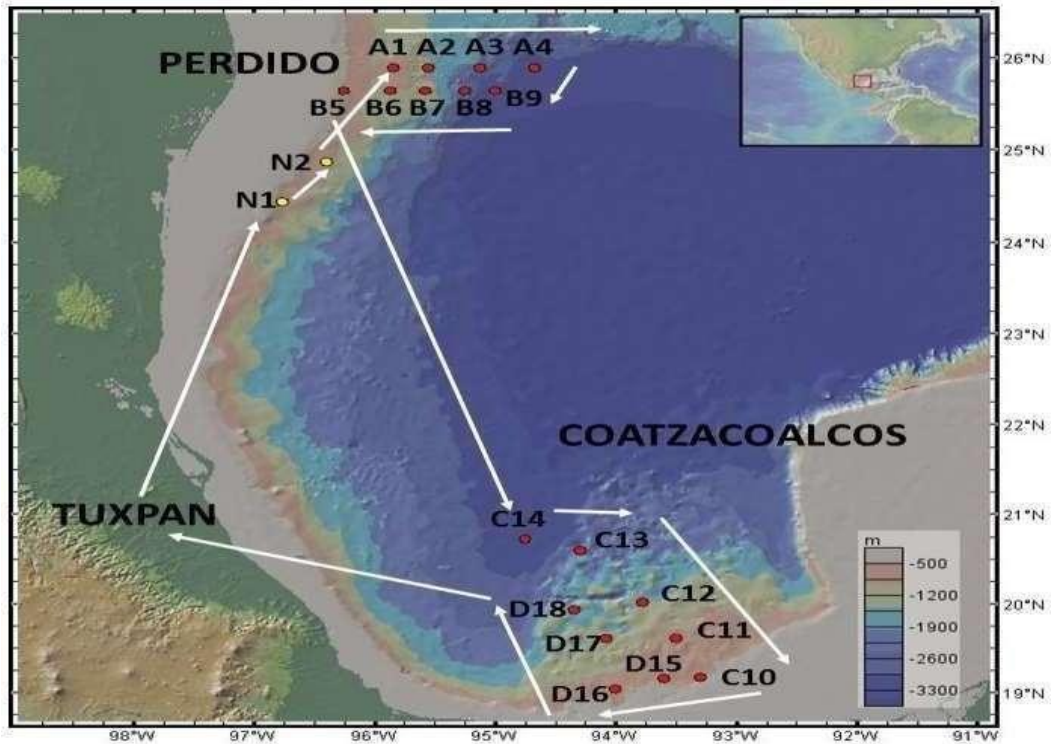


Figura 9. Localización de sitios de muestreo de agua y sedimentos del Golfo de México.

Se colectaron las muestras de agua usando una roseta oceanográfica con doce botellas Niskin de 20 L que se montaron en un carrusel. Cada muestra de 100 L de agua de mar se concentró a 3.5 L usando filtración de flujo tangencial. Se obtuvieron muestras de sedimento con un muestreador Ekman box corer. Las muestras se homogeneizaron en un matraz y se refrigeraron 50 g de cada muestra a 4 °C para su transporte antes del procesamiento en el laboratorio.

#### **4.2.2 Medios de cultivo**

Se preparó un medio para el aislamiento de consorcios bacterianos y cepas que contenía caldo de soya tripticaseína, 20 g/L de NaCl, 1,2 g/L de extracto de carne y 1,2 g/L de NaNO<sub>3</sub>. Se usó un medio mínimo para la producción de Bs el cual contenía 3.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.7 g/L MgSO<sub>4</sub>, 10 g/L NaCl y 0.1 g/L NaNO<sub>3</sub> suplementado con 0.5 g/L de extracto de levadura y una fuente de carbono (Sari *et al.*, 2014). Para el diseño experimental, se agregaron diferentes fuentes de carbono al medio mínimo: hexadecano, aceite de girasol y sacarosa a diferentes concentraciones.

#### **4.2.3 Selección de consorcios y cepas bacterianas productoras de Bs.**

Se aislaron consorcios cultivables y cepas bacterianas en medio de caldo de soya tripticaseína mencionado anteriormente y se analizó la actividad de Bs llevando a cabo los siguientes ensayos:

#### **4.2.3.1 Ensayo de placa de agar CTAB azul de metileno**

Se inocularon 20  $\mu$ L de cultivo en placas de agar con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) con azul de metileno a temperatura ambiente, durante 72 a 96 h. Los halos azul oscuro se consideraron resultados positivos para la presencia de bacterias anicónicas como los glicolípidos (Siegmund y Wagner, 1991).

#### **4.2.3.2 Índice de emulsión (% IE<sub>24</sub>)**

El índice de emulsión (%IE<sub>24</sub>) se determinó agregando 2 ml de queroseno a un tubo de ensayo y se añadieron 3 ml de sobrenadante del cultivo libre de células. Ambos líquidos se mezclaron por vórtex durante 2 min y se dejaron reposar durante 24 h, a temperatura ambiente. El porcentaje IE<sub>24</sub> se determinó por la altura de la región emulsionada (cm) dividida por la altura total de la columna de líquido y multiplicada por 100 (Rosas-Galván *et al.*, 2018).

#### **4.2.3.3 Tensión superficial (ST)**

La TS en muestras de sobrenadante de células libres se midió con un tensiómetro digital K20S (KRÜSS, Hamburgo, Alemania) basado en el principio del método de placa (Rosas-Galván *et al.*, 2018).

#### **4.2.3.4 Actividad hemolítica**

Las cepas seleccionadas se cultivaron en placas de agar sangre (5% v/v de sangre) y se incubaron a 30 °C durante 24-48 h. La actividad hemolítica se detectó por la presencia de un halo de inhibición alrededor de la colonia (Hassanshahian, 2014).

#### **4.2.3.5 Prueba de colapso por gota**

La técnica de colapso por gota se realizó en una placa de 96 micropozos (Pro Bind,

Falcon, NY, EE. UU.). Se colocaron 100  $\mu$ l de sobrenadante libre de células, se añadieron 5  $\mu$ l de petróleo crudo a la superficie del sobrenadante. Los cultivos productores de Bs presentan gotas dispersas sobre el petróleo como se observa en la figura 10 (Hassanshahian, 2016).

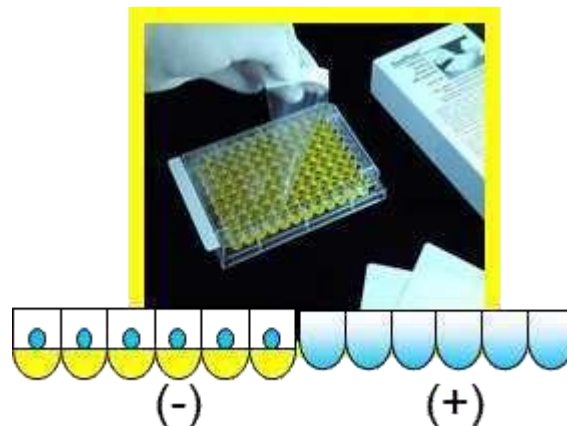


Figura 10. Prueba de Colapso por gota

#### 4.3 Identificación taxonómica de bacterias productoras de Bs.

Se realizó un análisis polifásico de las bacterias aisladas de acuerdo con el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey's (2010). La morfología celular se visualizó mediante micrografías de secciones transversales de la cepa *E. cloacae* BAGM01 se realizó de acuerdo con Valdez-Cruz *et al.*, (2017) en la unidad de microscopio electrónico (IBT-UNAM, México). Las muestras se lavaron tres veces con buffer de cacodilato de sodio 0,16 M a pH 7,2 y 4 °C y se fijaron en una mezcla de *p*-formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato de sodio (pH 7,4) durante 2 a 4 °C. Las células se fijaron posteriormente en tetraóxido de osmio al 1% (v / v) durante 90 minutos a 4°C y se enjuagaron dos veces en buffer frío y seis veces en agua destilada fría, luego se deshidrataron en una serie graduada de soluciones de etanol y se fueron incrustada en Epon. Se tiñeron finos cortes con acetato de uranilo

y plomo en buffer de citrato y se examinaron bajo un microscopio electrónico ZEISS Libra 120 plus. Se realizaron ensayos bioquímicos de las cepas bacterianas productoras de Bs y se desarrollaron utilizando el sistema API (API E20 Biomeriux, Francia). Para la taxonomía polifásica de las proteobacterias aeróbicas marinas, se determinó la sensibilidad a los antibióticos utilizando la cepa *E. cloacae* BAGM01 se llevó a cabo por difusión en una placa utilizando discos de prueba de susceptibilidad a antibióticos (Oxoid <sup>™</sup>) Thermo Fisher Scientific.

La identificación de las cepas se realizó mediante la extracción de ADN genómico bacteriano que se obtuvo con el kit Miniprep de extracción Quick-gDNA catalogo D3007 (Zymo Research, TeEpigenetics company). La región V3-V4 de la secuencia del gen16S rRNA se usó para la identificación taxonómica de las cepas aisladas. Se utilizaron primers universales, 27 forwar y 907 revers proporcionados por el servicio de secuenciación (Macrogen, Corea). Las secuencias de genes de rRNA se evaluaron con la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST). Se construyó un árbol filogenético utilizando las secuencias de rADN 16S y se analizó con CLUSTALW y el paquete Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) para la construcción del árbol filogenético utilizando el método de unión al vecino.

#### **4.4 Resultados y Discusión.**

De los diferentes puntos del muestreo se obtuvieron 80 muestras, de agua y sedimento. Las cuales fueron inoculadas en medio mínimo mineral con glicerol y en medio mínimo con glicerol e hidrocarburo (Morales-Guzmán et al, en revisión).

**4.4.1 Selección de consorcios bacterianos con actividad Bs del Golfo de México.**

Se aislaron diecinueve consorcios bacterianos de diferentes sitios del GoM los cuales produjeron agentes tensoactivos (Tabla 3). Todas las muestras de consorcios aisladas de la columna de agua redujeron la TS y trece de ellas presentaron índice de emulsión. En este estudio, se detectaron cuatro consorcios que producían Bs de tipo aniónico de naturaleza similar a la de los glicolípidos usando placas de agar CTAB-azul de metileno. En todas las muestras de la columna de agua y en tres muestras de sedimentos se detectó actividad hemolítica.

Tabla 3. Consorcio aislado de sedimentos marinos y aguas de columna a diferentes profundidades.

Consorcios	Profundidad M	Actividad Hemolítica	CTAB-azul de metileno	Tensión superficial	%IE <sub>24</sub>
A1 Mf H	61	+	-	+	+
A1 mO2 G	253	+	-	+	+
A1 fondo H(C1)	859	+	-	+	+
A1 fondo H (C2)	859	+	-	+	+
A2 Mf G (C1)	52	+	-	+	+
A2 Mf G (C2)	52	+	-	+	+
A4 fondo G (C1)	2946	+	+	+	+
C11 Mf H	48	+	+	+	+
C14 1000 G	1000	+	+	+	-
A1 Sed H	879	-	-	+	+
A2 Sed H	2066	+	-	+	+
A3 Sed H	2390	-	-	+	-
A4 Sed H	2966	-	-	+	+
B5 Sed G	550	-	-	+	-
B6 Sed G	1018	-	-	+	-

B9 Sed H	2946	-	-	+	-
C12 Sed G	1329	+	+	+	+
D15 Sed G	622	+	-	+	+
D17 Sed H	900	-	-	+	-

---

- \*mO: mínima de oxígeno,
- \*Mf: máxima fluorescencia
- \* Seabed: Fondo
- \*Sed: sedimento

La Tabla 3 describe los sitios y la profundidad de las muestras y se presentan los resultados cualitativos para la actividad de Bs. Cabe destacar que los consorcios que presentaron resultado positivo a la presencia de Bs anicónicos (placas de CTAB-azul de metileno) están distribuidos a lo largo de la columna de agua y sedimentos del GoM, lo que indica que las comunidades bacterianas con capacidad de metabolizar compuestos hidrofóbicos y presentar actividad Bs son ubicuas.

En la Figura 11A, se presenta la actividad tensoactiva y bioemulsificante de los consorcios aislados.

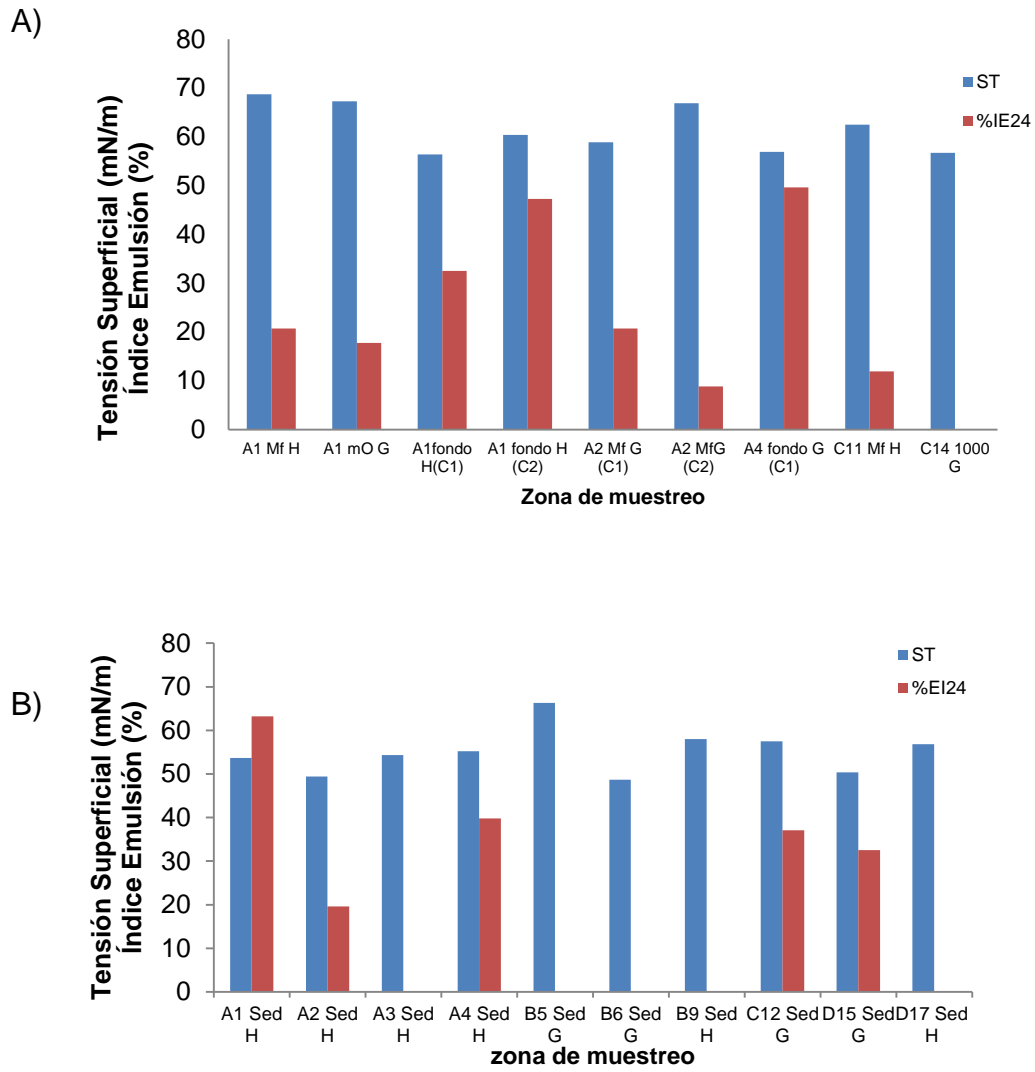
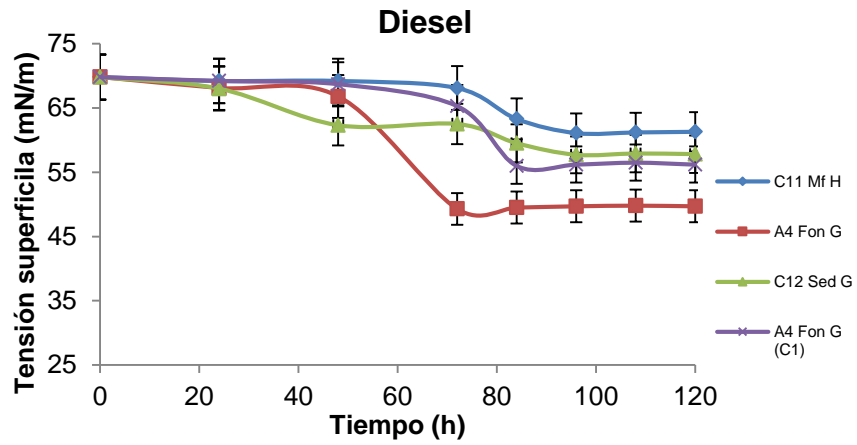


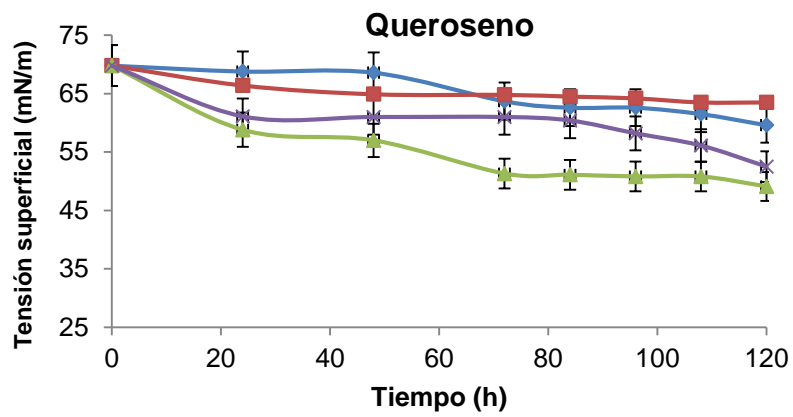
Figura 11. Detección de actividad Bs en consorcios aislados del Golfo de México. A) Consorcios de columna de agua y B) consorcios de sedimentos. (mO= mínima de Oxígeno, Mf= máxima fluorescencia, fondo, Sed: Sedimento).

Los consorcios A4 fondo G (C1), C11 Mf H, C14 1000 G y C12 Sed G, dieron positivo en la prueba de detección de Bs anicónicos (placas de agar CTAB-azul de metileno) y por lo tanto, adicionalmente, en la figura 12 se observa la determinación de la actividad B de los consorcios usando diferentes fuentes de carbono (diesel, queroseno y sacarosa a 10 g/L), bajo las condiciones mínimas de cultivo descritas previamente. Se detectó el crecimiento bacteriano en todas estas fuentes de carbono empleadas. Cuando el diesel es usado como fuentes de carbono, el consorcio C14 1000 G redujo la TS de 69.8 a 49.3 mN/m como se observa en la figura 12A con diferencias significativas entre los consorcios. En presencia de queroseno, los consorcios C12 Sed G y A4 fondo G (C1) redujeron el TS de 69.8 a 49.1 y 69.8 a 52.5 mN/m respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos (figura 12B). Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre C11 Mf H y C14 1000 G. Cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono, el consorcio C14 1000 G redujo el TS de 69.5 a 47.1 mN/m, con una diferencia significativa en comparación con los otros consorcios (figura 12C). El consorcio C11 Mf H cultivado en sacarosa como fuente de carbono mostró actividad tensoactiva. Este consorcio fue el que presentó un IE<sub>24</sub> del 17% y al momento de realizar el aislamiento de cepas, este fue el consorcio de donde se aislaron la mayor cantidad de cepas con actividad Bs.

A)



B)



C)

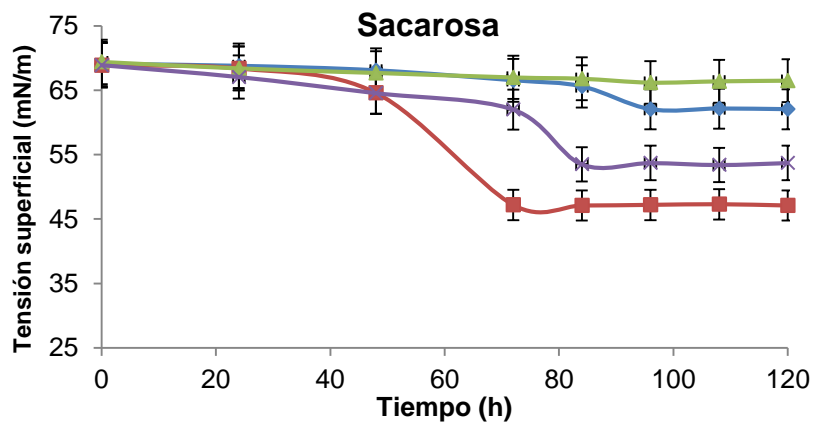


Figura 12. Efecto de diferentes fuentes de carbono A) Diesel, B) queroseno y C) Sacarosa en la reducción de la tensión superficial por consorcios aislados del Golfo de México.

Las actividades petroleras en el GoM han propiciado una gran diversidad microbiana, lo que ha permitido realizar diferentes evaluaciones (estudios morfológicos, bioquímicos, moleculares) para la búsqueda de diferentes microorganismos productores de moléculas de interés biotecnológico

Estudios metagenómicos muestran que existe una enorme diversidad de microorganismos, compuestos por diferentes comunidades bacterianas con morfologías diversas (Godoy-Lozano *et al.*, 2018).

Estas comunidades bacterianas pueden producir metabolitos secundarios que pueden tener aplicación biotecnológica, tal como la producción de Bs que son ampliamente utilizados a nivel industrial y en la recuperación mejorada de crudo o biorremediación.

Las cepas en este estudio fueron aisladas de cuatro consorcios provenientes de muestras de agua y sedimentos en diferentes sitios y profundidades del GoM. Estas fueron identificadas como productores de Bs. Algunas especies bacterianas en los consorcios presentan la capacidad de producir Bs. Sin embargo, es digno de mención que, en el mismo consorcio, algunos aislamientos eran productores de Bs y otros son capaces de degradar los hidrocarburos, lo que es indicativo de una actividad sinérgica. Thavasi *et al.*, (2011) reportaron que utilizaron agar nutritivo para el aislamiento de cepas. El uso de petróleo crudo o de sustrato hidrofóbico puede ser utilizado como criterio para aislar nuevas bacterias productoras de Bs.

Darvishi *et al.*, (2011) realizaron un trabajo con un consorcio conformado por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* al cual denominaron ERCPPI-2. Este consorcio reduce la TS e interfacial a 31.7 y 0.65 mNm de los valores

originales de 58.3 y 16.9 mN /m, respectivamente. El consorcio aislado produce Bs utilizando petróleo crudo pesado como única fuente de carbono y un índice de emulsión de 83.4%.

#### **4.4.2.1 Análisis polifásico de las cepas productoras de Bs.**

De los 4 consorcios que presentaron actividad en el ensayo en placas de agar CTAB, se aislaron e identificaron diez cepas bacterianas mediante secuenciación parcial de rADN 16S, y posteriormente se caracterizaron por análisis polifásico.

El análisis parcial de secuenciación de rADN 16S de las diferentes bacterias aisladas en este estudio reveló una gran similitud con los géneros *Shewanella* sp., *Bacillus* sp. y *Enterobacter* sp., Siendo este último el género predominante que mostró actividad de Bs. La Tabla 3 muestra los resultados del análisis de múltiples alineamientos de nucleótidos de las cepas de *E. cloacae*. Las secuencias de ADN ribosómico 16S de las cepas identificadas fueron depositadas en la base de datos CIGoM (<http://www.cigom.info/>). Estos datos mostraron que *E. cloacae* es ubicua y se distribuye en todos los sitios y profundidades en el área del estudio. Este es el primer estudio que caracterizó a *E. cloacae* en diferentes áreas de GoM.

Tabla 4. Análisis de alineación de nucleótidos (BLAST) a partir de secuencias parciales del ribosoma 16S.

Aislado	BLAST	Cobertura Total	Identidad (%)
C141000G 21	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial sequence	100% 1404	100%
C141000G 21B1	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial sequence	93% 1810	98%
C12SedG 22	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial sequence	100% 1404	100%
C11MfH 27 A1	<i>Enterobacter</i> sp. BAB-3165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98% 1033	87%
C11MfH 27B2	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OS5.7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92% 1602	99%
C11MfH 27B3	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial sequence	92% 1607	99%
C11MfH 27C1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain VITPASJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58% 1596	99%
C11MfH 27C2	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OS5.7 16S ribosomal RNA gen	57% 1583	99%
BAGM01	<i>Enterobacter cloacae</i> strain VITPASJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	58% 1598	99%
A4 fondo G 48B	<i>Enterobacter</i> sp. cp-h73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96% 1611	99%

Se generó un árbol filogenético basado en las secuencias 16S de *Enterobacter* sp. (figura 13). Las cepas se observan en diferentes clados con respecto a las secuencias de referencia del Genbank: *Enterobacter* sp. S10 HF572841, *E. cloacae* RU13 KJ607594, *Enterobacter* sp. MM034 KT9332255, *E. cloacae* AB6 JQ640581, *E. cloacae* SP4001 KY38115 y *Pseudomonas* sp. U15 como se muestra en la figura 13. Además, *E. cloacae* C141000G 21B1, *E. cloacae* BAGM01 (aislado de C11MfH)

y *E. cloacae* C12SedG22 se aislaron de diferentes sitios, sin embargo, están filogenéticamente relacionadas, Además, se observaron otras cepas de *E. cloacae* del mismo sitio, pero muestreadas a diferentes profundidades en clados que estaban filogenéticamente distantes (por ejemplo, C141000G21B y C141000G21).

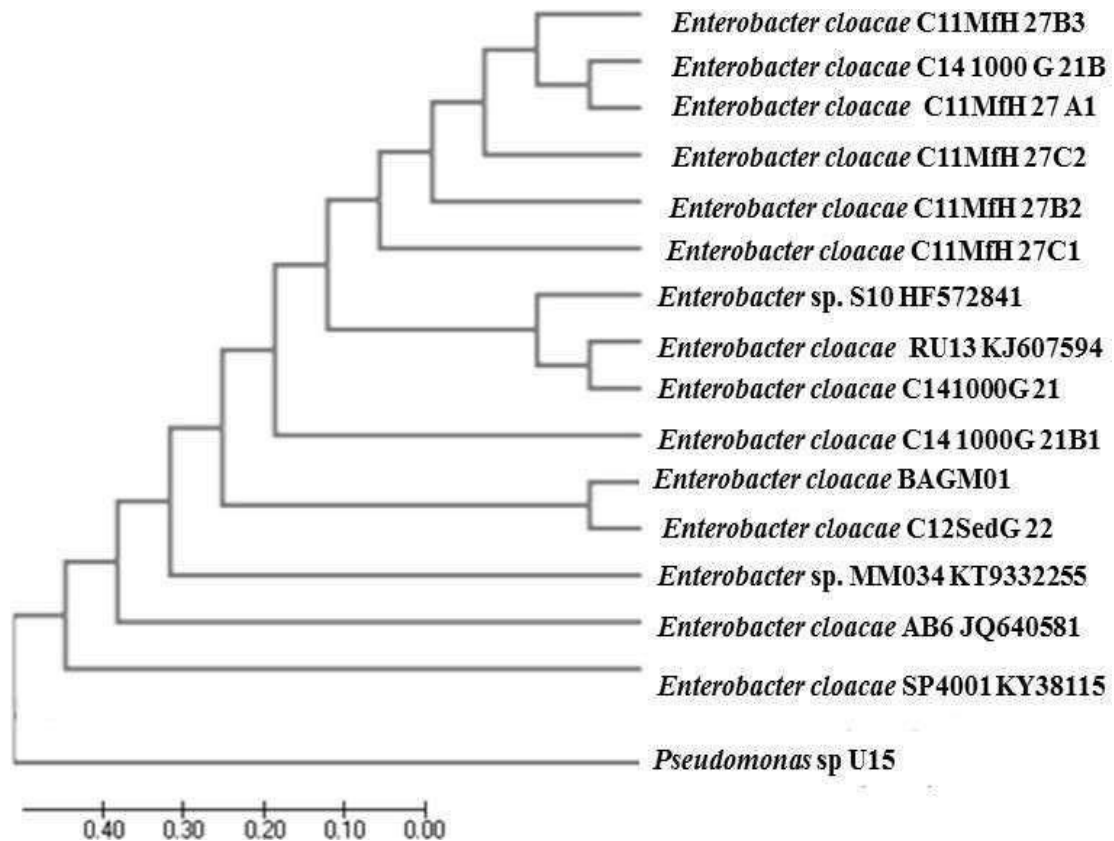


Figura 13. Árbol filogenético de secuencias de rRNA de cepas de *Enterobacter cloacae* aisladas de la columna de agua y sedimentos del Golfo de México.

El árbol se construyó usando secuencias de la región comparable de las secuencias del gen de rDNA 16S disponibles en bases de datos públicas.

Las cepas de *E. cloacae* de este estudio pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, phylum  $\gamma$ -*Proteobacteria* y todos los resultados del análisis polifásico fueron coherentes con los descritos por el manual de Bergey's (2010). La figura 14A muestra que, microscópicamente, *E. cloacae* BAGM01 es una bacteria con forma de bacilo de 2  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho con un flagelo polar (figura 14B).

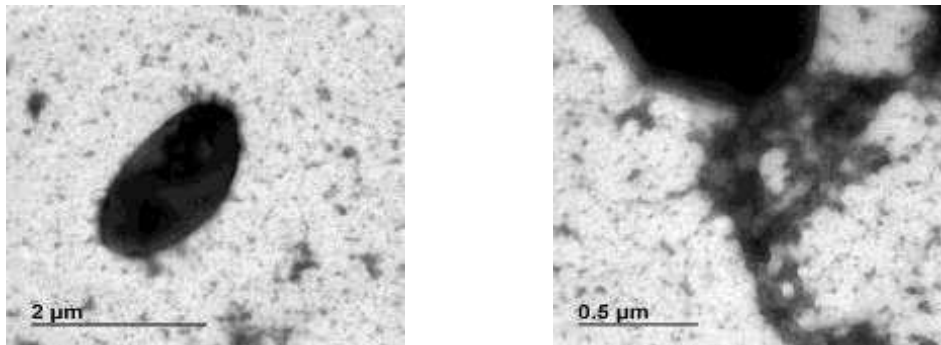


Figura 14. Morfología celular de *Enterobacter cloacae* BAGM01, cultivo de 24 h, 150 rpm, 30 °C, en medio mínimo con sacarosa A) Bacilo corto B) flagelo.

#### 4.4.2.2 Caracterización bioquímica de las cepas productoras de Bs.

Los resultados de la caracterización bioquímica se presentan en la Tabla 5. En general, las cepas de *E. cloacae* presentaron catalasa, actividad oxidasa y motilidad. Estas cepas son capaces de consumir diversos carbohidratos y citrato, indol negativo, produjeron gas  $\text{N}_2$ . Lo que coincide con las características bioquímica del género de acuerdo con lo reportado en el manual Bergey's, (2010).

Tabla 5. Caracterización Bioquímica de las cepas *E. cloacae* (API 20)

Características	BAGM01	C141000G 21	C141000G 21B1	C12SedG 22	A4fondoG 48B	C11MfH 27A1	C11MfH 27B2	C11MfH 27B3	C11MfH 27C1	C11MfH 27C2
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-galactosidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dehidrolasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ornitin decarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización de Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureas a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano deaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Acetoína	+	+	+	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación/oxidación Glucosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Fermentación/oxidación Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Inositol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Fermentación/oxidación Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Melobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación/oxidación Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción NO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Producción N <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Las *Gammaproteobacteria* es una clase taxonómica con varios géneros bacterianos reportados como productores prolíficos de Bs como *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., solo por mencionar algunos. *E. cloacae* es la cepa que predominó en los consorcios aislados de diferentes sitios y profundidades, incluido el sedimento de GoM, lo que es indicativo de la versatilidad de *E. cloacae* para sobrevivir en forma de vida libre en ambientes marinos y terrestres. Distintas cepas de *E. cloacae* pueden sintetizar Bs de diferente naturaleza química como los ramnolípidos que se encuentran entre las Bs más activos (Hošková et al., 2013). En este estudio, el ensayo CTAB detectó un agente tensoactivo aniónico producido por cepas de *E. cloacae*. *E. cloacae* BAGM01 fue la cepa con más actividad Bs y se seleccionó para una caracterización adicional. Hošková et al., (2013) estudiaron cepas no patógenas de *Enterobacter asburiae* y *Acinetobacter calcoaceticus* que producen ramnolípidos utilizando citrato de sodio como fuente de carbono. Demostraron que la producción de ramnolípidos dependía en gran medida de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo.

#### **4.4.2.3 Ensayo de sensibilidad a antibióticos.**

Las proteobacterias aeróbicas marinas exhiben perfiles característicos de susceptibilidad a los antibióticos, que son útiles para la diferenciación de los géneros. Como parte de la caracterización taxonómica de la cepa *E. cloacae* BAGM01 se evaluó la sensibilidad a antibióticos (figura 15). *E. cloacae* BAGM01 fue resistente a Vancomicina, Bacitracina, Cefoxitina y Clindamicina que pertenecen a los grupos de antibióticos bacteriostáticos como los pertenecientes del grupo de eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, sulfamidas.



Figura 15. Sensibilidad a antibióticos de la cepa *Enterobacter cloacae* BAGM01

En la taxonomía polifásica de las proteobacterias aeróbicas marinas. Las bacterias de los géneros estudiados exhibieron perfiles característicos de susceptibilidad a antibióticos, que fueron útiles para la diferenciación de los géneros

En las proteobacterias marinas la sensibilidad a antibióticos representa la susceptibilidad característica de sus respectivos géneros. Bencilpenicilina, polimixina, lincomicina y oleandomicina son taxonómicamente valiosos en la identificación de proteobacterias aerobias marinas y puede proporcionar una característica útil en la diferenciación de bacterias de este grupo a nivel de género (Gorshkova e Ivanova, 2001).

#### 4.5 Conclusiones.

En la busque de bacterias productoras de Bs de tipo glicolípidos se aislaron 4 consorcios, los cuales presentaban resultado positivo en el ensayo de placas de agar CTAB, lo cual es indicativo de la presencia de Bs de tipo aniónico como los son los ramnolípidos. Además de que estos consorcios tienen la capacidad de crecer en

diferentes sustratos como el queroseno, diesel y sacarosa. Además de que presentan actividad Bs de acuerdo con los parámetros evaluados (Actividad hemolítica, TS, IE<sub>24</sub>, colapso por gota).

Se aislaron 10 cepas provenientes de dichos consorcios las cuales presentan actividad Bs y mostraron resultados positivos para producción de Bs aniónicos. Las cuales al ser identificadas mediante la secuenciación del gen 16S pertenecieron al género *Enterobacter*. Estas cepas tienen morfología de bacilo, gram negativo, móviles, de 2-5 $\mu$  de longitud, con un flagelo polar entre otras características bioquímica que confirman la identidad del género de acuerdo a lo establecido en el manual Bergey's. La cepa BAGM01 fue caracterizada para la sensibilidad de antibióticos la cual resultó ser sensible al grupo de antibióticos bacteriostáticos.

# Capítulo V

## **5. Establecimiento de las fuentes nutricionales y condiciones fisicoquímicas de cultivo (diseños experimentales) para la optimización de la producción de Bs glicolípidos.**

### **5.1 Introducción**

Las investigaciones científicas actuales implican principalmente la búsqueda de nuevos microorganismos productores de Bs que posean características atractivas con el fin de que en un futuro cercano reemplacen a los tensioactivos sintéticos. Las principales dificultades de la producción de Bs son los altos costos de la materia prima, su costo de producción y extracciones de baja eficiencia, así como el bajo rendimientos (Bertrand *et al.*, 2018)

El factor clave que rige el éxito de la producción de estos compuestos es el desarrollo de procesos que utilicen materiales de bajo costo y den alto rendimiento.

La producción y las propiedades de los Bs están influenciadas por la fuente de carbono, la concentración de N, P y cationes metálicos, así como las condiciones de cultivo como el pH y la temperatura.

Se ha señalado que las concentraciones de Fe y Mg afectan la producción de tensioactivos en diversos microorganismos además las interacciones entre las relaciones C/N, C/Mg y C/Fe. Por ello los diseños experimentales permiten evaluar varios factores y cuando se combina con una metodología de superficie de respuesta, son una herramienta útil para modelar y maximizar la variable de respuesta (Roldan-Carrillo *et al.*, 2011).

Los factores significativos que afectan la producción de Bs y las propiedades

bioquímicas deben evaluarse para su selección. Típicamente, la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno son los primeros factores evaluados, seguidos de elegir un microorganismo adecuado. Sin embargo, hay informes donde los investigadores eligen evaluar otros factores y aspectos nutricionales como oligoelementos y parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura y agitación, ya que se ha demostrado que tiene un efecto sobre la producción de Bs y las características bioquímicas de estos compuestos en ciertos casos (Bertrand *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que el uso de diseños experimentales es una herramienta estadística muy eficiente para mejorar la producción y propiedades de los Bs. Las opciones a emplear pueden ser los diseños factoriales de dos niveles como el diseño Plackett – Burman (PBD) y el diseño Taguchi. Por otro lado, las metodologías de superficie de respuesta se definen como una colección de técnicas matemáticas y estadísticas para la construcción de modelos empíricos. Las más comúnmente implementadas para mejorar la producción son el diseño central compuesto (CCD) y el diseño Box-Behnken (BBD). Debido a la limitación de los diseños estadísticos individuales, se considera la necesidad del uso de más de uno (Bertrand *et al.*, 2018).

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Mejoramiento de la producción de Bs de la cepa *E. cloacae* BAGM01 (Taguchi).

Se evaluaron condiciones nutricionales y fisicoquímicas de cultivo a través de un diseño experimental de Taguchi, con  $\alpha = 0.05$ . Utilizando medio mínimo mineral y se evaluaron tres fuentes de carbono (sacarosa, aceite vegetal de soya y hexadecano), dos fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y  $\text{NaNO}_3$ ), además de concentración de NaCl y temperatura. Durante un periodo de incubación de 288 h, a 150 rpm. En la tabla 6 se muestra los factores a evaluar en el diseño experimental.

Tabla 6. Factores a evaluar en Diseño experimental Taguchi.

Factores	Unidad	Nivel	
		(-1)	(+1)
Sacarosa	g/L	10	20
Aceite vegetal	g/L	10	20
Hexadecano	g/L	5	10
Concentración de NaCl	g/L	10	35
$\text{NaNO}_3$	g/L	0.5	2
Extracto de Levadura	g/L	0.5	2
Temperatura	° C	10	25

### 5.2.2 Mejoramiento de la producción de Bs por *E. cloacae* BAGM01 (Box-Behnken)

En el experimento preliminar, el enfoque del diseño experimental de Taguchi permitió establecer los principales efectos de 7 factores evaluados; donde 3 factores fueron los componentes principales que favorecieron significativamente la producción de Bs. Luego, se utilizó un diseño experimental de Box-Behnken para evaluar los factores

previamente seleccionados y mejorar la producción de Bs por la cepa *E. cloacae* BAGM01. Se aplicaron dos niveles y cuatro puntos centrales; Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Este diseño evalúa y optimiza los efectos principales, los efectos de su interacción y los efectos cuadráticos de las variables independientes. Las variables de respuesta (% en reducción de TS y %IE<sub>24</sub>) obtenidas se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden (polinomio cuadrático). La ecuación polinómica utilizada es la siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon$$

Donde  $Y_i$  ( $i = 1$  a  $2$ ) son los valores pronosticados para los cambios en la tensión superficial ( $\Delta ST$ ) y el índice de emulsión (% IE<sub>24</sub>).  $\beta_0$  es la intersección;  $X_1$  (sacarina),  $X_2$  (temperatura) y  $X_3$  (NaCl) son las variables independientes;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son coeficientes lineales;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  son los coeficientes cuadráticos y  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$  y  $\beta_{123}$  son los coeficientes de los productos cruzados.

El medio mínimo se inoculó con 10% (v / v) de biomasa, durante 15 días y 150 rpm. En la tabla 7 se observan los tratamientos del experimento. El análisis de los datos se realizó con el software Design-Expert 7.0 (Stat-Ease, Inc, Minnesota, EE. UU).

Tabla 7. Factores a evaluar en Diseño experimental Box Behnken.

Factores	Unidad	Nivel		
		(-1)	(0)	(+1)
Sacarosa	g/L	15	20	25
Temperatura	° C	15	22.5	30
Concentración de NaCl	g/L	5	10	15

### 5.3 Producción, extracción, recuperación y purificación de Bs

La cinética de producción de Bs se llevó a cabo bajo las condiciones de sacarosa y temperatura a niveles altos y NaCl a niveles bajos. En un volumen de 1L a 30 ° C y 150 rpm durante 350 h. La actividad de Bs se determinó mediante reducción de TS (nN/m) y %IE<sub>24</sub>. Luego, el cultivo se centrifugó durante 20 minutos a 4200 rpm a 4 °C. La extracción de Bs se realizó con 2 volúmenes de cloroformo/metanol (2:1 v/v), se agitó durante 60 minutos y se dejó reposar durante la noche a 4 °C. La fase orgánica se recolectó y el proceso se repitió nuevamente. El Bs extraído se concentró en un rotavapor (BÜCHI R-124) a 60 °C, 340 mbar. Posteriormente, para eliminar cualquier impureza del Bs, se llevó a cabo una extracción en fase sólida (SPE) usando una columna C18 Water Sep-Pak® Vac Silica (20 ml). La fracción se eluyó en agua:metanol (100% de agua, 80:20, 60:40, 100% de metanol). El disolvente de extracción se concentró hasta sequedad al vacío y el Bs se usó para determinar la presencia de ramnolípidos en la muestra. A partir de este momento, BAGM01 Bs se denomina producto de Bs purificado con actividad de Bs, el cual se liofilizó para su almacenamiento a temperatura ambiente.

## 5.4 Resultados y Discusión.

### 5.4.1 Cinéticas de crecimiento en diferentes fuentes de carbono de *E. cloacae* BAGM01.

La cepa *Enterobacter cloacae* BAGM01 fue seleccionada para determinar la actividad Bs en diferentes fuentes de carbono. Se observa que la fuente de carbono no tiene diferencia significativa en el crecimiento bacteriano. Las fuentes de carbono empleadas fueron maltosa, glicerol, galactosa, sacarosa y diesel. En la figura 16, se observa que al usar sacarosa como fuente de carbono se disminuye la TS de 65.6 a 42.4 mNm. Con maltosa se observó una disminución de la TS de 60.8 a 45.7 mN/m. Cuando el glicerol es usado como fuente de carbono se observó una disminución de la TS de 59.5 a 55.5 mN/m por lo que este sustrato no favorece la producción de compuestos tensoactivos. Sin embargo, no existe diferencia significativa en la reducción de la TS usando las fuentes de carbono empleadas.

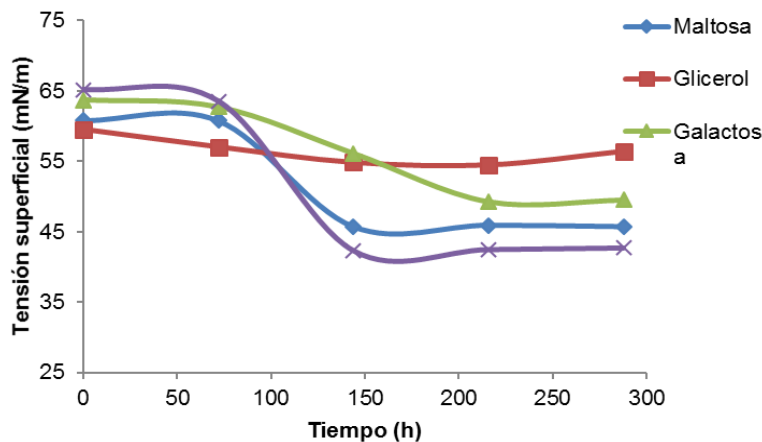


Figura 16. Cinética tensión superficial de la cepa *Enterobacter cloacae* BAGM01 empleado diferentes fuentes fuente de carbono.

Los resultados obtenidos para él % IE<sub>24</sub> muestran que sacarosa y glicerol son fuentes de carbono que favorecen la producción de Bs por la cepa *Enterobacter cloacae*

BAGM01 ya que se observó un índice de emulsión de 24.7 y 23.3 % respectivamente. Por su parte al usar galactosa como fuente de carbono esta presenta un IE<sub>24</sub> de 3%. Al usar diesel como sustrato hidrofóbico se observó un IE<sub>24</sub> de 19.4% (figura 17). Al realizarse el análisis de varianza, se observa que no existe diferencia significativa en la % IE<sub>24</sub>.

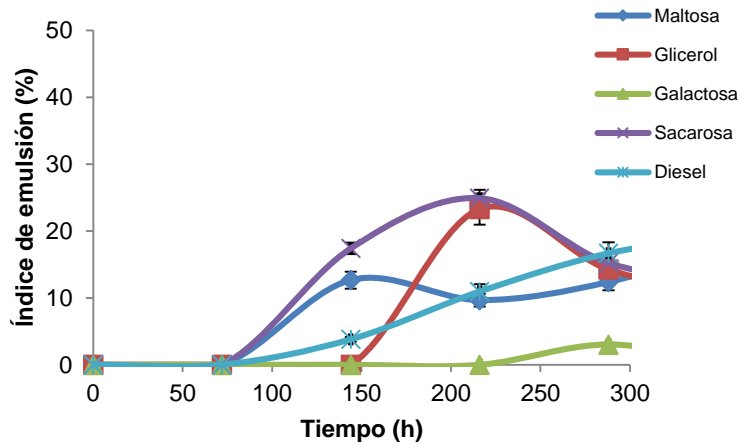


Figura 17. Cinética de actividad de Índice de Emulsión (%IE<sub>24</sub>) de la cepa *E. cloacae* BAGM01 empleando diferentes fuentes de carbono.

#### 5.4.2 Evaluación de las condiciones nutricionales y de cultivo.

El diseño estadístico se ha convertido en una herramienta importante para la producción y optimización de Bs (Bertrand *et al.*, 2018). Con el objetivo de evaluar la producción de Bs en condiciones de medio mínimo utilizando la cepa *E. cloacae* BAGM01 se implementaron diferentes diseños experimentales. Se aplicó un diseño experimental de Taguchi para evaluar los principales efectos sobre 7 factores, incluidas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, temperatura y concentración de NaCl. Se evaluaron ocho tratamientos a dos niveles, con un nivel de significancia de ( $p > 0.05$ ).

### 5.4.2.1 Análisis de varianza: Reducción de tensión superficial.

El análisis de varianza mostró que el modelo fue significativo (Anexo 2). Los factores sacarosa y temperatura tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de reducción de la TS como se observa en la figura 18. El análisis comparativo de los factores analizados muestra que sacarosa como fuente de carbono y la temperatura a niveles altos tiene efecto significativo sobre el porcentaje de reducción de la TS.

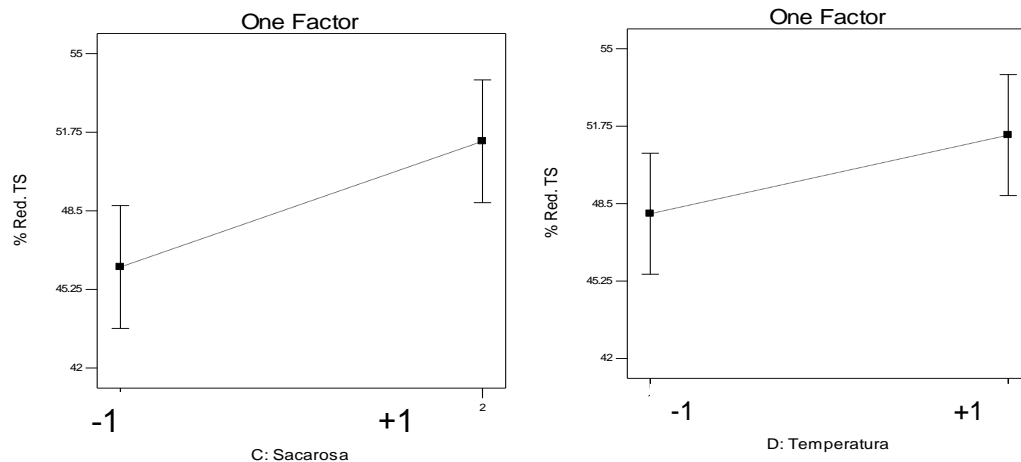


Figura 18. Efectos sacarosa y temperatura sobre del % de reducción de TS

Ecuación final en términos de factores codificados para el % de reducción de tensión superficial

$$\% \text{ Reducción TS} = +49.675 + 2.6 * C + 1.65 * D + 1.125 * E + 1.425 * G$$

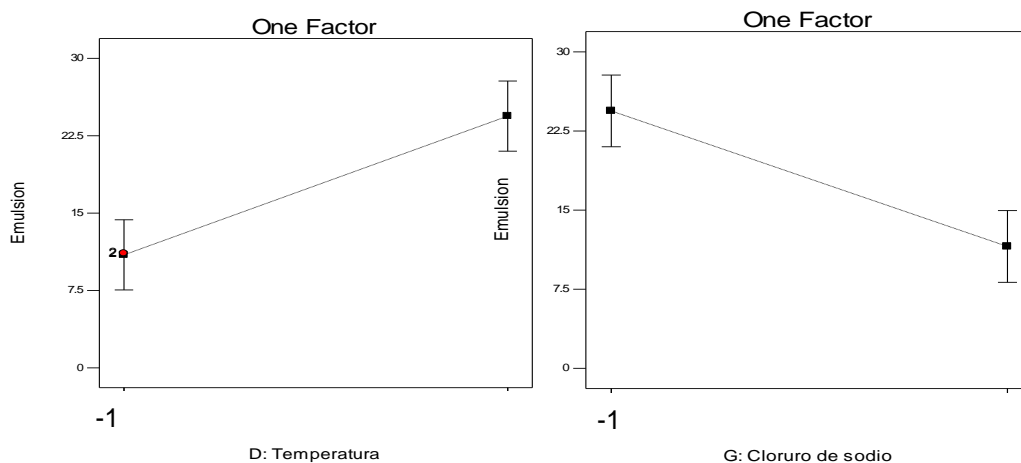
En la tabla 8 se observa los resultados de los tratamientos del diseño experimental Taguchi. Con el tratamiento 2 se obtuvo una reducción de TS de en rangos de 29.4 a 27.3 mN/m.

Tabla 8. Efecto de los tratamientos sobre la reducción de la TS

No. De Tratamiento	TS (mN/m)
Tratamiento 1	28.0±1.2
Tratamiento 2	27.4±2.1
Tratamiento 3	29.0±2.7
Tratamiento 4	27.3±7.2
Tratamiento 5	27.9±6.2
Tratamiento 6	29.4±0.8
Tratamiento 7	28.3±0.9
Tratamiento 8	28.7±0.6

#### 5.4.2.2 Análisis de varianza: % índice de emulsión (% IE<sub>24</sub>).

El análisis Anova muestra que el modelo es significativo ( $p > 0.05$ ) (anexo 3) y la temperatura y el extracto de levadura al igual que el NaCl tiene un efecto significativo sobre la actividad de índice de emulsión como se observa en la figura 19.



19. Efecto de Temperatura y NaCl sobre del%IE<sub>24</sub>

Ecuación final en términos de factores codificados para el % índice de emulsión (% IE<sub>24</sub>).

$$\% \text{ índice de emulsión} = +13.675 + 1.025 * B - 0.525 * C + 6.725 * D + 1.925 * E - 6.425 * G$$

En la figura 20 se presenta los resultados del índice de emulsión obtenido en los diferentes tratamientos utilizando el diseño experimental Taguchi.

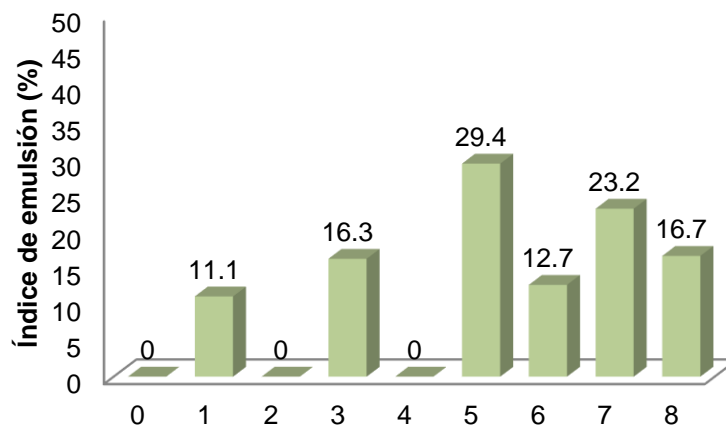


Figura 20. Resultados obtenidos del índice de emulsión en los diferentes tratamientos propuestos diseño experimental (Taguchi).

Se observa que el índice de emulsión varía en un rango de 11.1 a 29.4%, siendo el valor más alto para el tratamiento 5. En la tabla 9 se presenta los valores experimentales contra los predichos como resultado del análisis de varianza.

Tabla 9. Comparación de los valores predichos contra los obtenidos experimentalmente.

Tratamiento	A: Aceite	B: Hexadecano	C: Sacarosa	D: Temperatura	E:Ext. Levadura	F: NaNO <sub>3</sub>	G: NaCl	Red. $\xi$ ST % <sup>a</sup>	Red. ST % <sup>b</sup>	Índice emulsión <sup>a</sup>	Índice emulsión <sup>b</sup>
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	42.7	42.9	11.1	11.0
2	-1	1	1	-1	-1	1	1	49.8	50.9	0	0
3	-1	-1	-1	1	1	1	1	51.3	51.3	16.3	15.4
4	1	-1	1	-1	1	-1	1	54.3	53.2	0	0
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	52.3	53.6	29.4	29.3
6	1	1	-1	1	-1	-1	1	49.0	49.0	12.7	13.6
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	52.7	51.4	23.2	23.4
8	1	1	-1	-1	1	1	-1	45.3	45.1	16.6	16.9

Valores experimentales: a  
Valores predichos: b

### 5.4.3 Análisis de fuentes nutricionales y de cultivo (Box-Behnken)

Un diseño experimental Box-Behnken fue aplicado con el propósito de evaluar en dos niveles los tres factores que tuvieron un efecto principal en la producción de Bs por *E. cloacae* BAGM01. Las variables de respuesta evaluadas fueron reducción de TS (%) y IE<sub>24</sub> (%) ( $p > 0.05$ ).

#### 5.4.3.1 Análisis de varianza la reducción de la Tensión Superficial

Los resultados del análisis de varianza del diseño experimental Box Behnken para el porcentaje de reducción de TS (Anexo 3) muestra que el modelo fue significativo y que la interacción entre los factores sacarosa a niveles altos y NaCl a niveles bajos tiene un efecto significativo sobre la reducción de la TS, la temperatura no tiene efecto significativo. Pero para fines de optimización este factor podría manejarse a niveles bajos.

En la figura 21 se observa el efecto la interacción entre sacarosa y NaCl, donde nos indica que para incrementar el % de reducción de la TS debemos manejar niveles bajos de temperatura, niveles altos de sacarosa y niveles bajos de NaCl.

Ecuación en términos de valores de codificados para el porcentaje de reducción tensión superficial (%):

$$\text{Reducción de la TS (\%)} = 26.425 + 3.625 * A + 1.7625 * B - 3.8875 * C + 5.675 * A * B - 7.875 * A * C + 6.55 * B * C + 3.1125 * A^2 + 7.1875 * B^2 - 8.2125 * C^2$$

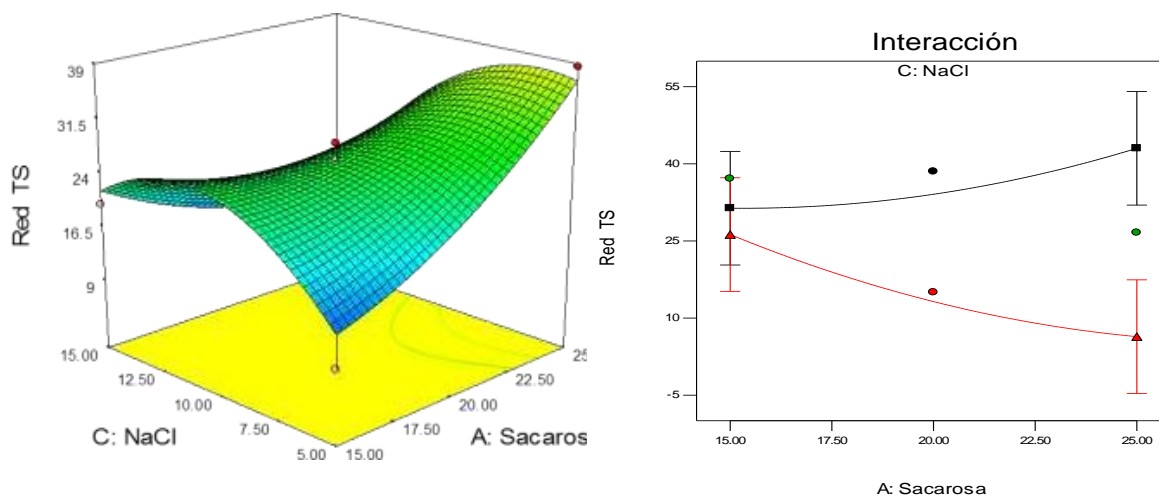


Figura 21. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores que con efecto significativo sobre el porcentaje reducción de la TS. A) superficie de respuesta máxima de la reducción de TS (%) y B) interacción de los factores sacarosa y NaCl sobre la reducción de TS (%).

#### 5.4.3.2 Análisis de varianza para el índice de emulsión

En el análisis de varianza del diseño experimental realizado, los resultados muestran que el modelo es significativo (anexo 4) y se observa que el factor sacarosa tiene efecto significativo cuando se encuentran en niveles bajos y la interacción de sacarosa y temperatura tienen efecto significativo sobre el % de IE<sub>24</sub>. El NaCl se puede utilizar a niveles bajo para fines de optimización.

En la figura 22 observamos que para incrementar el % de IE<sub>24</sub> se debe usar la sacarosa y la temperatura a niveles bajo y el NaCl lo podemos usar en niveles bajos para fines de optimización.

Ecuación en términos de valores de codificados para el índice de emulsión (%):

$$IE_{24} (\%) = 29.925 - 4.0625 \cdot A + 1.675 \cdot B - 4.875 \cdot C + 4.825 \cdot A \cdot B + 4.05 \cdot A \cdot C + 4.625 \cdot B \cdot C$$

$$+ 4.1875 \cdot A^2 + 7.1125 \cdot B^2 - 0.2125 \cdot C^2$$

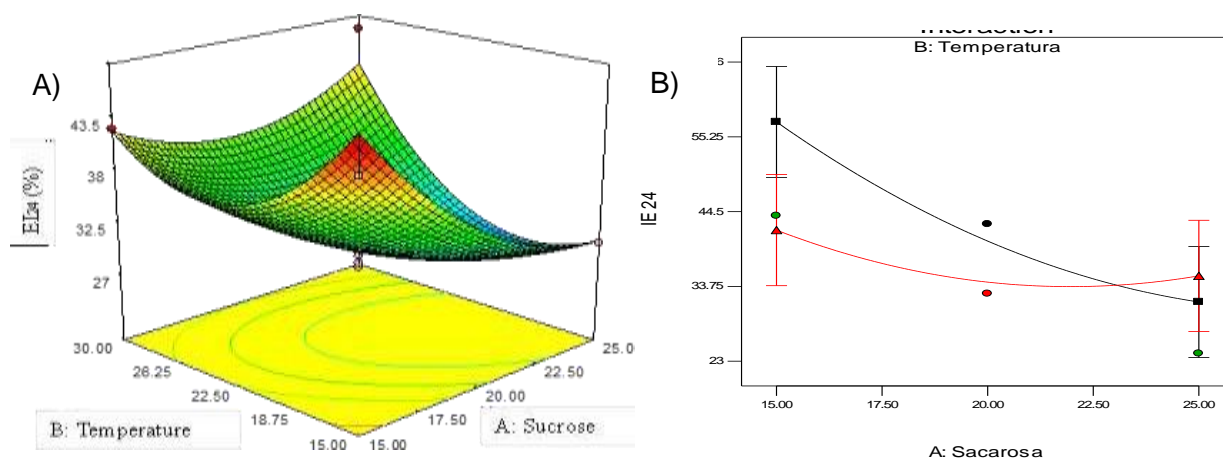


Figura 22. Superficie de respuesta máxima e interacción de factores con efecto significativo sobre el % IE<sub>24</sub>. A) superficie de respuesta máxima sobre el %IE<sub>24</sub> y B) interacción de los factores sacarosa y temperatura sobre el %IE<sub>24</sub>.

La tabla 10 se presentan los resultados de la comparación de los valores experimentales con los predichos por el modelo, con el diseño Box Behnken.

Tabla 10. Comparación de valores predichos con los experimentales

Tratamiento	A: Sacarosa	B: temperatura	C: NaCl	%Red TS <sup>a</sup>	% Red TS <sup>b</sup>	%IE <sub>24</sub> <sup>a</sup>	%IE <sub>24</sub> <sup>b</sup>
1	-1	-1	0	37.1	37.0	48.4	44.6
2	1	-1	0	26.6	32.9	30.7	30.4
3	-1	1	0	35.5	29.2	42.1	42.4
4	1	1	0	47.7	47.8	43.7	47.5
5	-1	0	-1	9.2	13.7	42.5	43.9
6	1	0	-1	38.6	36.7	26.3	24.1
7	-1	0	1	19.8	21.7	33.4	35.6
8	1	0	1	17.7	13.2	33.4	32
9	0	-1	-1	38.5	34.1	40.3	42.7
10	0	0	-1	22.7	22.1	30.2	32.7
11	0	-1	1	15	13.2	30.0	31.7
12	0	1	1	25.4	29.8	42.6	40.2
13	0	0	0	25.7	26.4	29.9	28.2
14	0	0	0	25.8	26.4	29.9	27.7
15	0	0	0	28.3	26.4	29.9	34.8
16	0	0	0	25.9	26.4	29.9	29

Valores experimentales: a  
Valores predichos: b

### 5.5 Cinética de Producción del Bs de *E. cloacae* BAGM01.

Las condiciones para la producción de Bs fueron establecidas por diseño experimental Box Behnken. Utilizando 25g/L sacarosa, 30°C, 10g/L NaCl, 150 rpm, 450 h.

En la cinética de Bs obtenida para la cepa de *E. cloacae* BAGM01, se observa que la TS se reduce a  $42.7 \pm 1.5$  mN / m, después de 144 h. Con respecto, al IE<sub>24</sub> de se obtuvo un valor máximo de  $47.3\% \pm 0.07$  después de 288 h. La extracción del BS fue realizada a este tiempo de incubación, para proceder a su petrificación y elucidación. El biosurfactante crudo BAGM01 presentó una reducción de la TS de  $34.5 \pm 0.56$  mN / m y del índice de emulsión de 71%. (Figura 23).

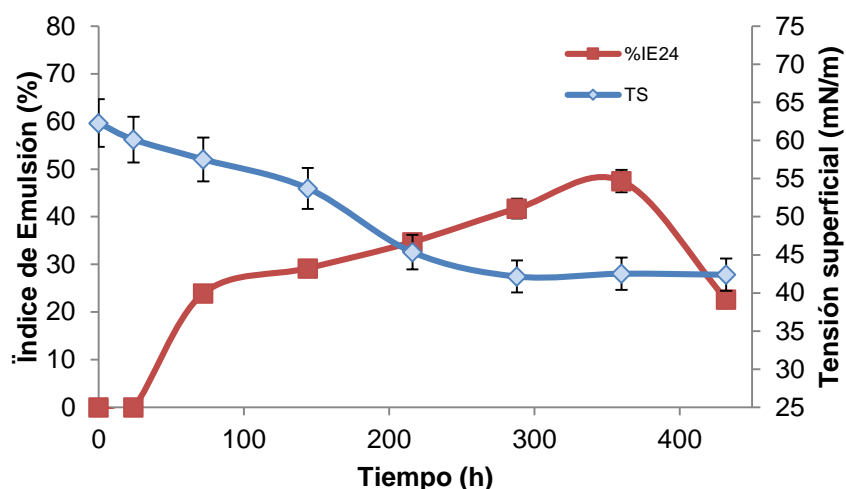


Figura 23. Producción de Bs BAGM01. Evaluación de la tensión superficial e IE<sub>24</sub> producido por *E. cloacae* BAGM01 cultivadas en medio optimizado a 30°C, 150 rpm.

Con la finalidad de incrementar la producción del biosurfactante se propuso utilizar un diseño factorial Taguchi. Este es una buena opción, ya que permiten la identificación y la selección de los factores con efectos significativos de respuesta, en este caso la actividad Bs. Luego se utiliza un segundo diseño, por ejemplo, un método

de superficie de respuesta como el diseño Box Behnken, para optimizar las condiciones de cultivo y parámetros fisicoquímicos (Bertrand *et al.*, 2018).

En el proceso de la optimización de la producción del Bs se ha reportado que la fuente de carbono afecta a los productos finales (lipopéptidos, exopolisacáridos o ramnolípidos) y, en consecuencia, sus propiedades como la estructura, la estabilidad y por lo tanto su aplicación (Abassi y Amiri, 2008; Hošková *et al.*, 2013; Jemil *et al.*, 2018). Por esta razón, fue esencial seleccionar la fuente de carbono adecuada para la cepa de estudio a través del diseño experimental. Este enfoque fue para alcanzar una alta actividad del % reducción de TS (%) y IE<sub>24</sub> (%) con la cepa *E. cloacae* BAGM01.

En primera instancia se llevó a cabo un diseño experimental Taguchi que nos permitió conocer los factores principales que promueven la actividad Bs. El resultado fue que sacarosa como fuentes de carbono a niveles altos tienen efecto significativo tanto en la reducción de TS como en el IE<sub>24</sub>. Otros factores que determinan la actividad Bs fueron temperatura a niveles altos y la concentración de NaCl a niveles bajos. Sorprendentemente para este estudio la fuente de nitrógeno no tiene efecto significativo sobre la producción de Bs. Con los factores principales se realizó un segundo diseño experimental en cuyo resultado observamos que, a niveles altos de la fuente de carbono, se obtuvo una reducción de TS de 47%. Bahia *et al.*, (2018), reportaron el uso de sacarosa como fuente de carbono para la producción de ramnolípidos y mencionan que la sacarosa es una materia prima de bajo costo con alta disponibilidad y pureza. Por lo tanto, es una excelente opción como sustrato en la producción industrial de Bs. Pereira *et al.*, (2017) también reportaron un aumento en

la producción de ramnolípidos con *Aureobasidium pullulans* con alta concentración de carbono. Ahmad *et al.*, (2016), utilizaron este diseño experimental para la estimación del rendimiento de Bs producido por *Klebsiella* sp. FKOD36, reportando un índice de emulsión de 31.68% y una tensión superficial de 21,5 mN/m. Estos resultados son menores comparados con los obtenidos en este estudio. Martínez-Toledo *et al.*, (2011) usaron una cepa de *P. putida* y determinaron que la glucosa tenía un efecto significativo en la reducción de TS (45.7 mN / m). Roldán-Carrilo *et al.*, (2011) aplicaron el mismo enfoque para optimizar la producción de Bs con una cepa de *Serratia marcescens* y reportan una reducción de TS de 57 a 30 mN/m y que estos resultados los obtuvieron con una relación C/N a niveles bajos, lo que promovió la producción de Bs en la cepa *S. marcescens* SmSA. En este estudio, el mejor resultado para la reducción de TS se obtuvo con una C/N de 38. Saika *et al.*, (2014) observaron una reducción de TS de 45.16% con glucosa como fuente de carbono usando *P. aeruginosa* RS29, esto datos son inferiores en comparación con los resultados de la reducción de la TS en nuestro estudio.

En este estudio determinamos que el nitrógeno no tuvo un efecto significativo en la producción de Bs por *E. cloacae* BAGM01. Rosas-Galván *et al.*, (2018) reportaron que la fuente de nitrógeno estimuló el crecimiento celular, pero no necesariamente la producción de Bs. Por esa razón en el diseño de Box-Behnken, el nitrógeno se mantuvo constante, en condiciones limitantes.

Soares dos Santos *et al.*, (2016) obtuvieron datos similares y demostraron que, bajo concentraciones limitantes de nitrógeno, la producción de ramnolípidos aumentó con *P. aeruginosa* PA1. En otro estudio realizado por Martínez-Toledo *et al.*, (2011),

utilizaron dos fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) en altas concentraciones, para obtener mejores resultados en términos de reducción de TS.

En el caso de  $\text{IE}_{24}$ , se incrementó la actividad de 29.4 a 47.7%. Estos valores obtenidos con *E. cloacae* BAGM01 son mayores que los reportados por Martínez-Toledo *et al.*, (2011), donde el  $\text{IE}_{24}$  fue del 20%. Saika *et al.*, (2014), utilizaron sustratos hidrofílicos y la cepa *P. aeuroginosa*, un rango de  $\text{IE}_{24}$  de 60-80% esta cepa ha sido ampliamente reportada como productora de ramnolípidos.

El análisis de los efectos principales e interacciones demostraron la influencia de sacarosa, la temperatura y NaCl sobre la producción Bs. Con estos resultados se establecieron las cinéticas de la producción del glicolípido. La producción máxima del Bs se observó entre 216 y 288 h. El Bs producido por la cepa *E. cloacae* BAGM01 presenta características similares a los Bs aniónicos como los ramnolípidos. La elucidación del glicolípido fue necesaria para confirmar esta hipótesis.

### **5.6 Conclusiones.**

Los diseños experimentales son herramientas útiles para el incrementar la actividad Bs y por ende la producción de estos compuestos.

Se desarrolló un diseño experimental de superficie de respuesta que (Box Behnken) donde de acuerdo a los resultados al emplear sacarosa y temperatura a niveles altos y la salinidad a niveles bajos con la cepa *E. cloacae* BAGM01 podemos obtener una reducción de la tensión superficial de  $42.7 \pm 1.5$  mN / m, aproximadamente después de 144 h, y mostró un IE<sub>24</sub> de  $47.3\% \pm 0.07$  se logró disminuir la tensión superficial e incrementar el índice de emulsión.

# Capítulo VI

## 6.1 Caracterización de la estabilidad de Bs producido por *E. cloacae*

### BAGM01.

#### 6.1 Introducción

La producción de Bs ha incrementado debido a sus propiedades que los hacen atractivos para múltiples aplicaciones como en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica, así como en la de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

Los Bs son moléculas muy diversas y su estabilidad está relacionada con su naturaleza química (glicolípidos, lipopéptidos, o exopolisacáridos). Generalmente, los Bs glicolípidos muestran una alta estabilidad en condiciones extremas de salinidad, pH y temperatura. Los tensioactivos iónicos son muy sensibles a electrolitos, este fenómeno ocurre porque los electrolitos afectan directamente al grupo carboxilo disminuyendo el IE<sub>24</sub>. Cuando los Bs son expuestos a calor las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero los Bs de alto peso molecular disminuyen este fenómeno debido al tamaño de sus partículas (Ortega-de la Rosa *et al.*, 2018). El Bs producido por *Pseudomonas* sp. H11 es estable incluso hasta 120 °C con óptima actividad a 60 °C. Del mismo modo, el Bs fue estable a diferentes concentraciones de sal (Velmurugan *et al.*, 2015)

Los Bs ramnolípidos tienen su óptima solubilidad acuosa de pH neutros a alcalinos. Este fenómeno se atribuye a que los ramnolípidos contienen un solo grupo carboxílico libre correspondiente al resto del ácido graso  $\beta$ -hidroxi y esto le confiere carácter aniónico. Ha sido reportado que a medida que el pH aumenta de 5 a 8, la

carga negativa de la cabeza polar aumenta y esto se refleja por el aumento de la solubilidad en agua. El aumento del pH puede cambiar la morfología de la estructura de micelas formadas por encima de la CMC.

Los Bs producen una considerable actividad de emulsificación a diferentes niveles de salinidad. Sin embargo, los Bs pueden disminuir su actividad de IE<sub>24</sub> a medida que la concentración de NaCl aumenta aproximadamente al 10%. La actividad Bs observada en condiciones de salinidad extrema indica la viabilidad del Bs para su aplicación en diferentes campos relacionados con el petróleo, la mayoría de los cuales se encuentran en condiciones altamente salinas (Ibrahim, 2018).

## **6.2 Material y métodos**

### **6.2.1 Concentración micelar crítica.**

Se determinó la tensión superficial de distintas diluciones del extracto crudo del Bs liofilizado producido por *E. cloacae* BAGM01 y los resultados se graficaron. Este ensayo consiste en tomar el punto de intersección entre las dos rectas que se ajustan a los puntos que describen el perfil de la tensión superficial, las rectas deberán pasar por el mayor número de puntos experimentales posibles. Se reporta en mg/L (Rosas-Galván *et al*, 2018).

### **6.2.2 Efecto de la temperatura, el pH y la salinidad sobre la estabilidad del Bs BAGM01**

Los Bs producidos por *E. cloacae* BAGM01 se caracterizaron en términos de estabilidad a diferentes temperaturas, pH y concentración de sal y se llevaron a cabo

evaluando IE<sub>24</sub> (%), según Ibrahim (2018) y Ortega-de la Rosa *et al.*, (2018) Para determinar el efecto de la temperatura, el sobrenadante libre de células liofilizado se calentó durante 30 minutos en un baño de agua a 25, 50, 80 ° C y bajo condiciones de esterilización (121 °C) respectivamente, y el IE<sub>24</sub> (%) fue Medido. Para la evaluación del efecto del pH, se midió el IE<sub>24</sub> (%) en sobrenadante libre de células liofilizado a diferente pH (2, 6, 8 y 14) usando HCl / NaOH 1N.

Para la estabilidad de la salinidad, el IE<sub>24</sub> (%) se midió en presencia de 2, 6, 10 y 15 g/L de NaCl.

### 6.3 Resultados y Discusión

#### 6.3.1 Concentración micelar critica

Se determinó la CMC del extracto crudo de Bs BAGM01 y se comparó con la de un ramnolípido comercial y en los resultados se observa que la CMC del extracto crudo es de 50 mg/L (figura 24) y la del ramnolípido comercial es de 25 g/L.

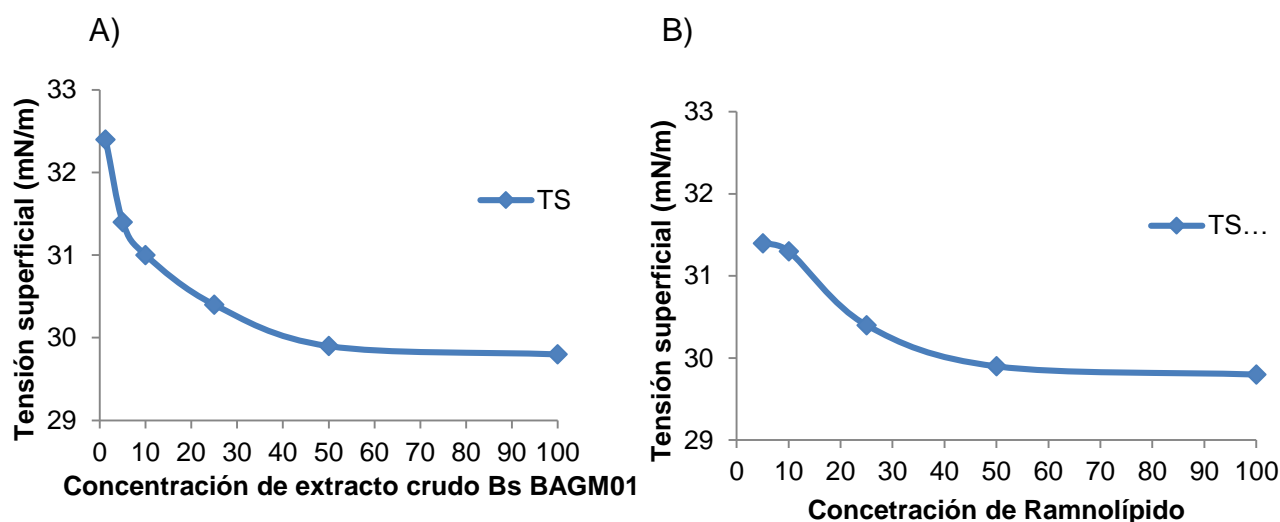


Figura 24. Concentración micelar crítica A) extracto crudo de Bs BAGM01, B) ramnolípido comercial

Sabturani *et al.*, 2016 reportan un CMC de 30 mg/L de un ramnolípido producido por la cepa *P. aeruginosa* UKMP14T. Este resultado es menor que el obtenido en este trabajo posiblemente porque solo se empleó un extracto crudo. Otros autores reportan una CMC de 105 mg/L de un ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2NCIB40, 044 (Haba *et al.*, 2014) Klosowska-Chomiczewsk *et al.*, 2017 mencionan que generalmente, la CMC es dependiente del pH, temperatura, fuerza iónica y estructura tensioactiva. Como los ramnolípidos se sintetizan en un medio iónico, el pH tendrá mayor influencia sobre la CMC que los otros parámetros mencionados.

### **6.3.2 Efecto de la temperatura, el pH y la salinidad del extracto crudo Bs BAGM01.**

La estabilidad bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y salinidad es un factor importante para la aplicación de los Bs. El IE<sub>24</sub> fue la variable de respuesta utilizada para evaluar la estabilidad de Bs considerando su aplicación potencial en la biorremediación.

#### **6.3.2.1 Efecto de la temperatura.**

Los resultados obtenidos mostraron que el sobrenadante libre de células liofilizado del extracto crudo de Bs BAGM01 fue estable en un amplio rango de temperaturas (25, 50, 80 y 121 °C). Además, no hubo diferencias significativas a temperaturas inferiores a 80 °C (Figura 25A) Se observó que hubo un aumento en la actividad a la temperatura más alta estudiada (121 °C) con IE<sub>24</sub> de 72.6%.

### 6.3.2.2 Efecto del pH.

Se evaluó la estabilidad de Bs a diferentes pH (2, 6, 8 y 14) utilizando el sobrenadante BAGM01 Bs liofilizado. Los mejores resultados se observaron a pH alcalino de 14 con un  $IE_{24}$  de 63.8%. El  $IE_{24}$  a pH ácido (2 y 6) presentó valores de  $IE_{24}$  de 50.9 y 54.6%, y no se observaron diferencias significativas (Figura 25B). Esto demostró que las Bs de *E. cloacae* BAGM01 presenta buena actividad y estabilidad en un amplio rango de pH, particularmente en condiciones alcalinas.

### 6.3.2.3 Efecto de la concentración de NaCl.

Cuando el sobrenadante crudo libre de células BAGM01 fue sometido a diferentes niveles de salinidad (2, 6, 10 y 15 g/L), la actividad  $IE_{24}$  fue 57.6 y 56.7% a concentraciones de 10 a 15 g/L, respectivamente (Figura 25C). Hubo una diferencia significativa en el  $IE_{24}$  a altas concentraciones de NaCl en comparación con las concentraciones bajas.

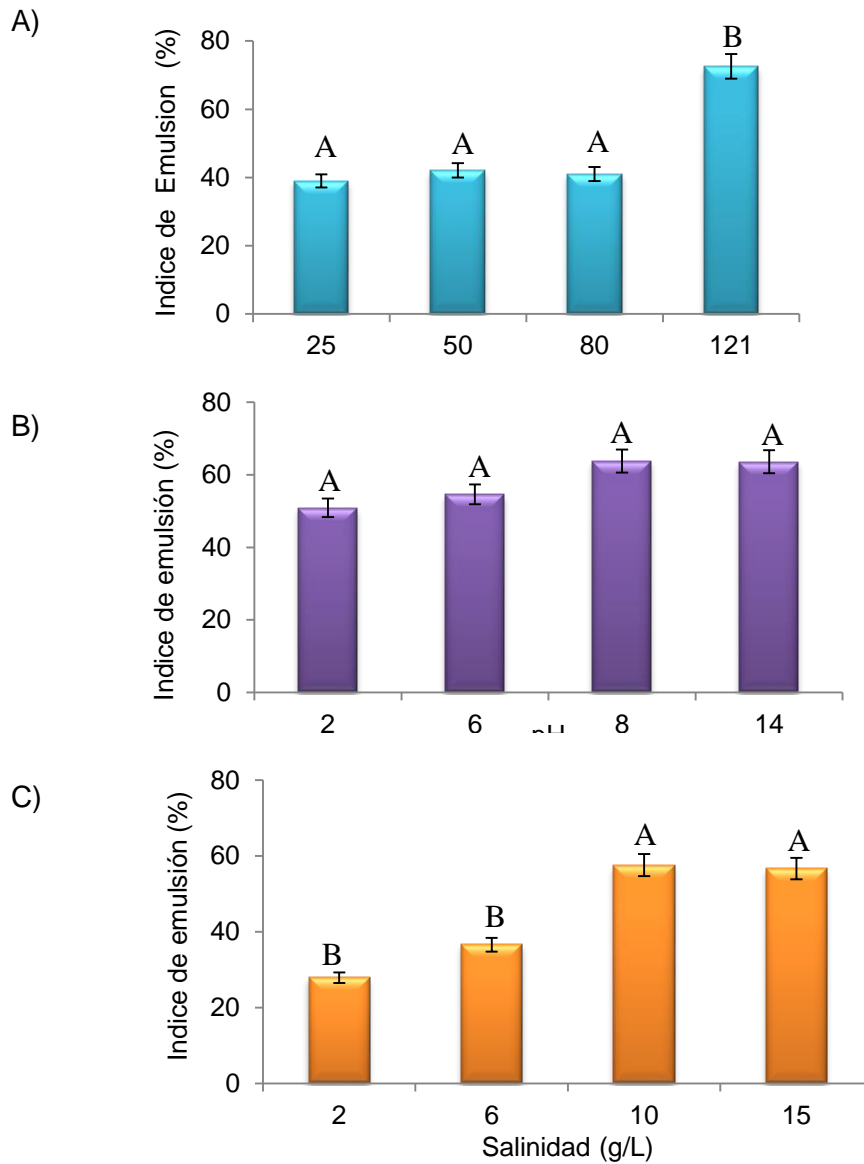


Figura 25. Efecto de A) temperatura, B) pH y C) salinidad, sobre la estabilidad del extracto crudo Bs de *Enterobacter cloacae* BAGM01

Los factores fisicoquímicos pueden afectar la efectividad y la estabilidad (temperatura, pH y salinidad) de Bs, lo cual es importante para su aplicación.

El extracto crudo del Bs BAGM01 presentó una excelente estabilidad a temperaturas de esterilización que podrían ser importantes para aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria. De manera similar, este Bs funcionó muy bien en pH alcalino

y presentó actividad a diferentes concentraciones de NaCl, lo cual es importante en aplicaciones como la biorremediación de ambientes marinos.

*Efecto de la temperatura.* Bs BAGM01 mostró alta estabilidad (IE<sub>24</sub> 72%) a 121 °C. Esta actividad emulsionante mostró el mismo comportamiento que en el trabajo de Ortega-de la Rosa *et al.*, (2018) que reportó una estabilidad térmica de un bioemulsionante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 cultivado en etanol y en una mezcla de glicerol y hexadecano como fuentes de carbono. Ibrahim, (2018) estudió las cepas *Ochrobactrum anthropi* HM-1 y *Citrobacter freundii* HM2, aisladas de suelo contaminado con aceite residual de motor y el Bs presentó una actividad incluso a 120 °C. El IE<sub>24</sub> registrado fue 72.7 y 70%, respectivamente, pero a 50 °C mostró un IE<sub>24</sub> más alto (92 y 90%, respectivamente). *Natrialba* sp. C21 presentó estabilidad a 40 °C con un IE<sub>24</sub> de 68%, pero cuando se calentó a 100 °C, el Bs perdió su actividad (Khemili-Talbi *et al.*, 2015). Khopade *et al.*, 2012 observaron un comportamiento similar con *Nocardiopsis* sp. B4 cuando el Bs era calentado. En otro estudio, Jemil *et al.*, (2018) emplearon la cepa *E. cloacae* C3 que mostró un IE<sub>24</sub> de aproximadamente 55% en un rango de temperatura de 20 a 80 °C, más bajo que el observado en nuestro estudio.

El Bs BAGM01 exhibe alta estabilidad en condiciones alcalinas (pH de 8 a 14), con IE<sub>24</sub> del 63%. Este rango de pH es más alto que el reportado para la estabilidad de Bs (pH máximo 12). El estudio de Ibrahim, (2018) mostró un IE<sub>24</sub> del 95% a pH 6. Esto podría deberse a la alteración de la estructura de Bs después de haber sido sometido a estas condiciones de pH (los ramnolípidos son óptimamente solubles en pH neutro a alcalino). Del mismo modo, un aumento en el pH tiene un efecto positivo

sobre la actividad y la estabilidad del emulsionante. Se ha observado una mejor estabilidad de las micelas del ácido graso en presencia de NaOH y la precipitación de metabolitos secundarios a pH alto (Khopade *et al.*, 2012; Khemili-Talbi *et al.*, 2015). El mismo comportamiento se observó en los Bs producidos por *A. bouvetii* UAM25 a pH 10, debido al hecho de que en las soluciones alcalinas los biopolímeros adquieren un carácter aniónico (Ortega-de la Rosa *et al.*, 2018). Esto es comparable con los Bs producidos por *Natrialba* sp. C21 que mostró alta actividad de emulsión a pH 12 (66%).

El Bs BAGM01 mostró 57% de emulsión en presencia de 10 g/L de NaCl, que es más alta que la concentración reportada por Jemil *et al.*, (2018) con la cepa *E. cloacae* C3, donde el valor IE<sub>24</sub> fue 50% en presencia de 0.5 a 1 g/L de NaCl. Curiosamente, los autores mencionaron que la actividad emulsionante disminuyó con un aumento en la concentración de NaCl por encima de 1 g/L. Ortega-de la Rosa *et al.*, (2018) mencionaron que los tensioactivos iónicos son muy sensibles a los electrolitos, este fenómeno ocurre porque los electrolitos afectan directamente a los grupos carboxilo disminuyendo la actividad Bs. En un estudio realizado por Ibrahim (2018), las cepas *O. anthropi* HM-1 y *C. freundii* HM-2 mostraron IE<sub>24</sub> de 97 y 94.7%, respectivamente, con 4% de NaCl.

Los Bs obtenidos de *E. cloacae* BAGM01 con características de estabilidad a altas temperaturas, amplia actividad de pH y tolerancia a concentraciones elevadas de NaCl hace que este producto sea muy prometedor para su uso en aplicaciones como la biorremediación de agua marina y la industria alimentaria, por nombrar algunos ejemplos.

#### **6.4 Conclusiones.**

Los Bs son moléculas anfifílicas capaces de actuar en diferentes ambientes. Sus características de CMC variable además de su estabilidad a diferentes temperaturas, pH y salinidad son factores determinantes para su aplicación.

El extracto crudo de Bs producido por *E. cloacae* BAGM01 presentan CMC 50 mg/L la cual es similar a la de una mezcla de ramnolípidos comercial, lo que favorece a actuar disminuyendo la TS y permitiendo la formación de micelas en presencia de sustratos hidrofóbicos.

Los Bs producidos por la cepa *E. cloacae* BAGM01 son capaces de presentar actividad en diferentes temperaturas, incluyendo temperaturas de esterilización (121°C) lo cual le confiere características deseables para ser utilizados en industrias como la alimentaria, la cosmética y la farmacéutica. Otros factores como el pH y la salinidad son de gran relevancia e interés de biotecnológico. El extracto crudo del Bs de *E. cloacae* BAGM01 presentó excelente actividad a rango de pH de 2 a 14. Presentando alta actividad de IE<sub>24</sub> a pH alcalinos y a concentraciones de sal de hasta 15 g/L, por lo que puede sustituir a los surfactantes químicos en la industria de los hidrocarburos en aplicaciones como la extracción mejorada de petróleo y en biorremediación.

# Capítulo VII

## 7.1 Análisis de la anotación funcional del genoma de *E. cloacae* BAGM01

### 7.1.1 Introducción

La síntesis de ramnolípidos ha sido descrita ampliamente para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* esta cepa produce ramnolípidos a través de tres reacciones principales. La primera involucra la síntesis del dímero de ácido grasos y de los ácidos grasos libres (HAAs) que parece estar ligado levemente a la membrana interna. La siguiente reacción es catalizada por enzima *RhB* ramnosiltransferasa usando DdTDP-L-ramnosa y un ácido hidroxialcanoato (HAA) como precursor para producir un mono-ramnolípidos. Estos compuestos se convierten en sustratos y se unen a dTDP-L-ramnosa mediante la enzima *RhC* que sintetiza el di-ramnolípidos como se observa en la figura 26 (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

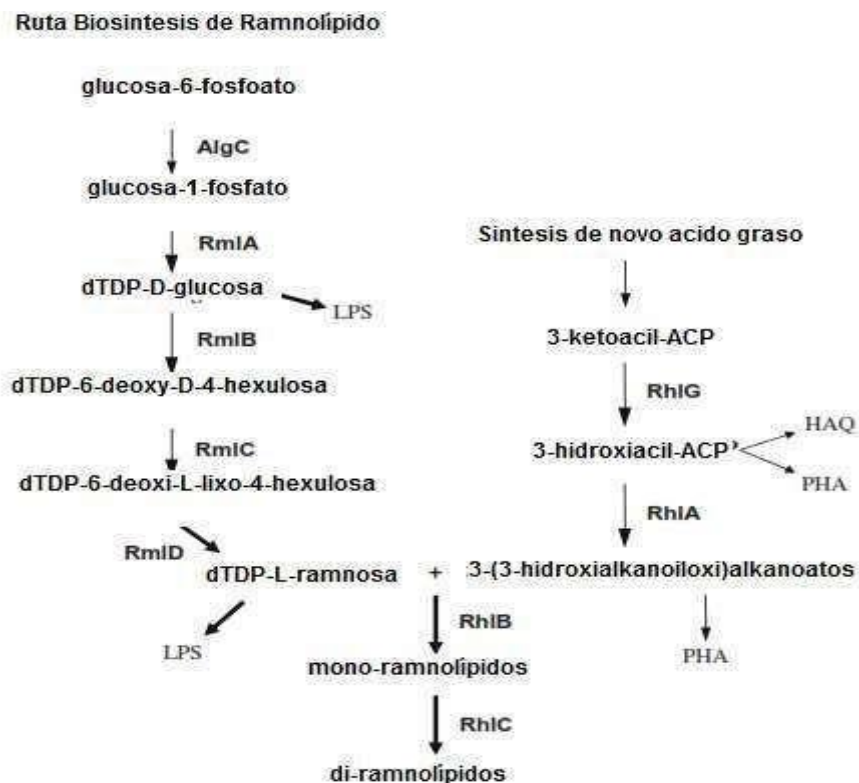


Figura 26. Ruta de síntesis de ramnolípidos (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

La enzima responsable del precursor de ácido graso es llamada RhlG y presenta una secuencia significativamente homologa con la secuencia de nicotidamida adenina dinucleotido fosfato dependiente de ketoacil reductadas. RhlG está específicamente involucrada en la producción y también afecta la síntesis de PHA. Fue recientemente reportado que RhlG está involucrada en proveer proteínas acarreadoras de grupo acil (ACP) que es un precursor de ácidos grasos para la biosíntesis de HAQs y que a su vez está relacionada con QS en cepas de *Pseudomonas* (Soberrón- Chávez *et al.*, 2005).

El dímero de  $\beta$ -HAA es formada por el RhlA subunidad del complejo RhlAB. Subsecuentemente RhlAB transfiere una molécula de L- ramnosa y forma el mono ramnolípidido. El complejo de enzimas responsable de la síntesis del di-ramnolípidido es la ramnosiltransferasa II (RhlC). En *P. aeruginosa* ambas enzimas se localizan separadas dentro del genoma, donde ambas cadenas de RhlAB están codificadas y co-expresadas entre el operón *rhl* ABRI el cual es controlado por acil homoserina lactona (AHL) dependiente del quórum sensing (QS).

En un grupo reducido de microorganismos carentes de la ruta de Embden- Meyerhof (glicolisis) la activación de L-ramnosa se deriva de la ruta de gluconeogénesis de la ruta de Entner-Doudoroff esta ruta metabólica cataliza de glucosa a piruvato usando una serie distinta de enzimas que las que intervienen en la glucolisis y en la ruta de la pentosa fosfato (Müller *et al.*, 2012).

Los principales subproductos de la ruta de síntesis de ramnolípidos incluyen poli-hidroxicanoatos, lipopolisacaridos (LPS) y exopolisacaridos, alginatos, y moléculas- QS como AHL y 4hidroxy-2-alkylquinolinas. Se ha reportado que los ácido

$\beta$ -hidroxidecanoicos son excretados por la célula y posteriormente tomados para la síntesis de los ramnolípidos y de polihidroxicanoatos (PHA) (Soberón- Chávez *et al.*, 2005)

La regulación de la producción de ramnolípidos a nivel genético consiste en un conjunto de interacciones muy complejas de densidad celular, mediadores AHL, QS, factor  $\alpha$  y regulador transcripcional (Müller, *et al.* 2012). (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). En la figura 27 se observa de manera simplificada la regulación de la producción de ramnolípidos.

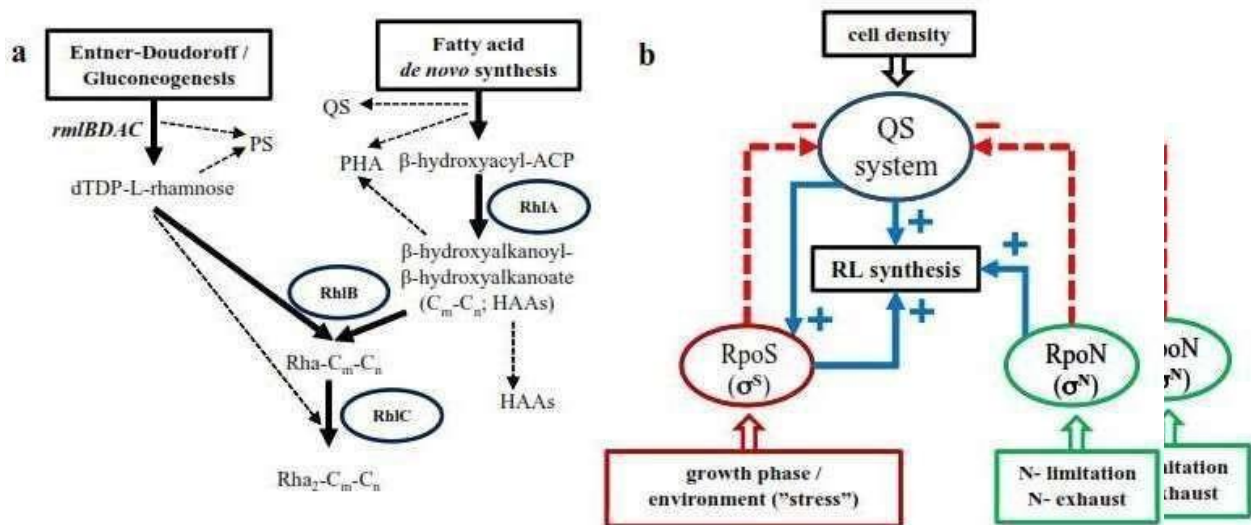


Figura 27. Regulación de la síntesis de ramnolípidos (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

## **7.2 Materiales y métodos**

### **7.2.1 Identificación de genes que participan en la síntesis de Bs y la degradación de alcanos.**

La secuencia del genoma de *E. cloacae* BAGM01 se obtuvo mediante servicios de secuenciación de nueva generación (NGS) de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN IBT-UNAM, México. La secuencia del genoma se depositó en la base de datos CIGoM. La anotación funcional del genoma de *E. cloacae* BAGM01 se realizó utilizando la tecnología de subsistema de anotación rápida RAST versión 2.0 (Aziz *et al.*, 2008) y el software ARTEMIS versión 17.0.1 <https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis> (Carver *et al.*, 2012).

Se realizó un análisis de múltiples alineamientos con el software Mauve este es un sistema utilizado para construir múltiples alineamientos genómicos en presencia de eventos evolutivos a gran escala, como reordenamientos e inversiones. Las alineaciones genómicas múltiples proporcionan una base para la investigación en genómica comparativa y el estudio de la evolución dinámica en todo el genoma (Darling *et al.*, 2010).

### **7.3 Resultados y Discusión**

#### **7.3.1. Anotación funcional del genoma de *E. cloacae* BAGM01 e Identificación de genes relacionados con la síntesis de ramnolípidos y la degradación de alcanos.**

El genoma de *E. cloacae* BAGM01 fue analizado y los resultados mostraron que este genoma está conformado con 5.034.410 pb, con un contenido de GC del 54,66%. El genoma está conformado por 4,739 secuencias codificantes de proteínas. El genoma codificó 64 tRNAs, 1 tmRNAs y no se encontraron plásmidos en la cepa.

*E. cloacae* BAGM01 muestra la presencia de actividad de Bs glicolípidos y la capacidad de crecer en diferentes hidrocarburos como hexadecano, keroseno y petróleo crudo. Este fue el precedente para la búsqueda e identificación de los genes responsables de ambas actividades.

Según los resultados de la anotación los genes involucrados en la producción de Bs glicolípidos específicamente aquellos de la síntesis de ramnolípidos, la degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, están presentes en el genoma de *E. cloacae* BAGM01.

##### **7.3.1.1 Anotación funcional de genes relacionados con la producción de ramnolípidos.**

Con el objetivo de detectar genes que participan en la síntesis de Bs glicolípidos, se realizó un análisis funcional del genómico de la cepa *E. cloacae* BAGM01. Se detectó un grupo o cluster de genes *rhIAB* que intervienen en diferentes etapas de la síntesis de ramnolípidos. Estos genes incluyen el gen *rhIA* que codifica la síntesis de 3 (3-

hidroxialcanoiloxi) alcanosatos (HAA), y el gen *rhB* que codifica la ramnosiltransferasa I que une a la desoxitimidin difosfato -L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa) al grupo HAA por enlace  $\alpha$ -glucosídico, para sintetizar mono-ramnolípidos, y también se observó su inductor homoserina lactona. Otros genes detectados fueron los que participan en la síntesis de ramnosa, también los que codifican para la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de lipopolisacáridos.

### **7.3.1.2 Anotación funcional de genes relacionados con la degradación de hidrocarburos.**

Los genes *alkAB* involucrados en la degradación hidrocarburos alifáticos. También fue anotada la presencia de múltiples genes de enzimas oxigenasas las cuales podrían actuar en las vías de degradación de hidrocarburos. Estos genes incluyen Quercetina 2,3-dioxigenasa, 3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxigenasa, alfa-ketoglutamato dependiente de taurina dioxigenasa, 3-fenilpropionata dioxigenasa, Fe (2+) /alfa-cetoglutarato dependiente dioxigenasa LpxO, 4,5-DOPA dioxygenasa estradiol (EC 1.13.11.29), 2-dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxygenasa, subunidad Vanillato O-demetilasa oxigenase. Existen reportes donde informaron la presencia de los genes *rhIAB* en *P. aeruginosa*, pero solo identificaron un gen involucrado en la degradación de alcanos *alkB* (tabla 11) (Leite *et al.*, 2015).

Los compuestos aromáticos podrían bioconvertirse en ácido salicílico por la acción de una serie de oxigenasas, hidroxilasas, reductasas y descarboxilasas, además, que los compuestos alifáticos pueden ser oxidados por las monoxigenasas. (Lan *et al.*, 2017). Otras enzimas que se identificaron en este estudio fueron lipasas y esterases que son importantes en el metabolismo de las sustancias hidrófobos

Tabla 11. Análisis de la anotación funcional del genoma de la cepa *E. cloacae* BAGM01.

Localización	Longitud secuencia	Descripción	
<b>Ramnolípidos</b>			
scaffold_130-size_59647_10645_9716	10645	9716	Alpha-L-Rha alpha-1,3-L-rhamnosyltransferasa (EC 2.4.1.-)
scaffold_130-size_59647_15278_14730	15278	14730	dTDP-4-dehidroramnosa 3,5-epimerasa (EC 5.1.3.13)
scaffold_130-size_59647_16160_15282	16160	15282	Glucosa-1-fosfate timidiltransferasa (EC 2.7.7.24)
scaffold_130-size_59647_17112_16213	17112	16213	dTDP-4-dehidroramnosa reductasa (EC 1.1.1.133)
scaffold_130-size_59647_18197_17112	18197	17112	dTDP-glucosa 4,6-dehidratasa (EC 4.2.1.46)
scaffold_130-size_59647_19447_18551	19447	18551	UTP--glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (EC 2.7.7.9)
<b>Degradación de hidrocarburos</b>			
scaffold_145-size_157375_19514_20170	19514	20170	Alpha-ketoglutarato-dependente de dioxygenasa AlkB (EC 1.14.11.33) alkA
scaffold_92-size_12080_3981_4832	3981	4832	3,4-dihidroxifenilacetato 2,3-dioxygenasa (EC 1.13.11.15)
scaffold_97-size_12925_11614_12462	11614	12462	Alpha-ketoglutarato-dependente de taurina dioxygenasa (EC 1.14.11.17)
scaffold_101-size_16843_11119_12027	11119	12027	Fe(2+)/alpha-ketoglutarato-dependente de dioxygenasa LpxO
scaffold_118-size_34174_32213_32914	32213	32914	Quercetin 2,3-dioxygenasa (EC 1.13.11.24) => YhhW
scaffold_133-size_69002_28251_27928	28251	27928	3-fenolpropionato dioxygenasa subunidad ferredoxin
scaffold_139-size_88439_48164_48952	48164	48952	4,5-DOPA dioxygenasa estradiol (EC 1.13.11.29), pero no fisiológico sustrato
scaffold_141-size_100937_40564_39374	40564	39374	Flavohemoglobina /oxido nítrico dioxygenasa (EC 1.14.12.17)
scaffold_33-size_130146_14675_15217	14675	15217	1,2-dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxygenasa (EC 1.13.11.54)
scaffold_133-size_69002_27612_26590	27612	26590	Vanillato O-demetilasa oxygenasa (EC 1.14.13.82)

#### 7.4 Genes metabólicos y fimbriales de la cepa *E. cloacae* BAGM01.

Otros genes interesantes relacionados con el desarrollo de procesos biológicos clave para la adhesión y colonización del huésped son los que codifican para biofilms y fimbrias (tabla 1). Las fimbrias se conocen como pili y está ampliamente distribuido en las *proteobacterias* de las cuales depende el éxito de la adhesión de la bacteria al huésped o a diversas superficies, incluso en presencia de hidrocarburos. La diversidad de las fimbrias contribuye a la variación en colonización y determinación del huésped de diferentes cepas de *E. cloacae*. Las fimbrias están ubicadas en la membrana externa las subunidades de fimbrias generalmente se ensamblan en estructuras de filamentos usando la vía de proteínas chaperonas. La presencia de múltiples genes de fimbrias indica que es probable que la cepa *E. cloacae* puede colonizar una amplia gama de huéspedes o entornos. La variación de fimbrias entre diferentes cepas de *E. cloacae* se espera que alteren la elección de los huéspedes o nichos ambientales que la cepa puede colonizar y contribuir, así a la diversidad de las especies (Liu *et al.*, 2013).

Otros genes detectados en este estudio codificaron enzimas interesantes como tres quitinasas, dos de las cuales eran adyacentes al sistema de secreción tipo II.

*E. cloacae* BAGM01 fue aislada de muestras de agua del GoM y estas enzimas podrían conferirle la capacidad de poder degradar la quitina presente en este ambiente, por lo que puede disponer de ella como fuente de energía.

Del mismo modo, la anotación muestra genes relacionados con la resistencia a tetraciclina y arsénico, toxinas, antitoxinas, una región conservada de la biosíntesis de

enterobactina, genes de producción y tolerancia de colicina V, biosíntesis de antibióticos (multidrogas) la anotación de estos genes se describe en la tabla 1. También se observaron genes de bacilomicina y emulsan. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos de la base de datos de antibióticos y metabolismo secundario "antiSMACH" (Medema *et al.*, 2011). Estos genes se pueden observar en la tabla 12.

Tabla 12. Análisis de la anotación funcional del genoma de la cepa *E. cloacae* BAGM01

Localización	Longitud secuencia		Descripción
<b>Sideroforos</b>			
scaffold_134-size_71498_65513_67255	65513	67255	Aerobactin synthasa (EC 6.3.2.39), aerobactin biosíntesis proteína lucC
scaffold_134-size_71498_68604_70793	68604	70793	Aerobactin sideroforo receptor lutA
scaffold_33-size_130146_55430_54102	55430	54102	Enterobactin esterasa
scaffold_33-size_130146_55447_57687	55447	57687	TonB-dependente de receptor de membrana externa para enterobactina férrica y colicinas B, D Exportado-
scaffold_33-size_130146_46855_45608	46855	45608	res de Enterobactin EntS
scaffold_33-size_130146_46964_47971	46964	47971	Sistema de transporte de enterobactina férrica permease proteína FepD (TC 3.A.1.14.2)
scaffold_33-size_130146_47968_48960	47968	48960	Sistema de transporte de enterobactina férrica permease proteína FepG (TC 3.A.1.14.2)
scaffold_33-size_130146_48957_49757	48957	49757	Transporte de enterobactina férrica proteína de unión a ATP FepC (TC 3.A.1.14.2)
<b>Quitinasas</b>			
scaffold_148-size_258057_222941_221088	222941	221088	Quitinasa (EC 3.2.1.14)
scaffold_148-size_258057_226370_223668	226370	223668	Quitinasa (EC 3.2.1.14)
scaffold_126-size_50865_33699_34955	33699	34955	Quitinasa (EC 3.2.1.14)
<b>Sistemas generales de secreción</b>			
scaffold_148-size_258057_228989_227910	228989	227910	Vía de secreción general proteína L
scaffold_148-size_258057_230072_229056	230072	229056	Vía de secreción general proteína K
scaffold_148-size_258057_230734_230069	230734	230069	Vía de secreción general proteína J
scaffold_148-size_258057_231105_230731	231105	230731	Vía de secreción general proteína I
scaffold_148-size_258057_231583_231098	231583	231098	COG2165: Vía secretora de Tipo II, pseudopilina PulG
scaffold_148-size_258057_234721_233243	234721	233243	Vía de secreción general de proteínas E
scaffold_148-size_258057_236663_234735	236663	234735	Vía de secreción general de proteínas D
scaffold_149-size_359542_330510_332243	330510	332243	Lipasa
scaffold_149-size_359542_153634_155100	153634	155100	Fosfolipasa A1
scaffold_14-size_83060_56580_57572	56580	57572	Lisofosfolipasa L2 (EC 3.1.1.5)

scaffold\_100-size\_15419\_14076\_13159            14076    13159    Lipasa, familia GDYG

**Producción de Colicina V**

scaffold\_148-size\_258057\_232032\_231583    232032    231583    Vía de secreción general proteína G; Tolerancia acolicina\_E2  
scaffold\_148-size\_258057\_233243\_232035    233243    232035    Vía de secreción general proteína F; Tolerancia\_a\_colicina\_E2  
scaffold\_148-size\_258057\_237449\_236676    237449    236676    Vía de secreción general proteína C  
scaffold\_35-size\_154553\_16174\_16308        16174    16308    Presucursor de Entericidina A  
scaffold\_35-size\_154553\_16417\_16563        16417    16563    Entericidina B

**Resistencia a Arsenico y Telurito**

scaffold\_95-size\_13400\_4369\_3938            4369        3938    Arsenato reductasa (EC 1.20.4.1) glutaredoxin-coupled, glutaredoxin-like family  
scaffold\_95-size\_13400\_5671\_4382            5671        4382    Bomba de proteínas de flojo de Arsenico  
scaffold\_95-size\_13400\_6027\_5707            6027        5707    Operon represor de resistencia arsenical  
scaffold\_12-size\_21355\_15165\_15518        15165       15518    Operon represor de resistencia arsenical  
scaffold\_12-size\_21355\_15566\_15928        15566       15928    Resistente arsénico operón represor transactivo ArsD  
scaffold\_12-size\_21355\_15946\_17697        15946       17697    ATPasa con bomba para Arsenico (EC 3.6.3.16) TEMP  
scaffold\_12-size\_21355\_17746\_19035        17746       19035    Proteína de la bomba de flujo de arsénico  
scaffold\_12-size\_21355\_19048\_19473        19048       19473    Arsenato reductasa (EC 1.20.4.1)  
scaffold\_131-size\_66370\_30671\_31855       30671       31855    Proteínas inductibles de Selenito y telurito TsgA  
scaffold\_12-size\_21355\_19908\_19504        19908       19504    ATPasa con bomba para Arsenico (EC 3.6.3.16) TEMP  
scaffold\_15-size\_114419\_46146\_45166       46146       45166    FIG005189:Transferasa putativa agrupada con proteínas de resistencia telurita TehA / TehB  
scaffold\_131-size\_66370\_30671\_31855       30671       31855    Proteína TsgA inducible por selenito y telurito  
scaffold\_15-size\_114419\_46269\_47270       46269       47270    Proteína de resistencia al telurito TehA  
scaffold\_15-size\_114419\_47270\_47863       47270       47863    Telurita metiltransferasa (EC 2.1.1.265)  
scaffold\_15-size\_114419\_50931\_51605       50931       51605    Lipoproteína de membrana no caracterizada agrupada con proteínas de resistencia telurito TehA /TehB

**Fimbrias**

scaffold\_116-size\_31419\_1165\_512            1165        512    CFA/I I chaperona fimbrial  
scaffold\_116-size\_31419\_2770\_1172           2770        1172    CFA/I adesina menor fimbrial  
scaffold\_116-size\_31419\_6695\_6072           6695        6072    CFA/I subunidad principal fimbrial  
scaffold\_116-size\_31419\_8590\_9174           8590        9174    Proteína fimbrial  
scaffold\_120-size\_37983\_23444\_23986        23444       23986    Proteína fimbrial tipo YadN  
scaffold\_120-size\_37983\_24049\_24786        24049       24786    Adesina Fimbrial cpD  
scaffold\_120-size\_37983\_27445\_28023        27445       28023    Proteína finbrial putativa

scaffold_120-size_37983_28048_28590	28048	28590	Proteína similar a fimbrial no caracterizada YadL
scaffold_120-size_37983_28590_29225	28590	29225	Proteína similar a fimbrial no caracterizada YadK
scaffold_120-size_37983_23444_23986	23444	23986	Proteína Fimbrial YadN
scaffold_120-size_37983_24049_24786	24049	24786	Adesina Fimbria EcpD
scaffold_120-size_37983_24852_27431	24852	27431	Proteína de membrana externa HtrE
scaffold_120-size_37983_27445_28023	27445	28023	Proteína fimbrial putativa
scaffold_139-size_88439_37747_36689	37747	36689	Proteína YbgO asociada al sistema fimbrial
scaffold_139-size_88439_38486_37731	38486	37731	Chaperona fimbrial periplásmica
scaffold_139-size_88439_41565_41008	41565	41008	Proteína similar a fimbrial putativa
scaffold_139-size_88439_42844_41780	42844	41780	Proteína asociada al sistema fimbrial no caracterizada YbgO
scaffold_139-size_88439_43578_42844	43578	42844	Chaperona fimbrial no caracterizada YbgP
scaffold_142-size_111846_100955_101518	100955	101518	Proteína similar a fimbrial no caracterizada SfmA
scaffold_142-size_111846_101587_102132	101587	102132	Adhesivo similar a las fimbrias FimI
scaffold_142-size_111846_102167_102859	102167	102859	Chaperone fimbrial SfmC
scaffold_142-size_111846_105452_106456	105452	106456	Proteína similar a fimbrial no caracterizada SfmH
scaffold_142-size_111846_106466_106990	106466	106990	Proteína similar a fimbrial no caracterizada SfmF
scaffold_142-size_111846_107674_107042	107674	107042	Regulador transcripcional de la expresión de fimbrias FimZ (LuxR/UhpA)
scaffold_30-size_184862_28897_29334	28897	29334	pilin PilA tipo IV
scaffold_30-size_184862_29347_30729	29347	30729	Conjunto de fimbrial tipo IV, ATPase PilB
scaffold_30-size_184862_30719_31903	30719	31903	Proteína de ensamblaje fimbrial tipo IV PilC
<b>Sistemas Multidrogas</b>			
scaffold_145-size_157375_151333_148256	151333	148256	Sistema de flujo de múltiples fármacos MdtABC-TolC,
scaffold_145-size_157375_154456_151334	154456	151334	Sistema de flujo de multidrogas MdtABC-TolC, inner-membrane proton/drug antiporter MdtB (RND)
scaffold_145-size_157375_155658_154456	155658	154456	Sistema de eflujo multidrogas MdtABC-TolC, componente de fusión de membrana MdtA
scaffold_148-size_258057_7362_8618	7362	8618	Proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtG
scaffold_26-size_154302_8911_5798	8911	5798	Sistema de eflujo de múltiples fármacos AcrEF-TolC, antipuerto de protones / fármacos de membrana interna AcrF (tipo RND)
scaffold_26-size_154302_10062_8923	10062	8923	Sistema de eflujo de múltiples fármacos AcrEF-TolC, componente de fusión de membrana AcrE

### 7.5. Análisis del metabolismo general la cepa *E. cloacae* BAGM01

Se realizó un análisis del metabolismo utilizando el genoma de *E. cloacae* BAGM01 y se observó que esta cepa lleva a cabo vías metabólicas generales como el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, cofactores, vitaminas y procesos celulares generales. Este análisis mostró la presencia de genes que codifican cofactores, vitaminas, pigmentos y grupos proteicos, genes que codifican células de pared y cápsula, genes que codifican para movilidad y quimiotaxis, genes que codifican el metabolismo de ácidos grasos, lípidos e isoprenoides y genes que codifican el metabolismo de los carbohidratos como se observa en la figura 28.

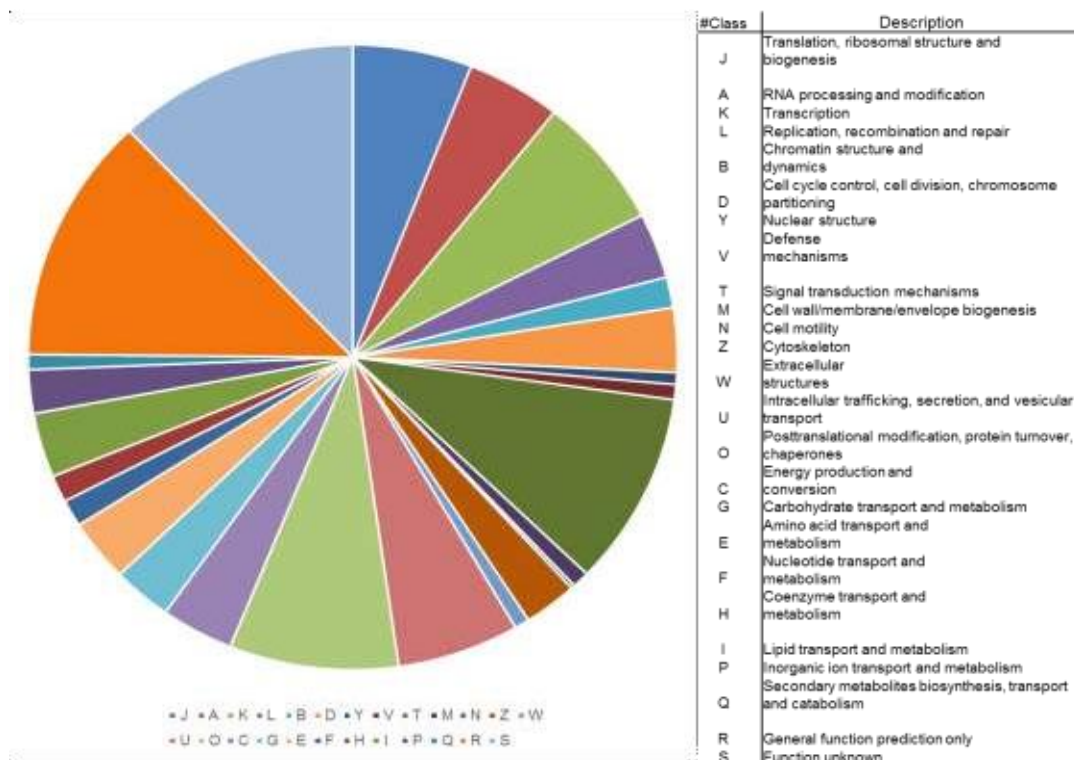


Figura 28. Metabolismo general de la cepa *E. cloacae* BAGM01

**7.6 Análisis de múltiples alineamientos de la secuencia genómica conservada con reordenamientos del genoma de la cepa *E. cloacae* BAGM01.**

Al genoma de *E. cloacae* BAGM01 se le realizó un análisis de múltiples alineamientos de la secuencia genómica conservada con reordenamientos (MAUVE versión 20150226) para la comparación a nivel genómico, en base a secuencias de tres cepas de *E. cloacae* disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Darling *et al.*, 2010). *E. cloacae* ATCC 13047 (es la única cepa que tenía 2 plásmidos) se usó como referencia de una cepa patógena, *E. cloacae* SDM se usó para la producción de 2, 3-butanodiol, *E. cloacae* ENHKU01 es un endófito de pepino de mar. El análisis de color de malva se utilizó para comparar la cepa de este estudio con otras tres cepas de Enterobacteriaceae; una cepa patógena, una cepa ambiental y un endófito. La cepa patogénica de *E. cloacae* ATCC 13047 contiene dos plásmidos de 0.2 y 0.08 Mb. Las cepas ambientales y endófitas no tienen plásmidos. En el contexto genómico, *E. cloacae* BAGM01 presentó un plásmido fragmentado en el andamio 118, que es muy similar al de *E. cloacae* ATCC 13047. *E. cloacae* BAGM01 también fue similar a las otras dos cepas posiblemente debido a su estilo de vida (Figura 29).

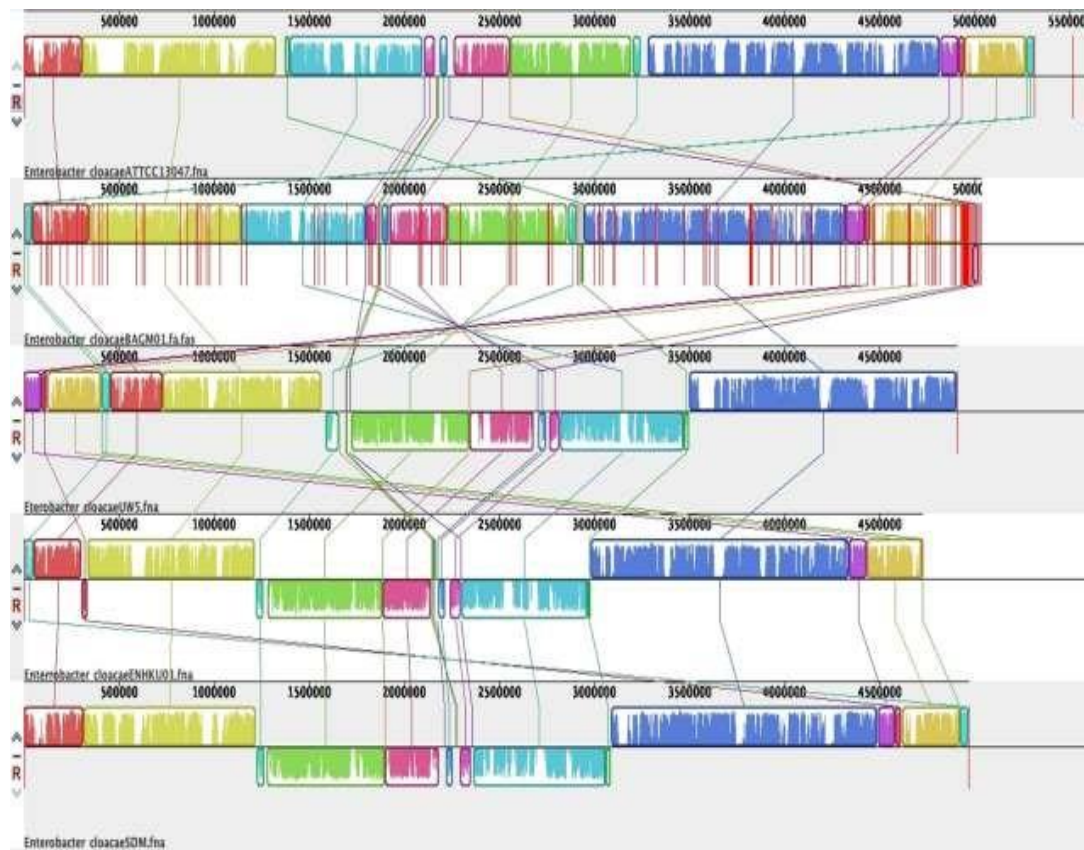


Figura 29. Análisis de múltiples alineamientos de secuencias genómicas conservadas con reordenamiento.

### **7.7 Conclusiones.**

En la Identificación de genes relacionados con la síntesis de ramnolípidos y la degradación de alcanos en la cepa *E. cloacae* BAGM01. Se analizó el genoma completo para buscar genes putativos responsables de la producción de Bs glicolípidos, como una forma de determinar si estos genes son los relacionados con la biosíntesis de ramnolípidos. El genoma de *E. cloacae* BAGM01 presentó un cluster de genes *rhIAB* relacionados con la producción de ramnolípidos. Además, se detectaron genes *alkAB* relacionados con la degradación hidrocarburos alifática.). Otras enzimas identificadas en este estudio incluyen lipasas y esterasas que son importantes en el metabolismo de los sustratos hidrófobos. Además, de genes que codifican para el metabolismo general y de adaptación que la cepa requiere para vivir en ambientes marinos.

# Capítulo VIII

## 8.1 Determinación de la estructura molecular de los ramnolípidos producidos por la cepa *E. cloacae* BAGM01.

### 8.1.1 Introducción

Los Bs incluidos los glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, polisacáridos y lípidos neutros, son compuestos activos de superficies producidos a través del metabolismo biológico.

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son capaces de producir Bs de diferente naturaleza química. Estas cepas pudieron coproducir varios lipopéptidos como iturinas, fengicina, kurstakin y surfactina. Sin embargo, no se ha descrito mucha información sobre surfactina producida por las cepas de esta familia solo hay un reporte sobre el componente producido por *Citrobacter* que se especuló que era una surfactina basado en masa molecular (Jia *et al.*, 2015).

Algunos trabajos han descrito la producción de diferentes isoformas pertenecientes a kurstakin y familias de surfactina por cepa de *E. cloacae*. Tres homólogos de kurstakin que difieren según la longitud de la cadena de ácido graso de C<sub>10</sub> a C<sub>12</sub> fueron detectados. El espectro de los lipopéptidos perteneciente a la familia surfactina contiene varias isoformas que se diferencian por la longitud de la cadena del ácido graso, así como los aminoácidos en las posiciones cuatro y siete (Jemil *et al.*, 2018). Otras especies de *Enterobacter* pueden producir otro tipo de Bs como ramnolípidos (Hošková *et al.*, 2013)

Para la identificación de estructuras químicas de Bs numerosas metodologías son empleadas. La caracterización estructural de Bs se divide comúnmente en dos partes, incluido el análisis de la cadena de ácidos grasos, la composición y secuencia de la cadena peptídica o del carbohidrato.

El método tradicional en el análisis de las cadenas de ácidos grasos es la resonancia magnética nuclear (RMN) y mediante cromatografía de gases-masa (GC-MS) después de la esterificación. Otros métodos para la elucidación de moléculas Bs son la espectrometría de masas de ionización por electroaspersión (ESI-MS) y el método de espectrometría de masas en tándem en tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (Q-TOF MS/MS) la cual puede deducir directamente la conexión de aminoácidos o la cadena peptídica de un lipopéptido sin hidrólisis o la posición del carbohidrato (Jemil *et al.*, 2018; Hošková *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2013).

## **8.2 Materiales y métodos**

### **8.2.1 Perfil de cromatografía de capa fina (TLC) de Bs BAGM01.**

La TLC se realizó en placas de silica gel 60 F255 (Merck Darmstadt, Alemania) utilizando las fracciones purificadas de Bs BAGM01. Se usó un sistema de disolvente de cloroformo: metanol: ácido acético (5: 1: 0,16) como fase móvil. Los compuestos se detectaron visualizándolos con luz UV (modelo UVP UVGL-25, CA, EE. UU.) y revelaron con sulfato cerico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N (López-Martínez *et al.*, 2011).

Para calcular el valor de Rf, se emplea la siguiente expresión:  $R_f = L_1/L_2$

L1: Distancia recorrida por la muestra, desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente. L2: Distancia de frente al solvente como se observa en la figura 30.

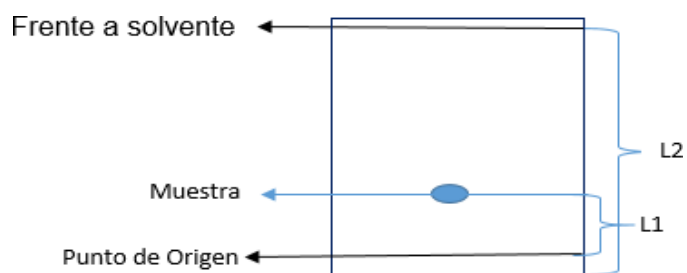


Figura 30. Placa de Cromatografía de capa fina (Montes-Dorantes 2015).

### 8.2.2 Método de derivatización y análisis por HPLC para la determinación de ramnolípidos en BAGM01 Bs.

El extracto crudo de Bs producido por *E. cloacae* BAGM01 y un estándar de ramnolípidos comerciales (AGAE, AGA062917b Sigma-Aldrich) se derivatizaron utilizando la técnica descrita por Schenk *et al*, (1995). Se mezclaron 100 mg de muestra liofilizada y el estándar con 125  $\mu$ L de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) y se agregaron 75 mg de *p*-bromoacetofenona (Aldrich, Steinheim, Alemania), esta mezcla se disolvió en 2 ml de acetona y se agitó durante 16 h a 20 °C. El éster derivatizado se obtuvo después de la filtración y evaporación del disolvente. Se analizó en un equipo HPLC Waters 900 usando una columna C18 (MA, EE. UU.) y un detector de arreglo de diodos. Se usó un gradiente de agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) como fase móvil: 4 min, A: B 3: 7 (v: v); 10 min, de 3:7 a 0:10; 9 min 0:10; 2 minutos de regreso a 3: 7. La HPLC se realizó a 25 ° C con flujo de 0.8 ml/min, inyección de 20  $\mu$ L de volumen de la muestra y a una longitud de onda de 210 nm (Schenk *et al*, 1995).

### 8.2.3 Análisis de espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN $^1\text{H}$ ).

El Bs BAGM01 purificado (extracción en fase solida fracción 60:40) se sometió a análisis adicional con resonancia magnética nuclear (1D RMN). La obtención del espectro

de RMN  $^1\text{H}$  se llevó a cabo utilizando equipo VARIAN Mercury de 400 MHz. La muestra fue solubilizada con metanol deuterado (Sigma Aldrich, Darmstadt Alemania). Se reportaron los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  en partes por millón. La asignación de las señales se llevó a cabo de acuerdo a la comparación de los datos reportados en la literatura para ramnolípidos (Twigg *et al.*, 2018; Wadekar *et al.*, 2012; Lotfadad *et al.*, 2010).

#### **8.2.4 Análisis de cromatografía de líquidos de ultra-resolución acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (UPLC-QTOF- MS)**

Los datos UPLC-QTOF-MS se obtuvieron en un equipo Agilent Technologies serie 1290 Infinity II con ionización por electroasperción (ESI) y con un detector modelo Q65F Agilent Technologies G6545 (CA, EE. UU.). Se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de Bs BAGM01 purificado (fracción 60:40) y se realizó la separación usando una columna Eclipse de 2,1 x 50 mm, en el modo de ionización negativa. Se utilizó una solución acuosa de formiato de amonio 0.1 mM y metanol (solventes de grado HPLC-MS de Sigma Aldrich), como fase móvil A:B respectivamente, 0-4 min 90:10 %, 4-5.50 min 90:10-0:100 %, 5.50-6.50 min, 0;10-90:10 %, con flujo de 0.25 mL/min. El rango de exploración de masas fue de 100 a 800 unidades de masa atómica (amu), mientras que un  $m/z$  503 se utilizó como objetivo (target) para la fragmentación.

### 8.3 Resultados y Discusión

#### 8.3.1 Perfil cromatográfico de capa fina (TLC) del ramnolípido BAGM01

En la caracterización por TLC del ramnolípido BAGM01, se observó la presencia de spots similares a los del estándar comercial de ramnolípidos (AGAE, AGA062917b Sigma-Aldrich). Con  $R_f$  de 0.23 a 0.77 Figura 31. Lotfabad *et al.*, (2010) obtuvo un patrón de  $R_f$  similar, 0.31 y 0.75, correspondiente a un di-ramnolípido y un mono-ramnolípido, respectivamente.

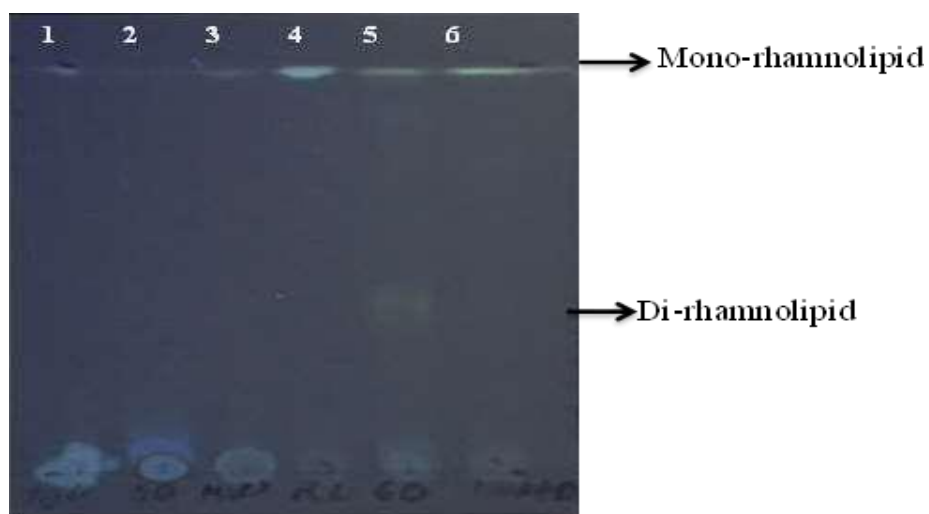


Figura 31. TLC de las fracciones obtenidas del extracto crudo de *E. cloacae* BAGM01 revelado con UV a longitud de onda corta, 1) Fracción 100% H<sub>2</sub>O, 2) Fracción 80: 20% 3) Extracto crudo BAGM01, 4) Control de ramnolípidos, 5) Fracción 60: 20%, 6) Fracción 100% metanol.

### 8.3.2 Método de derivatización y análisis por HPLC para la identificación de ramnolípidos producidos por *E. cloacae* BAGM01.

El ramnolípido comercial y el extracto crudo Bs BAGM01 se derivatizaron y se analizaron por HPLC. Los cromatogramas se visualizaron con un detector UV de los respectivos ésteres de *p*-bromofenacilo a 210 nm, como se muestra en la figura 32. La muestra del extracto crudo del Bs BAGM01 se observó en un tiempo de retención de 15.68 min (Figura 32A) y fue comparable con el tiempo de retención del ramnolípido comercial utilizado como referencia (Figura 32B).

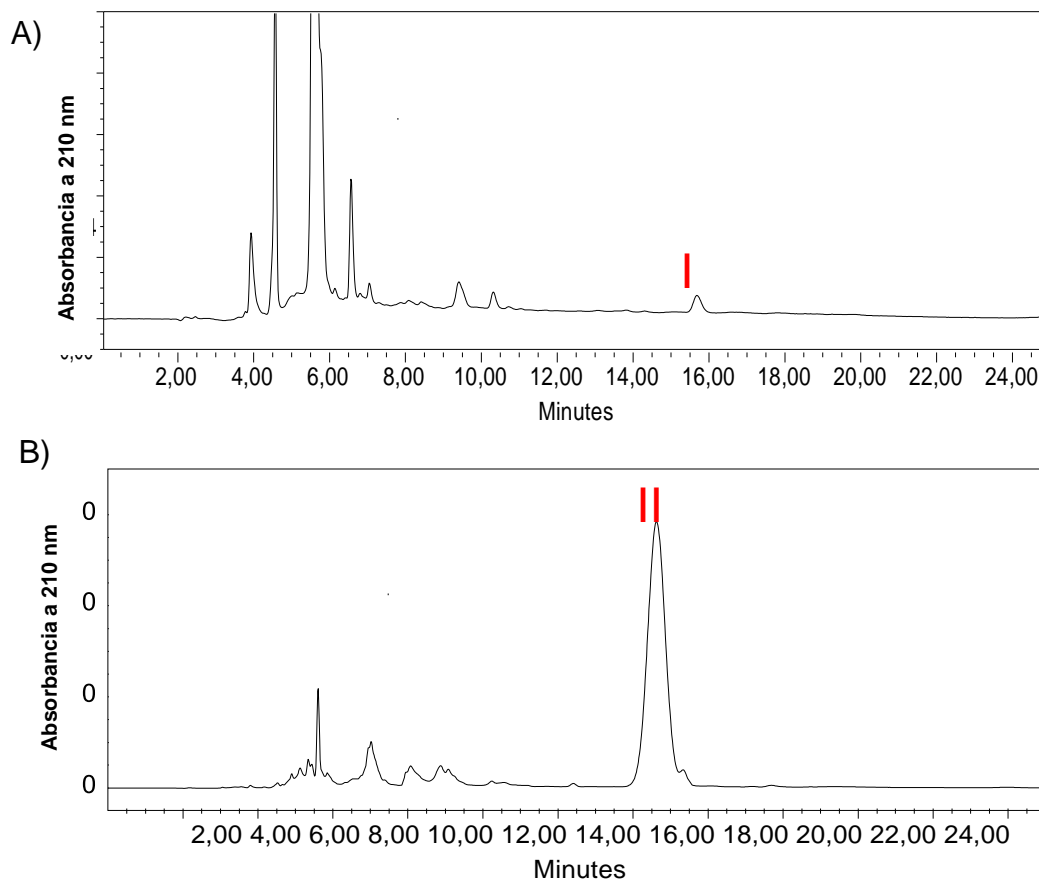


Figura 32. Caracterización de ramnolípidos por método HPLC-derivatización producidos por *E. cloacae* BAGM01. A) BAGM01 éster de Bs-*p*-bromofenacilo y B) compuestos de referencia ramnolípido-L- *p*-bromofenacil éster.

### 8.3.3 Análisis de espectroscopia de RMN $^1\text{H}$ del ramnolípido BAGM01.

Para determinar la estructura química, se llevó a cabo el análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$ . La Tabla 13 muestra los resultados del análisis del Bs BAGM01 purificado. Las señales químicas características del anillo de ramnosa presente en el ramnolípido consisten:  $\text{CH}_3$ - 1.11 ppm,  $\text{H}_2$  a  $\text{H}_5$  en un rango de 3.1-3.8 ppm y la parte de lipídica fue detectada por los desplazamientos químicos 0.91 ppm  $-\text{CH}_3$ , 1.25 ppm  $-(\text{CH}_2)_n$ , 2.4, 2.5 ppm  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ .

Tabla 13. Asignaciones químicas del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ramnolípidos purificados en  $^1\text{H}$  producidos por *E. cloacae* BAGM01.

Asignación	Desplazamiento químico $^1\text{H}$ (ppm) Ramnolípido BAGM01
$-\text{CH}_3$	0.91
$-(\text{CH}_2)_n$	1.28
$\text{CH}_2-\text{COO}-$	2.4 a 2.5
$-\text{CH}_3(\text{ring})$	1.11
$-\text{H}$	4.21
$\text{H}_2$ a $-\text{H}_5$	3.1- 3.8

La figura 33 (espectro RMN  $^1\text{H}$ ) muestra el desplazamiento químico por los glicolípidos del tipo de ramnolípidos producidos por *E. cloacae* BAGM01.

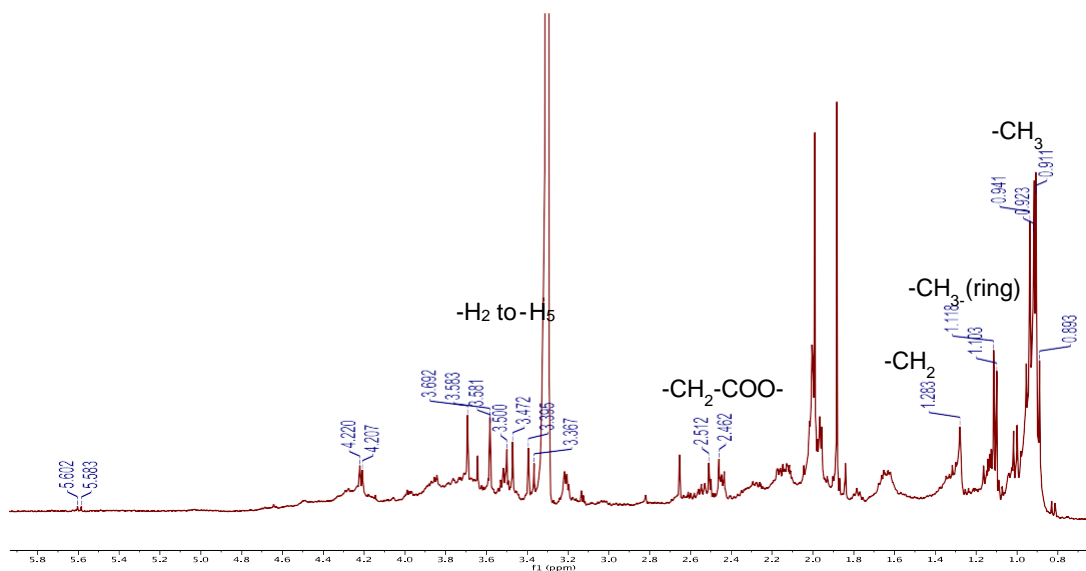


Figura 33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ramnolípido por *E. cloacae* BAGM01 aislado de GoM.

### 8.3.4 Cromatografía líquida ultra presión acoplado a análisis de espectrometría de masas con tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (UPLC-QTOF-MS)

La presencia de congéneres de ramnolípidos se determinó a través de un análisis UPLC-MS/MS en modo de escaneo automático. A partir de esto, se detectaron congéneres de seis mono-ramnolípidos y cuatro di-ramnolípidos con dos cadenas de ácido graso  $\beta$ -hidroxil con base en análisis de ESI-MS / MS. La longitud de la cadena del hidroxil ácido varió entre homólogos  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{12:1}$ ,  $\text{C}_{16}$ ,  $\text{C}_{18}$ . Se observó que los congéneres predominantes son mono-ramnolipídicos. Los congéneres de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos se muestran en la Tabla 14. Además, de este análisis, Rha- $\text{C}_{10}$ -  $\text{C}_{10}$  fue el principal ramnolípido identificado por la aparición de señales de los iones moleculares en  $m/z$  503, la cual se utilizó para observar la fragmentación en el análisis target MS/ MS como se observa en la figura34.

Tabla 14. Composición química de variedades de ácidos grasos en los congéneres de ramnolípidos producidos *E. cloacae* BAGM01.

Congéner ramnolípidos	M-H ( <i>m/z</i> )
Mono-ramnolípidos	
Rha-C8-C10	475
Rha-C10-C8	555*
Rha-C10-C10	503
Rha-C10-C12	531
Rha-C14-C12	588
Rha-C18-C18	728
Di-ramnolípidos	
Rha-Rha-C10-C12:1	676
Rha-Rha-C10-C12	678
Rha-Rha-C12-C12	706
Rha-Rha-C16-C16	818

\*M+Br<sup>-</sup>

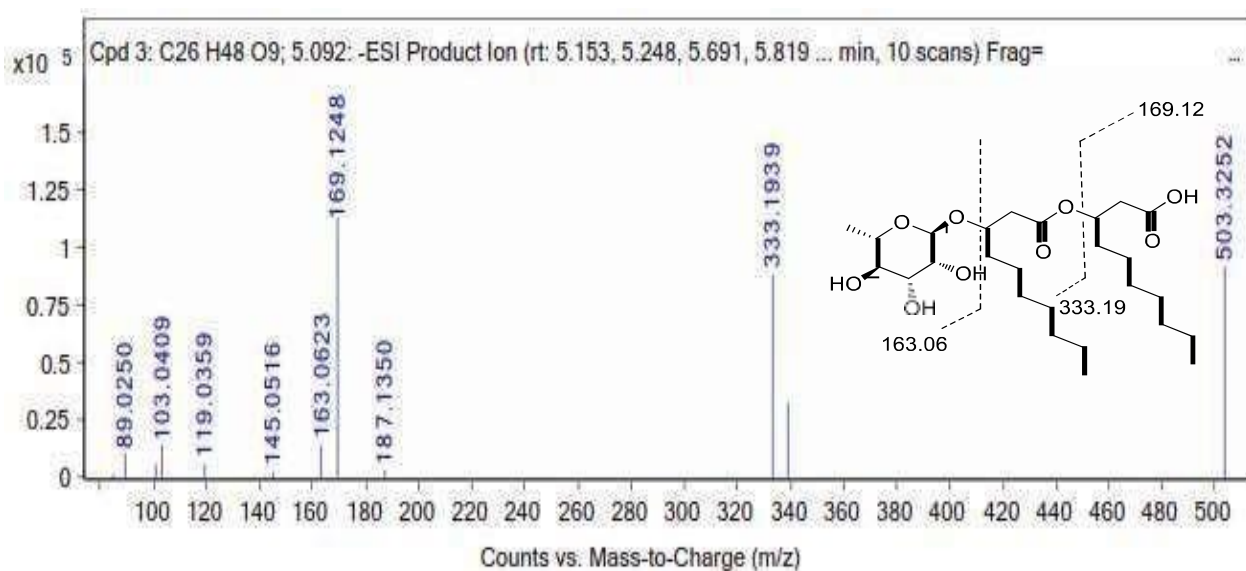


Figura 34. Espectro de fragmentación de ESI-MS/MS en modo de ion negativo del ramnolípidos (Rha-C10-C10) (*m/z* 503) producidos por *E. cloacae* BAGM01.

Para obtener la estructura química de los Bs sintetizados por *E. cloacae* BAGM01, el extracto purificado se analizó por TLC, se derivatizó y se analizó por HPLC, se obtuvieron experimentos de espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  y un análisis de cromatografía líquida de ultra presión acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de triple cuadrupolo (UPLC-QTOF-MS). Se derivatizó el extracto crudo de Bs BAGM01 y se usó un estándar comercial para identificar los compuestos presentes en cada señal en el cromatograma y confirmar la presencia de ramnolípidos. Los cromatogramas de la muestra presentaron una señal en un tiempo de retención similar al estándar. Señales adicionales aparecieron en los cromatogramas, pero de acuerdo con sus respectivos espectros UV, no se identificaron como otros ramnolípidos. Posiblemente, se trata de otros productos microbianos presentes en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Schenk *et al.*, (1995) y Mata-Sandoval *et al.*, (1999), quienes realizaron un trabajo con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Los desplazamientos químicos característico basado en  $^1\text{H}$  NMR indicó que la muestra purificada tenía la estructura molecular de un ramnolípidos, en comparación con el resultado de Lotfabad *et al.*, (2010) y Pereira *et al.*, (2012).

Para confirmar la estructura, se realizó un análisis UPLC-QTOF-MS con el fin de determinar los fragmentos en los ramnolípidos tipos de grupos funcionales, de los diferentes elementos en la molécula. Este enfoque permitió la identificación de la longitud de la cadena de ácido graso, su ubicación en la estructura del ramnolípidos y confirmar la presencia de la unidad ramnosa. Esto se observó mediante la presencia de los iones  $m/z$  333, 169 y 163 lo que confirman que el congénere predominante fue un Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>.

Estos resultados demuestran que los Bs producidos por *E. cloacae* BAGM01 son, ramnolípidos. De los congéneres de ramnolípidos producidos por esta cepa la molécula predominante fue el mono-ramnolípidos (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>). Este congéner principal, junto con otros congéneres de ácidos grasos fueron similares a los reportados por Lotfabad *et al.*, (2010). Sabturani *et al.*, (2016) mencionaron en su trabajo que los di-ramnolípidos son el componente predominante en la mezcla de ramnolípidos producida por *Pseudomonas* sp. En este trabajo observamos que *Enterobacter cloacae* BAGM01 produce congéneres de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos, siendo el Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> el congéner predominante.

Finalmente, la capacidad de *E. cloacae* BAGM01 para crecer en sustratos hidrofílicos e hidrofóbicos además de en ambientes marinos son características que dan lugar a la producción de metabolitos secundarios, incluidos los ramnolípidos con una actividad tensoactiva y emulsificante atractiva además de una alta estabilidad, lo que los convierte en candidatos prometedores para su aplicación en diferentes industrias. Sarafzadeh *et al.*, (2013), al igual que Jadhav *et al.*, (2011), establecen que *Enterobacter cloacae* es una bacteria productora de Bs que tiene efecto sobre la tensión interfacial consideran que el Bs que produce es efectivo para utilizarse en la extracción mejorada de petróleo y biodegradación.

#### **8.4 Conclusiones**

Las moléculas Bs son de diversa naturaleza química como lo son lipopéptidos, exopolisacáridos, fosfolípidos y glicolípidos.

El Bs BAGM01 purificado producido por la cepa *E. cloacae* BAGM01 presenta un perfil cromatográfico similar a los de un estándar de una mezcla de ramnolípidos, mediante el análisis de TLC y derivatización-HPLC.

En el análisis de <sup>1</sup>H RMN mostró la presencia de señales químicas que corresponden a los grupos característicos de una molécula de ramnolípidos. Lo cual se corroboró por medio de un análisis de UPLC-QTOF-MS lo que permitió la identificación de una mezcla de congéneres de mono y di-ramnolípidos cuyas estructuras están formadas por unidades de ramnosa unida a dos cadenas de ácidos grasos que varían su longitud de 8 hasta 18 átomos de carbono. El congener que se observó mayoritariamente fue el Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>.

# Capítulo IX

## 9.1 Degradación de hidrocarburos por la cepa *E. cloacae* BAGM01

### 9.1.1 Introducción

Los bajos niveles de biodisponibilidad y de biodegradación de los compuestos hidrofóbicos han repercutido en el éxito de los procesos de biorremediación. Los tratamientos que implican el uso de microorganismos y sus productos metabólicos ocupan importante espacio en la industria petrolera, desde hace cinco décadas. La diversidad bacteriana en ambientes marinos y sus diferentes procesos de producción de metabolitos secundarios como los Bs, favorecen la degradación de hidrocarburos (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes ambientales ubicuos generados a partir de procesos naturales, como antropogénicos y generan riesgos a la salud de la vida acuática y de los humanos a través de la bioacumulación. Los HAP son compuestos hidrofóbicos y fácilmente adsorbidos en partículas de materia orgánica y, por lo tanto, los sedimentos costeros y marinos se convierten en los mejores receptores de estos compuestos (Arulazhagan *et al.*, 2010).

La biodegradabilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno, el fluoreno, el antraceno se ha investigado usando consorcios bacterianos halotolerante aislado del medio marino (Hua *et al.*, 2015)

Se han aislado potenciales bacterias hidrocarbonoclastas que pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae*.

La mayoría de los compuestos de hidrocarburos son tóxicos en los ambientes terrestres y acuáticos. Se utilizan métodos físicos y químicos para la eliminación de contaminantes del medio ambiente. Sin embargo, la biorremediación que es un pro

ceso biológicamente mediado para eliminar contaminantes del ambiente. Esto implica la mineralización microbiana de polímeros complejos en componentes inorgánicos simples como el dióxido de carbono. Este método utiliza las capacidades metabólicas de los microorganismos para remediar ambientes contaminados. Estos esquemas se centran en estimular microbios autóctonos (bioestimulación) o por la introducción de especies microbianas exógenas (Nkanang *et al.*, 2018).

## **9.2 Materiales y métodos**

### **9.2.1 Ensayos de degradación**

Se realizaron cultivos con la cepa *E. cloacae* BAGM01 en medio líquido con volumen de trabajo de 20 mL de medio mineral (Sari *et al.*, 2016), 500 ppm de hidrocarburos libres de asfáltenos. Los tratamientos fueron: control abiótico, *E. cloacae* BAGM01 más biosurfactante y finalmente *E. cloacae* BAGM01; los ensayos se realizaron por triplicado a 30 °C y 150 rpm durante 15 días. La extracción se realizó con el sobrenadante libre de células al cual se le añadió partes iguales de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) grado HPLC (Sigma Aldrich), los extractos se pasaron por una columna de sulfato de sodio. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un cromatografo de gases Hewlett Packard, modelo HP5890 Series II equipado con detector de ionización de flama (FID), con una columna ultra 1 crosslinked/metilsilicona (25.5 m largo x 0.32 mm de diámetro interior; proporción de fase 150 y un espesor de 0.52 µm) marca Hewlett Packard. La velocidad del flujo del gas acarreador Helio 0.55 ml/min, con inyección de 1 µL de la muestra, tiempo de corrida de 31.5 minutos a una velocidad de entre 10 y 20 °C/min a 150 y 300 °C (Muñoz, 2015).

### **9.3 Resultados y Discusión.**

Se determinó la capacidad de la cepa *E. cloacae* BAGM01 para degradar petróleo crudo libre de asfáltenos. Se analizaron los perfiles cromatográficos de la cepa, del tratamiento abiótico y de la cepa más un surfactante sintético. En la figura 35 se presentan el perfil cromatográfico del control abiótico y el perfil de degradación de *E. cloacae* BAGM01. En las figuras 35 A y B Se observa una disminución en el área comparado con el control abiótico, lo que nos indica que la cepa es capaz de degradar los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo. Cuando se compara la degradación de la cepa más el surfactante sintético (figura 35C) se observa de igual manera una disminución, pero es menor que la observaba en el perfil cromatográfico del tratamiento que contiene solo la cepa.

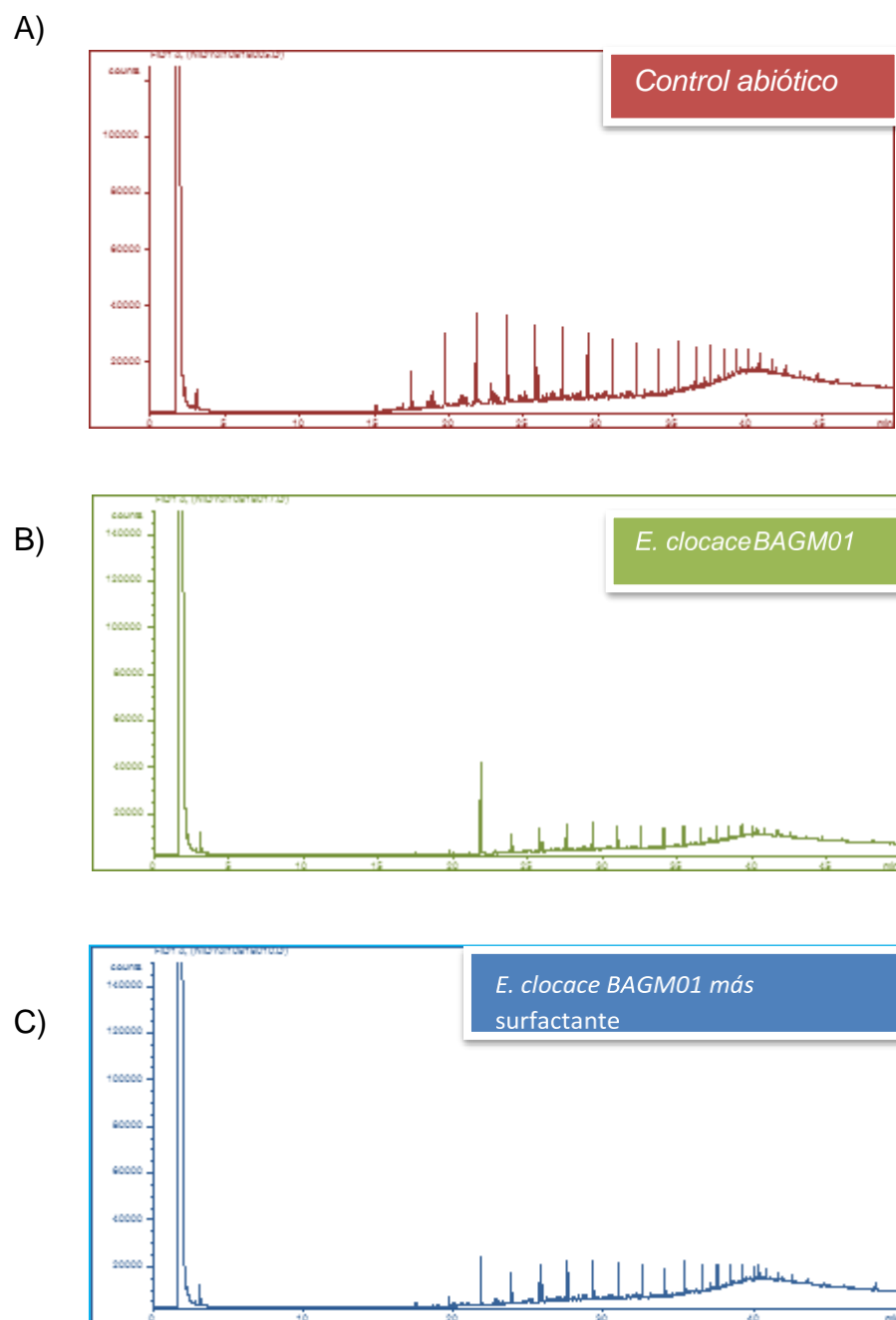


Figura 35. Perfil de degradación de petróleo libre de asfaltenos A) control abiótico, B) *E. cloacae* BAGM01 y C) *E. cloacae* BAGM01 más surfactante sintético 360 h, 150 rpm.

La cepa de *Pseudomonas* sp. P-1, aislada de suelo contaminado con hidrocarburos ha sido investigada por su capacidad para degradar hidrocarburos y producir Bs. Dicha cepa degrada, en las fracciones A5 y P3 de petróleo crudo, y hexadecano (27, 39, 27 y 13% de los hidrocarburos, fueron degradados respectivamente en medio de cultivo), pero no tiene la capacidad para degradar fenantreno (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2014). La combinación de estrategias eficientes de biodegradación y aplicación de Bs constituyen elementos claves para abordar la solución de problemas ecológicos derivados de los hidrocarburos en los cuales los microorganismos tienen un papel esencial (Raiger- Lustman y López, 2009).

La cepa *Enterobacter cloacae* TU durante su crecimiento en n-hexadecano como única fuente de carbono produce un exopolisacarido (ESP) extracelular que exhibe actividad emulsificante la cual favorece la biodisponibilidad de n-hexadecano y contribuye a la acelerada degradación de estos hidrocarburos (Hua *et al.*, 2010).

#### **9.4 Conclusiones**

Con este estudio se demostró que la cepa *Enterobacter cloacae* BAGM01 aislada de un ambiente marino puede emulsificar varios hidrocarburos y promueve la solubilización de hidrocarburos como hexadecano, diesel, petróleo crudo libre de asfáltenos mediante la producción de Bs.

# Capítulo X

## 10. Conclusiones finales.

Los ambientes marinos brindan una importante fuente de comunidades bacterianas que pueden producir compuestos con actividad Bs, dicha actividad se observa presente en los consorcios y cepas aisladas de muestras de agua y sedimentos marinos del GoM

Se observó actividad Bs en consorcios y cepas bacterianas aisladas de muestras de columna de agua y sedimentos. Se aislaron cepas de *Enterobacter cloacae*, siendo este el género predominante y ubicuo en todos los sitios y profundidades muestreados en el GoM. Los diseños experimentales se utilizaron para mejorar con éxito la producción de Bs por *E. cloacae* BAGM01 en términos de reducción de TS y IE<sub>24</sub>. El extracto crudo Bs BAGM01 se caracterizó y mostró una alta estabilidad en un amplio rango de temperaturas, pH y salinidad, presentando así un gran potencial de aplicación en diversas áreas biotecnológicas. El análisis genómico reveló la presencia de genes involucrados en la síntesis de ramnolípidos y otros que están participando en la degradación de hidrocarburos alifáticos, además de enzimas con actividad sobre sustratos hidrófobos. La caracterización estructural de los ramnolípidos producidos por *E. cloacae* BAGM01 fue corroborada por TLC, derivatización y análisis por HPLC, RMN <sup>1</sup>H y UPLC-QTOF-MS. Los ramnolípidos obtenidos de *E. cloacae* BAGM01 poseen características deseables y pueden competir con cualquier otro Bs y surfactante químico en numerosas aplicaciones.

**10.1 Perspectivas.**

- 1) optimizar la actividad Bs con la cepa *E. cloacae* BAGM01 como estrategia incrementar la producción de ramnolpidos.
- 2) Utilizar la herramienta de expresión heterologa para producir ramnolípidos con los genes de la cepa *E. cloacae* BAGM01.
- 3) Generar un análisis comparativo de la anotación funcional del genoma de las 8 cepas de *E. cloacae*.
- 4) Evaluar la producción de exopolisacáridos o Bs de naturaleza proteica de las cepas de *E. cloacae*.

# Capítulo XI

## 10.1 Bibliografía

- Ábalos-Rodríguez., A. (2010). Caracterización química de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a partir de residuos de aceite de soja mediante HPLC-EM. CENIC. 41: 155-159.
- Abbasi A, Amiri S. (2008) Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae* 7: 1574–1576. Afr. J. Biotechnol. 7:1574-1576.
- Arulazhagan P., Vasudevan N., Yeom IT. (2010). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. Int. J. Environ. Sci. Tech., 7 (4), 639-652.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BCM Genomics 9:1471-2164.
- Babcock-Adams L, Chanton JP, Joye SB, Medeiros PM (2017) Hydrocarbon composition and concentrations in the Gulf of Mexico sediments in the 3 years following the Macondo well blowout. Environ. Pollut. 229:329-338.
- Bahia FM, Carneiro de Almeida G, Pereira de Andrade L, Gonçalves Campos C, Rezende Queiroz L, Vieira Da Silva R L, Verardi Abdelnur P, Corrêa JR, Bettiga M, Skorupa Parachin N (2018) Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Sci. Rep. 8:1-10.
- Bergey DH, Krieg NR, Holt (2010) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore ©1984-©1989
- Batista-García R.A., Quesada-Quintero A.L., Sánchez-Reyes A., López-Guerra S., Domínguez-Sardiñas Z. (2011). Microbiología y biotecnología aplicadas a la exploración y producción petroleras. CENIC. 42: 35- 41.
- Berti D., Randazzo D., Briganti F., Baglioni P. (2000). Direct micellar systems as a tool to improve the efficiency of aromatic substrate conversion for fine chemicals production. J. Inorg Biotec.79: 103 – 108.
- Beltrán-Saavedra P.A. (2015). Precio del petróleo y el ajuste de las tasas de interés en las economías emergentes. Borradores de economía 901: 1-37.
- Campos-Calderón F., Solís-Miranda N. y García Fernández F. (2015) Prospección de

bacterias marinas con propiedad biosurfactante aisladas del golfo de nicoya, costa rica. *Biocenosis*. 29: 55-60.

Cassidy DP y Hudak AJ. (2002). Selection and performance in bioeslurry reactors treating PAH- contaminated soil. *Environ. Technol.* 23:1033 - 1042.

Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high throughput sequence based experimental data. *J. Bioinform.* 28: 464-469.

Christofi N., Ivshina I.B. (2002). A review. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Applied Microbiol.* 93: 915-929.

Cortes-Camargo S., y Barragan-Huerta B. (2013). Producción de Biosurfactantes por Microorganismos Halófilos. *Sistemas Ambientales*. 6: 1-8.

Cortés-Sánchez A. de J., Troconis-Torres Gl., y Jaramillo-Flores ME. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas*. 15: 16-23.

Covarrubias-Rodríguez M.B. (2016). Caracterización de las comunidades microbianas en sedimentos del Golfo de México, mediante análisis metagenómico. CICESE. Tesis:1-85.

Deshpande SA., Pawar S., Nyayanit NV., Satpute S. (2010). Glycolipid biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* scos 46 isolated from oil contaminated sites of Pune city. *ASTRJ*. 13:15-19.

Darling AE., Mau B., Perna NT. (2010) Progressive Mauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLoS ONE* 5: e11147.

Secretaria de Energía. 2012. Prospectiva de Petróleo Crudo 2012-2026.

García-Cruz NU, y Aguirre-Macedo ML. (2015). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Microbiol*: 641-652.

Gallimore W. (2017). Marine Metabolites: Oceans of Opportunity. *Pharmacogn. Mag.* 77-400.

Godoy-Lozano E., Escobar A, Raggi L., Merino E., Gutiérrez-Ríos R., Juárez K., Segovia L., Licea A., Gracia A., Sánchez-Flores A., Pardo-López L. (2018) Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Front Microbiol* 9: 2528

Gómez-Martínez M., Velázquez-Rodríguez L., Barragán R, Malagón-Romero G. (2012).

Obtención y caracterización de un biosurfactante sintetizado por *Pseudomonas* sp. usando aceite de cocina como sustrato. *Intekhnia* 7. 2: 133-141.

- Haba E., Bouhdid S., Torrego-Solana N., Marqués AM., Espuny MJ., García- Celma MJ., Manresa A. (2014). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharmaceut.* 476:134– 141.
- Hassanshahian M (2016) Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Mar Pollut Bull* 86: 361- 366.
- Holden PA., LaMontagne, MG., Bruce AK., Miller W. (2002). Assessing the role of *Pseudomonas aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Appl and Envir. Microbiol.* 68:2509-2518.
- Hošková M. Schreiberová O. Jez, Chudoba R., Masák, J. Rezanka T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresour. Technol.* 130: 510–516.
- Hua X., Wu Z., Zhang H., Lu D., Wang M., Liu Y., Liu Z. (2010). Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere* 80: 951–956
- Ibrahim HMM (2018) Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. *Egypt J Pet.* 27:21-29.
- Jadhav M., Kagalkar A., Jadhav S., Govindwar S. (2011). Isolation, characterization, and antifungal application of biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 1-12
- Jakovetić SM, Knežević-Jugović SZ, Grbavčić DI., Bezbradica N.S, Avramović, y Karadžić IM. (2013). Rhamnolipid and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* san-ai: The process comparison analysis by statistical approach. *Hem. Ind.* 54: 677–685.
- Jemil N, Hmidet N, Ayed HB, Nasri M (2018) Physicochemical characterization of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides and their applications in enhancing diesel oil biodegradation. *Process Saf Environ Prot* 117:399-407.
- Jia Y., Shi-Zhong Y., Bo-Zhong M. (2015). Structural characterization of lipopeptides from *Enterobacter* sp. strain N18 reveals production of surfactin homologues *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 890–898.
- Jiménez-Islas D., Medina-Moreno SA., Graciada-Rodríguez JN. (2010). Review: propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26: 65-84.

- Khemili-Talmi S, Kebbouche-Gana S, Akmoussi-Toumi S, Angar y Gana ML. (2015) Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles* 19:1109-1120.
- Kim KW., Kim IS y Park JS. (2001) Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Nonionic Surfactants in Soil Slurry. *J. Appl. Geochem.* 16: 1419 – 1428.
- Kiuru P., Muller CD., Vuorela H., Yli-kauhaluoma J. (2014). Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. *Plant. Med* 80:1234-1246.
- Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. (2012) Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardioopsis* sp. B4. *Desalination* 285:198-204.
- Klosowska-Chomiczewsk IE., Medrzycka K., Hallmann E., Karpenko E., Pokynbroda T., Macierzanka A., Jungnickel C. (2017). Rhamnolipid CMC prediction. *J. Colloid Interface Sci.* 488: 10–19.
- Lara-Lara RJ., Arenas-Fuente V., Bazán-Guzmán C., Díaz-Castañeda V., Escobar-Briones E., García-Abad M. del C., Gaxiola-Castro G., Robles-Jarero G., Sosa-Ávalos R., Soto-González LA., Tapia-García M., Valdez-Holguín E. 2008. Los ecosistemas marinos, en *Capital natural de México, Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México. 1:135-159.
- Leite GGF, Figueirôa JV, Almeida TCM, Valões JL, Marques WF, Duarte MDDC, Gorlach-Lira K. (2016). Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. *Biotechnol Prog.* 32: 262-270.
- Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C (2013) Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE* 8(9):1-15.
- López-Martínez S., Aguilar-Guadarrama A. Berenice., Rios MY. (2011) Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochem. Lett.* 4: 275-279.
- Lotfabad BT., Abassi H., Ahmadkhaniha R., Roostaazad R., Masoomi F., Zahiri HS., Ahmadian G., Vali H., Noghabi KA. (2010) Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. *Colloids Surf. B.* 81: 397-405.
- Medema MH., Blin K., Cimermancic P., Jager V., Zakrzewski P., Fischbach MA., Weber T., Breitling R. Takano E. (2011). antiSMASH: Rapid identification,

- annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 39:339–346.
- Maneerat, S. (2005). Review: Biosurfactants from marine microorganisms. *SJST* 27:1263- 1272.
- Maneerat S. y Phetrong K. (2007). Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant *SJST*. 29: 781-791.
- Martínez-Toledo A, Rodríguez-Vázquez R (2011) Response surface methodology (Box-Behnken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Ann Microbiol* 61: 605-613.
- Mata-Sandoval JC., Karns J., Torrents A. (2001). Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol. Res:* 249-256.
- Montes-Dorantes W. (2015). Producción de Biosurfactantes por cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* aislados de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis: 1-89.
- Müller MM., Kügler JH., Henkel M., Gerlitzki M., Hörmann B., Pöhnlein M., Syldatk C., Hausmann R. (2012). Rhamnolipids-Next generation surfactants? *J. Biotech* 162: 366–380.
- Nkanang AJ., Antai SP., Asitok AD., Ekpeniong M. (2018). Hydrocarbonoclastic potentials of Enterobacteriaceae isolated from the crude oil polluted Iko river estuary and freshwater ecosystem of the Niger Delta Region of Nigeria *GSCBPS*. 2:038-046.
- Oliveira MR., Camilios-Neto D., Baldo C., Magri A., Pedrine Colabone Celligoi, MA. (2014). Biosynthesis and production of sophorolipids. *I. J. Sci & Techny Res* 3:133-143.
- Olguín EJ., Hernández ME, y Sánchez-Galván G. (2012). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient* 23: 139-154.
- Ortega-de la Rosa DN., Vázquez-Vázquez JL., Huerta-Ochoa S., Gimeno M., Gutiérrez Rojas M. (2018) Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. *Bioproc Biosyst Eng* 41:859-869.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda, F.J. (2009). Interactions of a bacterial biosurfactant trehaloselipid with phosphatidylserine

membranes. Chem. Phys. Lipids 158: 46– 53

- Pacwa-Płociniczak M., Plaza G.A., Poliwoda A., Piotrowska-Seget A. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. Environ Sci Pollut Res. 21: 9385–9395.
- Pattanathu KS., Rahman M., y Edward G. (2008). Production, Characterization and Application of Biosurfactants: Review. Biotechnol. 7: 360-370.
- Pereira BL, Fernandes AFA., Galeno SS, Dos Santos JC, Venus J, Schneider R, Silvérión S (2017) Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. Bioresour. Technol. 243: 264-272.
- Pereira JFB, Gudeña EJ, Doria ML, Domingues MR, Rodrigues LR, Teixeira JA, Coutinho JAP. (2012) Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. EJMS. 18: 399-406.
- Pérez-Vargas JO., Anaya-Reza C., Kikey C., Solis I., Membrillo-Venegas y G Calva-Calva. (2010). Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. Revista CENIC. Ciencias Químicas 41: 1-9.
- Petit AK., Colina LJ., Yegres EF., Moran GH., Richard-Yegres N. (2013).  
Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. Revis. Química Viva 12:1-17.
- Raiger-Lustman LJ., y López NI. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. Revis. Química Viva 8: 146-161.
- Riojas-Gonzalez HL., Torres I., Moncada JJ., Balderas, Gortáres-Moroyoqui P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Redalyc 9:120-145.
- Rosero, N.G., Dugarte, F., Pimienta, A., Díaz, M.P., Carvajal, F.G. (2014). Producción de un tensoactivo biológico. Rev Colomb Biotecnol. V 4: 22-28.
- Rosas-Gálvan, N. SN, Martínez-Morales F, Marquina-Bahena S, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Bertrand B, León-Rodríguez R, Guzmán-Aparicio J, Álvarez-Berber L, Trejo-Hernández MR (2018) Improved production, purification and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain. Biotechnol Appl Biochem 69: 690-700.

- Rufino, R.D, Moura de Luna, J., Campos-Takaki, G.M. Sarubbo L.A., (2014). Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron J Biotechn.* 17: 34-38.
- Roldán-Carrillo T, Martínez-García X, Zapata-Peñasco I, Castorena-Cortéz G, Reyes-Avila J, 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. *Colloids Surf B.* 86:384-389.
- Sabturani N. Latil, J. Radiman, S. Hanzah, A. (2016). Spectronic analysis of rhamnolipi produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *MJAS.* 20: 31-43.
- Saikia RR, Deka H, Goswami D, Lahkar J, Borah SN, Patowary K, Baruah P, Deka S (2014) Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. *J Surfactants Deterg* 17: 563- 571.
- Sammarco PW., Kolian SR., Warby RA., Bouldin JL., Subra WA., Porter SA. (2013). Distribution and concentrations of hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Mar Pollut Bull* 73: 129-143.
- Sarafzadeh P., Niazi A., Oboodi V., Ravanbakhsh M., Zeinolabedini Hezave A., Ayatollahi S., Raeissi S. (2013). Investigating the Efficiency of MEOR processes using *Enterobacter Cloacae* and *Bacillus, Stearothermophilus* SUCPM (Biosurfactant Producing Strains) in Carbonated Reservoirs. *J Petrol Sci Eng.* 113: 46-53.
- Sari M., Kusharyoto W., Artika I. (2014) Screening for biosurfactant-producing yeast: confirmation of biosurfactant production. *Biotechnol.* 13:106-111.
- Sastoque-Cala L., Pedroza-Rodríguez AM., Cotes-Prado AM. (2014). Selección de condiciones para la producción de un biosurfactante empleado a *Pseudomona fluorescens* aislados de cultivos de fique en Colombia. Bogota Colombia: Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería: 25-29.
- SENER. (2012). Prospectiva de petróleo crudo y petrolíferos 2013-2027.» Secretaría de Energía.
- Siegmund I., Wagner F. (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted *Pseudomonas* species During Growth on Mineral Agar. *Biotechnol Tech* 5:265- 268.
- Singh A., Van Hamme JD., Ward OP. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology, Part 2 Applications aspect. *Biotechnol. Adv* 25: 99- 121.
- Soberón-Chavéz G., Lépine F., Déziel E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68:718–725.
- Soberón-Chavez G., Medina G., Juárez K., Valderrama B. (2007). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional Regulation of the rhlAB Promoter. *J.*

Bacteriol. 185: 5976–5983.

Soares Dos Santos A., Pereira JN., Freire DM. (2016) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. PeerJ 4: 1-16.

Sulbarán-Mora M., Bahsas A., Velásquez., Otoniel-Rojas J. (2005). Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas Fluorescentes* aisladas de emulsión de petróleo pesado. J. Cientific. 13: 228 - 239.

Schenk T, Schuphan I, Schmidt B, (1995). High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Chromatogr. A. 693:7-13

Thavasi R., Jayalakshmi S., Banat IM. (2010). Biosurfactants from marine bacterial isolates. Curr. Res, Technol. and Educ. Topics in Appl. Microbiol and Microbial Biotech:1367-1373.

Twigg MS., Tripathi L., Zompra A., Salek K., Irorere VU., Gutierrez T., Spyroulias GA, Marchant R, Banat IM (2018) Identification and characterization of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102: 8537-8549.

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Vargas-Albores F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. Ciencias Marinas 41: 297–313.

Wadekar SD., Kale SB., Lali AM., Bhowmick DN., Pratap AP. (2012) Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. Prep. Biochem. Biotechnol. 42: 249–266.

Wei YH., Lai H-Ch., Chen S.-Y., Yeh MS., Chang JS. (2004). Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SMΔR defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. Biotechnol Lett. 26: 799- 802.

Yussef N., Simpson DR., Duncan KE., McInerney M. (2007). In situ biosurfactant production by Bacillus strains injected into limestone petroleum reservoir. Appl Environ Microbiol. 73:799-802.

# Anexos

**Anexos.**

Anexo 1. Tabla de sitios de muestreo de agua y sedimentos de origen marino: profundidad y muestreo.

Estación	Muestra	Profundidad (m)	Latitud (Grad/min)	Longitud (Grad/Min)	Fecha de muestreo
A1	MC	61	25° 52.446' N	95° 50.611' W	2016-03-04 T 15:34
	mO2	253			
	1000m	no			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	879			
A2	MC	52	25° 52.806' N	95° 50.452' W	2016-03-04 T 02:46
	mO2	356			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	2066			
A3	MC	73	25° 53.004' N	95° 32.908' W	2016-03-05 T 22:08
	mO2	388			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	2390			
A4	MC	67	25° 52.848' N	94° 40.116' W	2016-03-06 T 06:59
	mO2	430			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	2966			
B5	MC	30	25° 38.427' N	96° 15.958' W	2016-03-11 T 23:05
	mO2	380			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	550			
B6	MC	50	25° 38.446' N	95° 52.006' W	2016-03-12 T 23:40
	mO2	350			
	1000m	no			
	Fondo	sed-20			

Anexos

	Sedimento	1018			
B7	MC	60	25°38.271' N	95° 34.872 W	2016-03-13 T 02:41
	mO2	350			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	1210			
B8	MC	40	25° 38.432' N	95° 15.079' W	2016-03-13 T 12:24
	mO2	350			
	1000m	1000			
	Fondo	2403			
	Sedimento	2700			
B9	MC	55	25° 38.387' N	95° 00.008' W	2016-03-06 T14:09
	mO2	400			
	1000m	1000			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	2946			
C10	MC	55.1	19° 10.328' N	93° 17.961' W	2016-03-23 T: 23:49
	mO2	400			
	1000m	NO			
	Fondo	sed-20			
	Sedimento	717			
C11	MC	48	18° 36.773' N	93° 30.150' W	2016-03-24 T:13:38
	mO2	390			
	1000m	NO			
	Fondo	860			
	Sedimento	881			
C12	MC	64	20° 01.188' N	93° 46.160' W	2016-03-25 T:01:25
	mO2	346			
	1000m	1000			
	Fondo	1317			
	Sedimento	1329			
C13	MC	65	20° 36.093' N	94° 17.520' W	2016-03-18 T: 04:36
	mO2	456			

	1000m	1000			
	Fondo	1875			
	Sedimento	1887			
C14	MC	82	20° 43.623' N	94° 44.610' W	2016-03-16 T 23:51
	mO2	430			
	1000m	1000			
	Fondo	3180			
	Sedimento	3205			
D15	MC	69	19° 09.757' N	93°36.260' W	2016-03-19 T: 08:36
	mO2	410			
	1000m	NO			
	Fondo	609			
	Sedimento	622			
D16	MC	59	19° 02.877' N	94° 00.038' W	2016-03-19 T: 14:34
	mO2	340			
	1000m	NO			
	Fondo	686.3			
	Sedimento	697			
D17	MC	72	19°36.665' N	94° 04.788' W	2016-03-19 T: 03:17
	mO2	380			
	1000m	NO			
	Fondo	800			
	Sedimento	900			
D18	MC	76	19° 55.777' N	94° 20.439' W	2016-03-18 T: 11:38
	mO2	410			
	1000m	1000			
	Fondo	1300			
	Sedimento	1320			

Anexo 2. Análisis de varianza de los efectos de los factores nutricionales y de cultivo sobre % de reducción de TS

Fuente	Suma cuadrados	GL	Media cuadrada	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	102.23	4	25.55	12.55	0.03	significativo
C-Sacarosa	54.08	1	54.08	26.57	0.01	
D-Temperatura	21.78	1	21.78	10.70	0.04	
E-Extracto de lev	10.12	1	10.12	4.97	0.11	
G-NaCl	16.24	1	16.24	7.98	0.06	
Residual	6.105	3	2.03			
Cor Total	108.33	7				

Anexo 3. Análisis de varianza de los efectos de los factores nutricionales y de cultivo sobre la % índice de emulsión.

% Índice de emulsión						
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Media cuadrados	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	732.30	5	146.46	87.96	0.011	significativo
B-Hexadecano	8.40	1	8.40	5.04	0.15	
C-Sacarosa	2.20	1	2.20	1.32	0.36	
D-Temperatura	361.80	1	361.80	217.30	0.00	
E-Extracto de lev	29.64	1	29.64	17.80	0.058	
G-NaCl	330.24	1	330.24	198.34	0.005	
Residual	3.33	2	1.66			
Cor Total	735.63	7				

Anexo 4. Análisis de varianza de la reducción de la tensión superficial por *Enterobacter cloacae* BAGM01  $\alpha=0.05$ . Diseño Box Behnken.

Fuente	Suma cuadrados	df	media cuadrados	F Valor	p-valor Prob > F	
Model	1314.54	9	146.06	4.92	0.03	Significativo
A-Sacarosa	105.12	1	105.12	3.54	0.10	
B-Temperatura	24.85	1	24.85	0.83	0.39	
C-NaCl	120.90	1	120.90	4.07	0.09	
AB	128.82	1	128.82	4.34	0.08	
AC	248.06	1	248.06	8.36	0.02	Significativo
BC	171.61	1	171.61	5.78	0.05	
A <sup>2</sup>	38.75	1	38.75	1.30	0.29	
B <sup>2</sup>	206.64	1	206.64	6.96	0.03	Significativo
C <sup>2</sup>	269.78	1	269.78	9.09	0.02	Significativo
Residual	177.91	6	29.65			
Lack of Fit	173.20	3	57.73	36.79	0.007	Significativo
Error	4.70	3	1.56			
Cor Total	1492.45	15				

Anexo 5. Análisis de varianza del % de índice de emulsión por *Enterobacter cloacae* BAGM01  $\alpha=0.05$ . Diseño Box Behnken.

Fuente	Suma cuadrados	df	media cuada- dos	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo	673.34	9	74.81	4.83	0.03	Significativo
A-Sacarosa	132.03	1	132.03	8.52	0.02	Significativo
B-Temperatura	22.44	1	22.44	1.44	0.27	
C-NaCl	1.90	1	1.90	0.12	0.73	
AB	93.12	1	93.12	6.01	0.04	
AC	65.61	1	65.61	4.23	0.08	
BC	85.56	1	85.56	5.52	0.05	
A <sup>2</sup>	70.14	1	70.14	4.52	0.07	
B <sup>2</sup>	202.35	1	202.35	13.06	0.01	significativo
C <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	0.01	0.91	
Residual	92.93	6	15.48			
Lack of Fit	60.38	3	20.12	1.85	0.31	significativo
Error	32.54	3	10.84			
Cor Total	766.27	15				

**Characterization of *Enterobacter cloacae* BAGM01 producing a thermostable and alkaline tolerant rhamnolipid biosurfactant from the Gulf of Mexico.**

Curiel-Maciel N.,<sup>1</sup> Martínez-Morales F.,<sup>1</sup> Licea-Navarro A.F.,<sup>2</sup> Bertrand B.<sup>3</sup>, Aguilar-Guadarrama A. Berenice<sup>4</sup>, Rosas-Galván N.,<sup>1</sup> Morales-Guzmán D.,<sup>1</sup> Rivera-Gómez N.,<sup>5</sup> Gutiérrez-Ríos R.M.,<sup>6</sup> Trejo-Hernández M.R.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma Del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, CP. 62209. Cuernavaca, Morelos.

<sup>2</sup>Unidad de Desarrollo e Investigación Biomédica. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Carretera Ensenada-Tijuana No. 3918, Zona Playitas, CP. 22860, Ensenada, B.C. México.

<sup>3</sup>Instituto de Ciencias Físicas. Laboratorio de Membranas. Universidad Autónoma de México Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, México

<sup>5</sup>Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional en Salud Pública. Av. Universidad 655 Col. Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos. México

<sup>6</sup>Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Chamilpa, CP. 62210 Cuernavaca, Morelos. México.

\*Corresponding author: Trejo-Hernández M.R. Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, CP. 62209. Cuernavaca, Morelos, México. Phone +17773297057; fax +17773297030. E-mail address: mtrejo@uaem.mx

**Abstract**

The search for novel biosurfactants (Bs) requires the isolation of microorganisms from different environments. The Gulf of Mexico is a geographical area active in the exploration and exploitation of hydrocarbons. Recent metagenomic and microbiologic studies in this area suggested a potential richness for novel Bs microbial producers. In this work, nineteen bacterial consortia from the GoM were isolated at different depths of the water column and marine sediments. Bs production from four bacterial consortia was detected by the CTAB test and their capacity to reduce surface tension (ST), emulsion index (EI<sub>24</sub>) and hemolytic activity. These bacterial consortia produced Bs in media supplemented with kerosene, diesel or sucrose. Cultivable bacteria from these consortia were isolated and identified by bacterial polyphasic characterization. In some consortia, *Enterobacter cloacae* was the predominant specie. *E. cloacae* BAGM01 presented Bs activity in minimal medium and was selected to improve its Bs production using a Taguchi and Box Behnken experimental design; this strain was able to grow and presented Bs activity at 35g/L of NaCl. This Bs decreased ST to around 34.5±0.56 mN/m and presented an EI<sub>24</sub> of 71±1.27 %. Other properties of this Bs were thermal stability, stability in alkaline conditions and stability at high salinity that confers important desirable characteristics in multiples industries. The analysis of the genome of *E. cloacae* BAGM01 showed the presence of *rhIAB* genes that have been reported in the synthesis of rhamnolipids, and *alkAB* genes that are related to the degradation of alkanes. The bioactive molecule was identified as a rhamnolipid by HPLC-derivatization, <sup>1</sup>H NMR and UPLC-QTOF-MS analysis.

**Keywords:** Biosurfactants, *Enterobacter cloacae*, Marine environment, Production, Rhamnolipid.

## 1. Introduction

Oils spills can cause a wide range of negative and profound impacts on the marine environment. The damaging impact has been studied and documented in the scientific literature over decades (Sammarco *et al.*, 2013). The capacity of the marine environment to recover from severe perturbations is a reflection of its abiotic and biotic complexity. Seawater contains a diversity of marine macro and microorganisms capable of metabolizing hydrocarbons and their derivatives. Microorganisms include mainly bacteria, yeasts and fungi that can utilize hydrocarbons compounds as a source of carbon and energy. Hydrocarbon degrading bacteria are widely distributed throughout the marine environment, although they are abundant in areas with natural oil seeps or chronically polluted coastal waters (Kimes *et al.*, 2013; Sammarco *et al.*, 2013; Godoy-Lozano *et al.*, 2018). The Gulf of Mexico (GoM) is an area covering  $1.6 \times 10^6$  km<sup>2</sup> with a particular macro and micro-diversity. After the Deepwater Horizon oil spill in 2010, different research projects have described the impact of this catastrophic event (Babcock-Adams *et al.*, 2017).

The presence of aliphatic hydrocarbons in seawater from Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill reached concentrations of petroleum hydrocarbons (TPH) in the range of 202-206 µg/L (Sammarco *et al.*, 2013). In marine sediments of the GoM, hydrocarbon presence was reported in concentrations ranging between 534 to 6159 ng/g<sup>-1</sup> for surface sediments and between 325 and 1415 ng/g<sup>-1</sup> for sub-surface sediments (Babcock-Adams *et al.*, 2017). The structure of the microbial community is enriched with bacteria that degrade hydrocarbons at depths ranging from 183 to 3740 m, particularly at a depth of 500 m, where a higher concentration of aromatic hydrocarbons was detected. Currently, the concentration of aromatic hydrocarbons varies from 13 to 60 µg/kg in deep zones and differs from shallow areas with reported concentrations between 100 µg/kg and 500 µg/kg. At depths of 183 to 3740 m, the most abundant class of bacterial were *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Clostridia*, *Nitrospira*, *Phycisphaera* and *Actinobacteria* (Godoy-Lozano *et al.*, 2018). Thus, these sites are rich sources of microorganisms producing diverse and potentially novel metabolites such as enzymes, terpenes, steroids, polyketides, peptides, alkaloids, saponins, phenols, porphyrins, just to mention a few (Deshpande *et al.*, 2010, Kiuru *et al.*, 2014, Gallimore, 2017). Also, this polluted marine environment could promote the growth of diverse microorganisms capable of producing biosurfactants (Bs) and emulsifying agents that allow microorganisms to survive in habitats with high concentrations of hydrophobic substrates (Jackson *et al.*, 2015).

Bs are defined as tensoactive or bioemulsificant compounds that are produced by microorganisms. These biomolecules can present a variety of structures such as polymers (polymeric Bs that possess high molecular weights and confer emulsifying characteristics), or glycolipids, lipopeptides, and phospholipids, which are of low molecular weight and are efficient in lowering surface tension (ST) and interfacial tension. Glycolipids Bs are amphiphilic molecules that consist of a hydrophilic head (generally sugars) and a hydrophobic tail (unsaturated or saturated fatty acids). They are biodegradable, environmentally friendly, biocompatible and present low toxicity, and they have activity under different conditions of temperature, pH and salinity (Jakovetić, *et al.*, 2013). These properties make them potential candidates that can replace synthetic surfactants in a variety of industrial applications such as detergents,

foaming agents, wetting agents, food additives and in bioremediation processes (Hošková, *et al.*, 2013, Nitschke and Sousa e Silva, 2018).

Glycolipid Bs production is significantly influenced by the type and concentration of nutrients such as carbon, nitrogen, phosphorous and the presence of certain trace elements. Additionally, physicochemical conditions such as pH, NaCl concentration, temperature and shaking have a significant effect on Bs production.

Some species belonging to the *Enterobacter* genus have been reported to produce Bs, and it has been shown that, depending on the carbon source used, these bacteria are capable of producing rhamnolipids, lipopeptides, and polymeric Bs. Some species of this genus are capable of emulsifying different hydrophobic substrates which gives it potential for application in bioremediation processes (Abbasi and Amiri., 2008, Hošková *et al.*, 2013, Jemil *et al.*, 2018).

In this work, different strains of *E. cloacae* were isolated from microbial consortia at different depths of the water column and sediments in the GoM. Mainly, *E. cloacae* BAGM01 grew and exhibited surface and emulsion activity at high NaCl concentrations (up to 35 g/L) and also used different carbon substrates (kerosene, hexadecane, diesel sunflower oil, and different carbohydrates). The Bs produced by *E. cloacae* BAGM01 showed high thermal stability, presented high activity at alkaline pH and at high NaCl concentrations. Genes related to rhamnolipid synthesis and alkane utilization are also present in its genome. Structural analysis of the purified Bs confirmed that the molecule is a rhamnolipid and the predominant congener was a Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study area

This study was carried out in the GoM onboard the oceanographic vessel “Justo Sierra-UNAM”, at 20 different locations and at the following depths: maximum fluorescence (Mf: ~ 30 to 80 m), minimum oxygen (mO<sub>2</sub>: ~253 to 456 m), 1000 m, seabed and sediment (sampled from 40 to 60 cm of depth) as shown in Fig. 1. The samples used in this study were taken from “Perdido region” (98°W and 26°N) in GoM.

Water samples were collected using an oceanographic rosette with twelve 20 L Niskin sampling bottles that were mounted on a carousel sampler and was automatized for the determination of different physicochemical parameters at each depth (pH, temperature, salt concentration, etc.). Every 100 L sample of seawater was concentrated to 3.5 L using tangential flow filtration. Samples of sediment were obtained with an Ekman box corer sampler. Samples were homogenized in a flask, and 50 g of each sample was refrigerated at 4 °C for transportation prior to laboratory processing.

### 2.2. Culture media

A rich medium was prepared for the isolation of bacterial consortia and strains containing trypticasein soy broth, 20 g/L NaCl, 1.2 g/L beef extract and 1.2g/L sodium nitrate. A minimal medium was used for Bs production consisting of 3.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.7 g/L MgSO<sub>4</sub>, 10 g/L NaCl and 0.1 g/L NaNO<sub>3</sub> supplemented with 0.5 g/L yeast extract and a carbon source (Sari *et al.*, 2014). For the experimental design, different carbon sources were added to the minimal medium: hexadecane, sunflower oil and sucrose at different concentrations.

### 2.3. Screening for Bs producing consortia and bacterial strains

Culturable consortia and bacterial strains were grown in trypticasein soy broth mentioned previously and screened for Bs activity with the following assays:

#### 2.3.1. Methylene blue CTAB agar plate assay

Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) agar plates were inoculated with culture supernatant at room temperature from 72 to 96 h. Dark blue halos were considered positive results for anionic Bs presence (Siegmond and Wagner., 1991).

#### 2.3.2. Emulsion index (EI<sub>24</sub>)

Emulsion index (% EI<sub>24</sub>) was determined by adding 2 mL kerosene to a 3 mL volume of culture supernatant. Both liquids were mixed by vortex for 2 min, and then left stand for 24 h at room temperature. EI<sub>24</sub> percentage was determined by the height of the emulsified region (cm) divided by the total height of the liquid column and multiplied by 100 (Rosas-Galván *et al.*, 2018).

#### 2.3.3. Surface tension (ST)

The ST in free-cell supernatant samples was measured with a digital tensiometer K20S (KRÜSS, Hamburg, Germany) based on the principle of the plate method (Rosas-Galván *et al.*, 2018).

#### 2.3.4. Hemolysis assay

Selected strains were grown on blood agar plates (5 % v/v blood) and incubated at 30 °C during 24-48 h. Hemolytic activity was detected as a clear zone around the colony (Hassanshahian 2014).

#### 2.3.5. Drop-collapse test

The drop-collapse technique was carried out on a 96-microwell plate (Pro-Bind, Falcon, NY, USA). 100 µL culture supernatant was added to the wells and then 5 µL of crude oil was added to the surface of the culture supernatant. Bs producing culture present flat drops (Hassanshahian *et al.*, 2016).

### 2.4. Taxonomic identification of Bs producing bacteria.

A polyphasic analysis of the isolated bacteria was performed according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, (2010). The colony and cellular morphology was visualized transmission electron microscopy (TEM) in the electronic microscope unit (IBT-UNAM, Mexico). The samples were fixed to a copper grill, absorbed onto a thin carbon film and negatively stained with 2.5 % uranyl acetate. After air-drying, the samples were examined in a Zeiss Libra 120 plus transmission electron microscope at an acceleration voltage of 80 kV. Standard biochemical assays of the bacterial strains were performed using the API system (API E20 Biomeriux, France). For the polyphasic taxonomy of marine aerobic proteobacteria, the sensitivity antibiotics of *E. cloacae* BAGM01 was determined by diffusion on a plate using antibiotic susceptibility test discs (Oxoid™) Thermo Fisher Scientific. The bacterial genomic DNA extraction was obtained with the Quick-gDNA extraction Miniprep kit (Zymo Research). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene sequence was used for the taxonomic identification of the isolated strains. Universal primers were used by the sequencing service facility (Macrogen, Korea). The rRNA gene sequences were evaluated with the Basic Local

Alignment Search Tool (BLAST). A phylogenetic tree was constructed using the 16S rDNA sequences and analyzed with CLUSTALW and the Phylip package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) for construction of the phylogenetic tree using the Neighbor-joining method.

## 2.5. Bs production

### 2.5.1 Screening for Bs producing *Enterobacter cloacae* strains

The strains were evaluated by determining their Bs activity (CTAB assay, ST, EI<sub>24</sub>, hemolytic activity, drop-collapse test), using the trypticasein soy broth culture at 30 °C for 18 h and 150 rpm.

### 2.5.2. Production improvement of Bs by *E. cloacae* BAGM01

In a preliminary experiment, a Taguchi experimental design approach was used to establish the main effects of 7 factors evaluated. 3 factors were the main components that significantly favored Bs production. Then, a Box-Behnken experimental design was used to evaluate the factors previously selected to improve Bs production by the *E. cloacae* BAGM01 strain. Two levels and four central points were applied; experiments were carried out in triplicates, as shown in Table 1. This design evaluates and optimizes the main effects, the effects of their interaction and the quadratic effects of the independent variables. The responses variables (% in ST reduction and EI<sub>24</sub> %) obtained were adjusted to a polynomial second order model (quadratic polynomial).

The polynomial equation used is as follows:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon$$

Where  $Y_i$  (i=1 to 2) are the predicted values for the changes in surface tension ( $\Delta$ ST) and Emulsion index (% EI<sub>24</sub>).  $\beta_0$  is the intercept;  $X_1$  (sucrose),  $X_2$  (temperature) and  $X_3$  (NaCl) are the independent variables;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  are linear coefficients;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ , and  $\beta_{33}$  are the quadratic coefficients and  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$  and  $\beta_{123}$  are the coefficients of the crossed products.

The minimal medium was inoculated with 10 % (v/v) of biomass during 15 days and 150 rpm. Data analysis was carried out with the Design-Expert 7.0 software (Stat-Ease, Inc, Minnesota USA).

### 2.5.3. Bs production, extraction, recovery and purification

Bs production kinetics was performed under the optimum culture conditions of growth in a volume of 1L at 30°C and 150 rpm during 350 h. Bs activity was determined through ST reduction (nN/m) and EI<sub>24</sub>%. Then, culture was centrifuged for 20 min at 4200 rpm at 4 °C. Bs extraction was carried out with 2 volumes of chloroform/methanol (2:1 v/v) and stirring for 60 min and left stand overnight at 4 °C. The organic phase was collected and the process was repeated again. The extracted Bs was concentrated in a rota-evaporator (BÜCHI R-124) at 60 °C, 340 mbar. Subsequently, to remove any impurities from the Bs BAGM01, solid phase extraction (SPE) was achieved using C18 Water Sep-Pak® Vac Silica (20 mL). The fraction was eluted in water:methanol (100% water, 80:20, 60:40, 100% methanol). The extraction solvent was concentrated to dryness under vacuum and the BAGM01 Bs was used to determine the occurrence of rhamnolipids in the sample. From this point on, BAGM01 Bs is referred as the purified Bs product with Bs activity, which was lyophilized for storage at room temperature.

## 2.6. Effect of temperature, pH, and salinity of the BAGM01 Bs

The Bs produced by *E. cloacae* BAGM01 was characterized in terms of stability at different temperatures, pH and salt concentration and was carried out by evaluating EI<sub>24</sub> (%), according to Ibrahim (2018) and Ortega-de la Rosa *et al.*, (2018). In order to determine the effect of temperature, the lyophilized cell-free supernatant was heated for 30 min in a water bath at 25, 50, 80 °C and under sterilization conditions (121 °C) respectively, and the EI<sub>24</sub> (%) was measured. For the evaluation of the effect of pH the EI<sub>24</sub> (%) was measured on lyophilized cell-free supernatant at different pH (2, 6, 8 and 14) using 1N HCl/NaOH. For salinity stability, the EI<sub>24</sub> (%) was measured in the presence of 2, 6, 10 and 15 g/L of NaCl.

## 2.7. Identification of genes that participate in Bs synthesis and alkane degradation.

The genome sequence of *E. cloacae* BAGM01 was obtained by Next Generation Sequencing (NGS) services from the DNA Synthesis and Sequencing Unit IBT-UNAM, Mexico. The draft genome was deposited in the CIGoM database and will be released and described in a separate publication. The functional genome annotation of *E. cloacae* BAGM01 was performed using the rapid subsystem technology (RAST version 2.0) (Aziz *et al.*, 2008) and the ARTEMIS software version 17.0.1 <https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis> (Carver *et al.*, 2012).

## 2.8. Analysis and identification of the structure of BAGM01 glycolipids

### 2.8.1. Thin Layer Chromatography (TLC) profile of BAGM01 glycolipids

TLC was carried out on silica gel 60 F255 plates (Merck Darmstadt, Germany) using the fractions of BAGM01 Bs. A solvent system of chloroform:methanol:acetic acid (5:1:0.16) was used as a mobile phase. The compounds were detected by visualizing with UV-light (UVP model UVGL-25, CA, USA) and spraying with ammonium cerium (IV) sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>] in 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (López-Martínez *et al.*, 2011).

### 2.8.2. HPLC-derivatized method for determination of rhamnolipids in BAGM01 Bs

The crude extract Bs produced by *E. cloacae* and commercial standard rhamnolipids (AGAE, AGA062917b Sigma-Aldrich) were derivatized using the technique described by Schenk *et al.*, (1995). 100 mg of lyophilized sample and the standard were mixed with 125 µL of triethylamine (Et<sub>3</sub>N) and 75 mg of p-bromoacetophenone (Aldrich, Steinheim, Germany) were added and this mixture was dissolved in 2 ml of acetone and stirred for 16 h at 20 °C. The ester derivative was obtained after filtration and evaporation of the solvent and was analyzed in a HPLC Waters 900 using a C18 column (MA, USA) and diode array detector. Water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) were used as the mobile phase: 4 min, A:B 3:7 (v:v); 10 min, gradient from 3:7 to 0:10; 9 min 0:10; 2 min return to 3:7. HPLC was performed at 25°C with 0.8 mL/min as flow-rate and an injection 20 µL volume. The column effluent was monitored at 210 nm (Schenk *et al.*, 1995).

### 2.8.3. <sup>1</sup>H NMR spectrometry analysis

The purified BAGM01 Bs (fraction 60:40) was subjected to further analysis with nuclear magnetic resonance (1D NMR). The <sup>1</sup>H NMR spectra analysis was carried out using a VARIAN Mercury spectrometer set at 400 MHz with deuterated methanol from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) as the solvent. <sup>1</sup>H chemical shifts were reported in parts per million.

Assignment of the spectra was carried out according to the literature for rhamnolipids (Twigg *et al.*, 2018; Wadekar *et al.*, 2012; Lotfadad *et al.*, 2010).

#### **2.8.4. Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) analysis**

The UPLC-QTOF-MS data were obtained with an Agilent Technologies series 1290 infinity II instrument with the electrospray ionization (ESI) and QTOF Agilent Technologies G6545 model detector (Agilent, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA). 5  $\mu$ L of the pure BAGM01 Bs (fraction 60:40) was injected and separated using Eclipse column 2.1 x 50 mm, and the equipment was operated in the negative ionization mode. An aqueous solution of 0.1 mM ammonium formate and methanol were used as mobile phase A:B respectively (HPLC-MS grade solvents from Sigma Aldrich), 4 min 90:10 %, 5.50 min 0:100 %, 6.50 min, 90:10 %, at flow 0.25 mL/min. The scanning mass range was from 100 to 800 atomic mass units (amu), while  $m/z$  503 was used as a target for fragmentation.

#### **2.9. Statistics**

All experiments were carried out in triplicates, and the differences in treatments were evaluated by analysis of variance (ANOVA) ( $\alpha = 0.05$ ) using DESIGN-EXPERT, version 5.0.7 (Stat-Ease, Minneapolis, MN). The Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ) was carried out with the SAS software system 9.0.

### **3.0. Results**

#### **3.1. Screening for Bs activity in bacterial consortia from the Gulf of Mexico**

Nineteen bacterial consortia isolated from different sites of the GoM potentially produced tensoactive agents. All the consortia samples isolated from the water column reduced ST and thirteen of them presented emulsion. In this study, anionic Bs of glycolipid nature were detected using blue methylene CTAB agar plates and four consortia tested positive. In all samples from the water column and three samples from sediments, hemolytic activity was detected. Table 2 describes the sites and depth of the samples and shows the qualitative results for Bs activity.

In Fig. 2A, in the samples from water column the reduction of ST was observed in the range of 68.7 to 56.4 mN/m, from these, eight consortia isolated presented emulsion index ranging from 11.9 to 49.6 %. The samples from sediments reduced ST in the range of 66.3 to 48.7 mN/m, and five of these presented an EI<sub>24</sub> in the range of 19.6 to 63.2 %, as shown in Fig. 2B.

The presence of Bs activity in samples of water and sediments of the GoM at different depths indicated that there is a widespread distribution of Bs producing bacterial communities in the region.

Only consortia A4 Seabed G(C1), C11 Mf H, C14 1000 G and C12 Sed G, tested positive for CTAB agar plates and thus, were further analyzed for Bs activity using different carbon sources (diesel, kerosene and sucrose at 10 g/L), under the minimum culture conditions previously described. Microbial growth was detected in all these carbon sources. With diesel added, the consortium C14 1000 G reduced ST from 69.8 to 49.3 mN/m, as observed in Fig. 3A with significant differences among consortia. In the presence of kerosene, consortia C12 Sed G and A4 Seabed G (C1) reduced the ST from 69.8 to 49.1 and 69.8 to 52.5 mN/m respectively, with no significant difference between them (Fig. 3B). However, a significant difference was observed between C11 Mf H and C14 1000 G. When sucrose was used as the

carbon source, consortium C14 1000 G reduced ST from 69.5 to 47.1 mN/m, with a significant difference compared to the other consortia (Fig. 3C). The consortium C11 Mf H grown in sucrose as carbon source showed tensoactive activity. This consortium was the only that present an EI<sub>24</sub> of 17 % and was the consortium where the majority of strains with Bs activity were isolated included the *E. cloacae* BAGM01.

### 3.2. Identification of the Bs produced by the isolated bacterial strains.

From all the consortia that presented activity in the CTAB assay, ten bacterial strains were isolated and identified by partial 16S rDNA sequencing, and were subsequently characterized by polyphasic analysis.

Partial 16S rDNA sequencing analysis of the different bacteria isolated in this study revealed a high similarity with genus *Shewanella* sp., *Bacillus* sp., and *Enterobacter* sp., the latter being the predominant genus that showed Bs activity. Table 3 shows the results of multiple alignment analyses of nucleotides of the *E. cloacae* strains. The 16S ribosomal DNA sequences of the identified strains were deposited in the CIGoM database (<http://www.cigom.info/>, which will be available to the public in the near future). These data showed that the *E. cloacae* is ubiquitous and it is distributed in all sites and depths in the area of the study. Until our knowledge, this is the first study that characterized *E. cloacae* in different areas of GoM. A phylogenetic tree was generated based on the 16S sequences of the isolated *Enterobacter* sp. strains. The strains fell in different clades with respect to the reference sequences reported in the Genbank, namely: *Enterobacter* sp. S10 HF572841, *E. cloacae* RU13 KJ607594, *Enterobacter* sp. MM034 KT9332255, *E. cloacae* AB6 JQ640581, *E. cloacae* SP4001 KY38115 and *Pseudomonas* sp. U15 as shown in Fig. 4. Furthermore, *E. cloacae* C141000G 21B1, *E. cloacae* BAGM01 (isolated of C11MfH) and *E. cloacae* C12SedG22 were isolated from different sites; however, they are phylogenetically closely related. Additionally, other *E. cloacae* strains from the same site but at different depths were observed in clades that were phylogenetically distant (for example C141000G21B and C141000G21).

All *E. cloacae* strains from this study were affiliated to the *Enterobacteriaceae* family, phylum  $\gamma$ -Proteobacteria and all the polyphasic analysis results were coherent with those described by the Bergey's manual (2010). Fig. 5A shows that microscopically, *E. cloacae* BAGM01 is a motile rod-shape bacterium of 2  $\mu$ m long and 0.5  $\mu$ m wide with a polar flagellum (Fig. 5 B). The results from the biochemical characterization are presented in Table 4. In general, the *E. cloacae* strains were positive for catalase, oxidase activity and present motility. They were able to consume diverse carbohydrates and citrate and tested negative for indole and produced N<sub>2</sub> gas.

#### *Sensitivity antibiotic assay*

Marine aerobic proteobacteria exhibited characteristic antibiotic susceptibility profiles, which were useful for the differentiation of the genera. As part of taxonomic characterization of the *E. cloacae* BAGM01 strain was further evaluated for antibiotic sensitivity assays. Table 5 shows that *E. cloacae* BAGM01 was resistant to Vancomycin, Bacitracin, Cefoxitin and Clindamycin which belong of the groups of bactericide antibiotics.

### 3.3. Bs production

#### 3.3.1. Screening for Bs producing *Enterobacter cloacae* strains

With the aim of evaluating Bs production by the ten *E. cloacae* strains, they were inoculated

in Soy broth rich medium as previously described. The results show that the strains reduced the ST of the culture media in the range of 55.3 to 35.4 mN/m and presented an EI<sub>24</sub> in the range of 20 to 58.4%. All strains presented anionic Bs production (CTAB), hemolytic activity and they also tested positive for drop collapse assay (Table 6). Moreover, these strains were able to grow on diverse carbon sources such as crude oil, and carbohydrates such sucrose.

### 3.3.2. Improvement production of Bs by *E. cloacae* BAGM01

Statistical design has become an important tool for the production and optimization of Bs (Bertrand *et al.*, 2018). With the aim of evaluating the Bs production under minimal medium conditions by *E. cloacae* BAGM01, different experimental designs were implemented. First, a Taguchi experimental design was applied to evaluate the main effects on 7 factors including 3 carbon sources (vegetable oil, sucrose and hexadecane), 2 nitrogen sources (yeast extract and NaNO<sub>3</sub>), temperature and NaCl concentration. The results revealed that sucrose at high levels, high temperatures, and low NaCl concentration were the factors and conditions that favored Bs production by the strain of interest (Supplementary Table 1). It is important to mention that in this experiment the *E. cloacae* BAGM01 strain was able to grow and produce Bs, at high salt concentrations (3.5% of NaCl).

A Box-Behnken experimental design was also applied with the purpose of evaluating at two levels, the three factors that had a main effect on Bs production by *E. cloacae* BAGM01. The response variables evaluated were ST reduction (%) and EI<sub>24</sub> (%).

#### *Tensoactive activity*

The ANOVA showed that the model was significant. The "Lack of Fit F-value" of 36.79 implied the Lack of Fit was significant. There was only a 0.72% chance that a "Lack of Fit F-value" of this value could occur due to noise. A non-significant lack of fit reflects an adequate model (Supplementary Table 2).

The analysis of the most significant effects with respect to the ST reduction (%) is shown in the following equation:

$$\text{ST reduction (\%)} = 26.42 + 3.62A + 1.76B - 3.88C + 5.67AB - 7.87AC + 6.55BC + 3.11A^2 + 7.18B^2 - 8.21C^2$$

The aim of this experiment was to achieve an increase in the percentage of ST reduction by the Bs from *E. cloacae* BAGM01. The interaction of sucrose at high concentrations (25 g/L) with low concentrations of NaCl (5 g/L) had a significant effect on the reduction in ST (Fig. 6A). *E. cloacae* BAGM01 reduced the ST in 47 % (62.3 to 42.5 mN/m), and low temperatures promoted Bs production. In the experimental data shown above, the nitrogen source had no significant effect on ST reduction, but NaCl concentration did. This result was expected since the microorganism under investigation was isolated from a marine environment, where salt concentrations were high and nutrients like nitrogen are relatively low.

#### *Emulsifying activity*

For the second response variable (EI<sub>24</sub>%), the ANOVA showed that the model was significant. The "Lack of Fit F-value" of 1.86 implied the Lack of Fit was not significant relative to the pure error. There was a 31.22% chance that a "Lack of Fit F-value" of this large could occur due to noise. A non-significant lack of fit reflects an adequate model (Supplementary Table 3).

When sucrose was applied at low levels (15 g/L) the interaction between this carbon source and high temperature had a significant effect on the EI<sub>24</sub>, which was observed to be 47.5 %. For optimization purposes, low NaCl concentration favored Bs production as shown in Fig.

6B.

The regression analysis obtained is shown in the following equation:

$$\text{Emulsion index (EI}_{24}\text{ \%)} = 29.92 - 4.06A + 1.67B - 4.87C + 4.82AB + 4.05AC + 4.62BC + 4.18A^2 + 7.11B^2 - 0.21C^2$$

It was observed that the levels of the factors evaluated are different for each response variable which means that the response variables were not directly related.

### 3.3.3. Bs production kinetics by *E. cloacae* BAGM01

The optimum conditions for Bs production were established by experimental design. The kinetics of Bs produced by *E. cloacae* BAGM01, showed that ST is reduced to  $42.7 \pm 1.5$  mN/m, approximately after 144h, and showed an EI<sub>24</sub> of  $47.3\% \pm 0.07$  after 288h, this was considered to be the optimum point for Bs extraction. After the extraction the crude, BAGM01 Bs showed a ST of  $34.5 \pm 0.56$  mN/m and EI<sub>24</sub> 71%. (Fig. 7).

Anexos

### 3.4. Effect of temperature, pH, and salinity of the BAGM01 Bs crude extract.

Stability under different conditions of temperature, pH and salinity is an important factor for Bs application. EI<sub>24</sub> was the response variable used to evaluate Bs stability considering their potential application in bioremediation.

Anexos

#### *Effect of temperature*

The results obtained showed that the lyophilized cell-free supernatant of the crude BAGM01 Bs extract was stable over a wide range of temperatures (25, 50, 80 and 121 °C). Moreover, there was no significant difference at temperatures under 80 °C (Fig. 8A) Interestingly; there was an increase in activity at the highest temperature studied (121 °C) with EI<sub>24</sub> of 72.6 %.

#### *Effect of pH*

Bs stability at different pH (2, 6, 8 and 14) was evaluated using the lyophilized BAGM01 Bs supernatant. The best results were observed at alkaline pH of 14 with an EI<sub>24</sub> of 63.8 %. The EI<sub>24</sub> at acid pH (2 and 6) presented EI<sub>24</sub> values of 50.9 and 54.6 %, and no significant differences were observed (Fig. 8B). This proved that Bs from *E. cloacae* BAGM01 had good activity and stability over a wide range of pH, particularly in alkaline conditions.

#### *Effect of NaCl concentration*

When the cell-free supernatant crude BAGM01 Bs was assayed at different levels of salinity (2, 6, 10 and 15 g/L), EI<sub>24</sub> activity was 57.6 and 56.7 % at concentrations of 10 to 15 g/L, respectively (Fig. 8C). There was a significant difference in emulsion at high concentration of NaCl compared to low concentrations.

### 3.5. Identification of genes related to rhamnolipid synthesis and alkane degradation in *E. cloacae* BAGM01

To detect genes that participate in the synthesis of glycolipid Bs, functional genome analysis of the *E. cloacae* BAGM01 strain was performed with RAST (Aziz *et al.*, 2008) and ARTEMIS (McQuillan *et al.*, 2011). A cluster of *rhlAB* genes that intervene in different stages of rhamnolipid synthesis was detected. These genes include the *rhlA* gene that codes the synthesis of 3(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanooates (HAA), and the *rhlB* gene that codes the rhamnolipid transferase I that binds to deoxytymidin diphosphate-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose)

and is bound to the HAA group by and O-glycosidic bond, in order to synthesize mono-rhamnolipids, and also its inductor homoserine lactone was observed. Other genes detected were those that are involved in rhamnose synthesis and those that code for fatty acid synthesis and lipopolysaccharides synthesis.

The genes that code for alkane degradation (*alkAB*) were identified by the functional annotation of the *E. cloacae* BAGM01 strain. Other enzymes were identified in this study included lipases and esterases that are important in the metabolism of hydrophobic substrates.

### **3.6. Analysis and identification of the structure of the rhamnolipid produced by BAGM01**

#### **3.6.1. Thin Layer Chromatographic (TLC) profile of the BAGM01 rhamnolipid**

In the TLC characterization of the rhamnolipid produced by *E. cloacae* BAGM01, the presence of spots similar to the spots of commercial standard rhamnolipids (AGAE, AGA062917b Sigma-Aldrich) were observed. According to Lotfabad *et al.*, (2010) a similar Rf pattern was obtained, 0.31 and 0.75, probably corresponding to di-rhamnolipid and mono-rhamnolipid, respectively (Fig. 9).

#### **3.6.2. HPLC-derivatization method for the determination of rhamnolipids produced by BAGM01**

The commercial rhamnolipid and crude extract Bs produced by *E. cloacae* samples were derivatized in order to visualize the chromatogram detected by UV spectra from respective *p*-bromophenacyl esters at 210 nm, as shown in Fig 10. Thus, the crude extract by *E. cloacae* was observed at a retention time of 15.68 min (Fig 10A) and was similar to *Anexos* with the retention time of the commercial rhamnolipid used as a reference (Fig 10B).

#### **3.6.3. <sup>1</sup>H NMR spectroscopic analysis of the BAGM01 rhamnolipid**

To elucidate the chemical structure <sup>1</sup>H NMR analysis was carried out. Table 7 shows the results of analysis of the purified BAGM01 Bs. The characteristics of rhamnose ring signal present in the rhamnolipid consisting of CH<sub>3</sub>- δ 1.11 ppm, 2'H to 5'H δ 3.1-3.8 ppm and the lipid group were indicated by the appearance of the chemical shifts -CH<sub>3</sub> δ 0.91 ppm, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> δ 1.25 ppm, -CH<sub>2</sub>-COO- δ 2.4, 2.5 ppm in the <sup>1</sup>H NMR. Fig. 11 (<sup>1</sup>H NMR spectrum) shows the chemical shift by glycolipids of the rhamnolipid type produced by *E. cloacae* BAGM01.

#### **3.6.4. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) analysis**

The presence of congeners of glycolipids of rhamnolipid nature was determined through a UPLC-MS/MS analysis in auto-scan mode. From this, congeners of six mono-rhamnolipid and four di-rhamnolipids with two β-hydroxy fatty acid chains were detected based on the ESI-MS/MS analyses. The β-hydroxyfatty acid chain length varied among homologs, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>12:1</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>. It was noted that mono-rhamnolipid congeners were predominant. The congeners of mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid are shown in Table 8. Additionally, from this analysis Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> was the major rhamnolipid identified for the appearance of the molecular ion peak at *m/z* 503, which was used to observe fragmentation in the MS/MS target analysis as observed in Fig. 12.

### **4.0 Discussion**

*Screening and isolation of Bs producing consortia and bacterial strains.* The strains in this

study were isolated from four consortia coming from water and sediment samples at different sites and depths of the GoM, and these were identified as Bs producers. Some bacterial species in the consortia had the ability to produce Bs. However, it is noteworthy that in the same consortium, some isolates were Bs producers, and others could degrade hydrocarbons, which is indicative of synergism. In this work, four consortiums were selected through the CTAB-blue agar plate assay for the detection of anionic Bs. The ability of the consortiums to grow and reduce ST reduction and to present emulsifying activity in different carbon sources indicated that they had the ability to produce metabolites of biotechnological interest.

*Gammaproteobacteria* is a taxonomic class with several bacterial genera reported as prolific Bs producers such as *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., just to mention a few. *E. cloacae* was predominant in the consortia isolated from different sites and depths including the sediment of GoM, which is indicative of the versatility of *E. cloacae* to succeed as free living form in marine as in terrestrial environments. Distinct *E. cloacae* strains can synthesize Bs of different chemical nature like rhamnolipids that are among the most active Bs (Hošková *et al.*, 2013). In this study, an anionic tensoactive agent produced by *E. cloacae* strains was detected by the CTAB assay and was similar in TLC of commercial rhamnolipids (AGAE, AGA062917b Sigma-Aldrich). *E. cloacae* BAGM01 was the most proficient strain with high Bs activity and was selected for further characterization. Hošková *et al.*, (2013) studied non-pathogenic strains of *Enterobacter asburiae* and *Acinetobacter calcoaceti* that produce rhamnolipids with sodium citrate as the carbon source. They showed that *Anexos* production was highly dependent on the carbon, nitrogen and phosphorus sources.

*Optimization and production of BAGM01 Bs.* It has been reported that carbon source affects the final products (lipopeptides, exopolysaccharides or rhamnolipids), and in consequence, their properties such as structure and stability, and therefore their application (Abassi and Amiri, 2008; Hošková *et al.*, 2013; Jemil *et al.*, 2018). For this reason, it was essential to select the adequate carbon source for each strain. Thus, through experimental design we improved the Bs production in *E. cloacae* BAGM01. This approach was in order to reach high activity measured as ST reduction (mN/m) and EI<sub>24</sub> (%) with the *E. cloacae* BAGM01 strain, using sucrose as a carbon source. We observed that at high levels of the carbon source the ST reduction was improved to 47%. Bahia *et al.*, (2018), reported the use of substrates like sucrose as the carbon source, for rhamnolipid production. In their work, sucrose was established as a low-cost raw material with high availability and purity. Thus, it is an excellent option for a substrate in industrial Bs production. Pereira *et al.*, (2017) also reported an increase in rhamnolipid production by *Aureobasidium pullulans* with high carbon concentration. Martínez-Toledo *et al.*, (2011) used a strain of *P. putida* and determined that glucose had a significant effect on ST reduction (45.7 mN/m). Roldán-Carrilo *et al.*, (2011) applied the same approach to optimize Bs production with a *Serratia marcescens* strain and reported ST reduction from 57 to 30 mN/m, suggesting that the relationship between C/C, C/Fe, and C/Mg had a significant effect on the ST reduction, and thus, in Bs production. The best response that they observed was with C/N at low levels, which promoted Bs production in the *S. marcescens* SmSA strain. In this study, the best result for ST reduction was obtained with a C/N of 38. Saika *et al.*, (2014) observed a ST reduction of 45.16 % with glucose as carbon source using *P. aeruginosa* RS29, this is lower compared with the result of ST reduction in our study.

We determined that nitrogen did not have a significant effect on Bs production by *E. cloacae* BAGM01. Rosas-Galván *et al.*, (2018) reported that the nitrogen source stimulated cellular

growth, but not necessarily Bs production. For that reason in the Box-Behnken design, nitrogen was maintained constant, in limiting conditions.

Soares dos Santos et al., (2016), obtained similar data that demonstrated that under nitrogen limiting concentrations, rhamnolipid production increased with *P. aeruginosa* PA1. In another study by Martínez-Toledo et al., (2011), two nitrogen sources were used (yeast extract, and NH<sub>4</sub>Cl) at high concentrations, in order to obtain better results in terms of ST reduction. In the case of EI<sub>24</sub>, we improved the activity from 29.4 to 47.7%. These values obtained with *E. cloacae* BAGM01 are higher than those reported by Martínez-Toledo et al., (2011), with an EI<sub>24</sub> of 20 %. The EI<sub>24</sub> reported by Saika et al., (2014) was in the range of 60-80 %, employing different hydrophilic substrates with *P. aeruginosa*, widely reported as a rhamnolipid producer.

The production of Bs by *E. cloacae* BAGM01 was carried out under the optimum conditions determined by the Box-Behnken design. In the production kinetics a brief exponential phase and a long constant stationary phase was observed. The maximum production of BAGM01 Bs was observed between 216 and 288 h. This product presented characteristics similar to anionic Bs of type of glycolipid like rhamnolipids. Physicochemical factors can affect the effectiveness and stability (temperature, pH and salinity) of Bs, which is important for its application.

*Characterization of crude extract of BAGM01 Bs.* The BAGM01 Bs presented excellent stability at temperatures of sterilization that could be important for applications in the pharmaceutical and food industries. Similarly, this Bs worked very well in alkaline pH activity at different concentrations of NaCl, which is important in application. *Anexos* remediation of marine environments.

*Effect of temperature.* BAGM01 Bs showed high stability (EI<sub>24</sub> 72%) at 121 °C. This emulsifying activity showed the same behavior as in the work by Ortega-de la Rosa et al., (2018) that reported a thermal stability of a bioemulsifier produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 cultivated in ethanol and in a mixture of glycerol and hexadecane as carbon sources. Ibrahim, (2018) studied *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM2, isolated from soil contaminated with residual motor oil, and the Bs had activity even at 120 °C. The EI<sub>24</sub> recorded was 72.7 and 70 %, respectively, but at 50 °C showed a higher EI<sub>24</sub> (92 and 90 %, respectively). *Natrialba* sp. C21 presented stability at 40 °C with an EI<sub>24</sub> of 68 %, but when heated at 100 °C, the Bs lost its activity (Khemili-Talbi et al., 2015). Khopade et al., 2012 observed a similar behavior with *Nocardioopsis* sp. B4 when the Bs was heated. In another study Jemil et al., (2018) employed the *E. cloacae* C3 strain which showed an EI<sub>24</sub> of about 55 % in a temperature range of 20 to 80 °C, lower than that observed in our study.

*Effect of pH.* BAGM01 Bs exhibits high stability at alkaline conditions (8 to 14 pH), with EI<sub>24</sub> as high as 63 %. This range of pH is higher than reported for the Bs stability (maximum pH 12). The study by Ibrahim, (2018) showed an EI<sub>24</sub> of 95 % at pH 6. This might have been due to the alteration of the Bs structure after being subjected to these pH conditions (rhamnolipids are optimally soluble in neutral to alkaline pH). In the same way, an increase in pH has a positive effect on emulsifying activity and emulsion stability. A better stability of fatty acid surfactant micelles in the presence of NaOH and the precipitation of secondary metabolites at high pH has been observed (Khopade et al., 2012; Khemili-Talbi et al., 2015). The same behavior was observed in the Bs produced by *A. bouvetii* UAM25 at pH 10, due to the fact that in alkaline solutions biopolymers acquire an anionic character (Ortega-de la Rosa et al., 2018). This is comparable with the Bs produced by *Natrialba* sp. C21 that showed high emulsion activity at pH 12 (66 %).

*Effect of salinity.* BAGM01 Bs showed 57 % of emulsion in presence of 10 g/L of NaCl which is higher than the concentration reported by Jemil *et al.*, (2018) with *E. cloacae* C3 strain, where the EI<sub>24</sub> value was 50 % in the presence of 0.5 to 1 g/L of NaCl. Interestingly, the authors mentioned that the emulsifying activity decreased with an increase in NaCl concentration above 1 g/L. Ortega-de la Rosa *et al.*, (2018) mentioned that ionic surfactants are very sensitive to electrolytes, this phenomenon occurs because the electrolytes directly affect the carboxylate groups diminishing the Bs activity. In a study by Ibrahim (2018) *O. anthropi* HM-1 and *C. freundii* HM-2 strains showed EI<sub>24</sub> of 97 and 94.7%, respectively, at 4% NaCl. The stability of the Bs obtained from *E. cloacae* BAGM01 with high temperature stability, wide pH activity and tolerance at elevated NaCl concentration makes this product very promising for its use in applications like the bioremediation of marine water and the food industry to name a few examples.

*Identification of genes related to rhamnolipid synthesis and alkane degradation in E. cloacae BAGM01.* The complete genome of *E. cloacae* BAGM01 was analyzed for search of putative genes responsible for glycolipid Bs production, as a way to determinate if these genes are those related to rhamnolipid biosynthesis. The *E. cloacae* BAGM01 genome presented genes *rhlAB* related to rhamnolipids production. Moreover, *alkAB* genes related with aliphatic degradation were detected. *Enterobacter* sp. is a microorganism that grows in the presence and degrades aliphatic hydrocarbons (Leite *et al.*, 2015). These authors reported the presence of the *rhlAB* genes in *P. aeruginosa*, but only one gene involved in the degradation (*alkB*) was identified. Also, other enzymes identified in this study included lipi: *Anexos* terases that are important in the metabolism of hydrophobic substrates.

*Analysis and identification of the structure of rhamnolipid BAGM01.* To elucidate the chemical structure of the Bs synthesized by *E. cloacae* BAGM01, the purified extract was analyzed by TLC, HPLC-derivatization, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) analysis. A crude extract of BAGM01 Bs was derivatized and a commercial standard was used to identify the compounds present in each peak in the chromatogram to confirm the identity of the rhamnolipid species; the chromatograms of the sample showed a peak in a similar retention time as the standard. Additional peaks appeared in the chromatograms, but according to their respective UV spectra, they were not identified as other rhamnolipids. Presumably, they were other microbial products present in the culture medium. Our results presented here are similar to those of Schenk *et al.*, (1995) and Mata-Sandoval *et al.*, (1999). The characteristic chemical shift based on <sup>1</sup>H NMR indicated that the purified sample had the molecular structure of a rhamnolipid, compared to the result of Lotfabad *et al.*, (2010) and Pereira *et al.*, (2012). In order to confirm the structure, UPLC-QTOF-MS analysis was carried out to elucidate types of functional groups, of different elements in the molecule. This approach allows the identification of the fatty acyl chain length, their location in the rhamnolipid structure and confirm the presence of the rhamnose unit. These were observed through *Anexos* *m/z* 333, 169 and 163 and confirm that the predominant congener was Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>.

These results demonstrate that the Bs produced by *E. cloacae* BAGM01 were in fact rhamnolipids. The combination of rhamnolipids congeners produced by this strain in which the predominant molecule was mono-rhamnolipid (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) as main congener, together with other fatty acids congeners was similar to Lotfabad *et al.*, (2010). Sabturani *et al.*, (2016) mentioned in their work that di-rhamnolipids is the predominant component of the rhamnolipids mixture produced by *Pseudomonas*. Here we showed that *Enterobacter* produced congeners of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids being the Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> the predominant

congener.

Finally, the capacity of *E. cloacae* BAGM01 to grow in hydrophilic and hydrophobic substrates and under marine environments are features that give rise to the production of secondary metabolites including rhamnolipids with attractive tensoactive and emulsifying activity and high stability making them promising candidates for application in different industries.

## 5.0. Conclusions

The marine environment of the GoM provides an important source of microbial communities conformed by bacteria that can produce molecules with tensoactive activity. This activity was observed in bacterial consortia and isolated strains from seawater and sediment samples. *Enterobacter cloacae* strains were isolated, being the predominant and ubiquitous genus in all sites and depths sampled in the GoM. Experimental design was used to successfully improve Bs production by *E. cloacae* BAGM01 in terms of ST reduction and EI<sub>24</sub>. The BAGM01 Bs crude extract recovered was characterized and showed high stability over a wide range of temperatures, pH and salinity, thus, presenting great potential for application in diverse biotechnological applications. The genomic analysis revealed the presence of genes involved in the synthesis of rhamnolipids, and others that are involved in aliphatic degradation and enzymes with activity on hydrophobic substrates. Moreover, structural characterization of these observations was corroborated by TLC, HPLC-derivatization, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and UPLC-QTOF-MS. The rhamnolipids obtained from *E. cloacae* BAGM01 had desirable characteristics and can compete with any other Bs and chemical surfactant in many applications.

## Acknowledgments

N.F.C.M acknowledges the fellowship from CONACYT (México) (CVU713861). “Research funded by the National Council of Science and Technology of Mexico-Secretary of Energy-Hydrocarbon trust project 201441. This is a contribution of Gulf of Mexico Research consortium (CIGoM). Special thanks are extended to PhD. Jesus Silva-Sánchez and M.C. Margarita Sánchez-Arias from Center for Infectious Disease Research. National Institute of Public Health and to Lourdes Martínez Aguilar from Genomic Ecology CCG-UNAM laboratory by her excellent technical assistance, and L.I. Victor Martínez-Valdez for his valuable assistance with image formatting. All spectroscopic and spectrometric data were obtained from LANEM-CONACyT, infrastructure 254145. We are thankful to PhD. M. Ángeles Ramírez-Cisneros, and the L.F. Ihtiel Benitez Cortes for their technical assistance

## References

Abbasi, A., & Amiri, S. (2008) Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. *Anexos Afr. J. Biotechnol.* 7: 1574-1576. ISSN 1684-5315

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BCM Genomics* 9: 1471-2164. doi.org/10.1186/1471-2164-9-75

Babcock-Adams L, Chanton JP, Joye SB, Medeiros PM (2017) Hydrocarbon composition and concentrations in the Gulf of Mexico sediments in the 3 years following the Macondo well blowout. *Environ Pollut* 229:329-338. doi: 10.1016/j.envpol.2017.05.078

Bahia FM, Carneiro de Almeida G, Pereira de Andrade L, Gonçalves Campos C, Rezende Queiroz L, Vieira Da Silva R L, Verardi Abdelnur P, Corrêa JR, Bettiga M, Skorupa Parachin N (2018) Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 8:1-10. doi.org/10.1038/s41598-018-21230-2

Bergey DH, Krieg NR, Holt (2010) *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*. Baltimore ©1984-©1989

Bertrand B, Martínez-Morales F, Rosas-Galván NS., Morales-Guzmán D, Trejo-Hernández MR (2018) Statistical Design, a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production: A Review. *Colloids Interfaces*. 2: 1-18 doi.org/10.3390/colloids2030036

Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28:464-469. doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703

Covarrubias-Rodríguez MB (2016) Caracterización de las comunidades microbianas en sedimentos del Golfo de México, mediante análisis metagenómico. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja Ca. 1-82.

Deshpande S, Pawar S, Nyayanit N, Satpute S (2010) Glycolipid biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* scos 46 isolated from oil contaminated sites of Pune city. *JAST*. 13:15-19. ISSN 0971-9563

Gallimore W (2017) *Marine Metabolites: Oceans of Opportunity*. Pharmacognosy Inc 377-400. doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00018-4

Godoy-Lozano E, Escobar A, Raggi L, Merino E, Gutiérrez-Ríos R, Juárez K, Segovia L, Licea A, Gracia A, Sánchez-Flores A, Pardo-López L (2018) Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Front Microbiol* 9: 2528. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02528

Hassanshahian M (2016) Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Mar Pollut Bull* 86: 361-366. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.043

Hošková M, Schreiberová O, Ježdík R, Chudoba J, Masák J, Sigler K, Řezanka T (2013) Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresour Technol* 130: 510-516. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.085

Ibrahim HMM (2018) Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil. Egypt J Pet 27:21-29. doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005

Jackson SA, Borchert E, O’Gara F, Dobson DWA (2015) Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. Curr Opin Biotech 33:176-182. doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.004

Jemil N, Hmidet N, Ayed HB, Nasri M (2018) Physicochemical characterization of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides and their applications in enhancing diesel oil biodegradation. Process Saf Environ Prot 117:399-407. /doi.org/10.1016/j.psep.2018.05.018

Khemili-Talmi S, Kebbouche-Gana S, Akmoussi-Toumi S, Angar Y, Gana ML (2015) Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. Extremophiles 19:1109-1120. doi.org/10.1007/s00792-015-0783-9

Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C (2012) Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardopsis* sp. B4. Desalination 285:198-204. doi.org/10.1016/j.desal.2011.10.002

Kimes NE, Callaghan AV, Aktas DF, Smith WL, Sunner J, Golding BT, Drozdowska M, Hazen TC, Suflita JM, Morris PJ (2013) Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. Front Microbiol 4: 50. doi.org/10.3389/fmicb.2013.00050

Kiuru P, Muller CD, Vuorela H, Yli-kauhaluoma J (2014) Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. Planta Med 80:1234-1246. doi.org/10.2771/43949

Leite GGF, Figueirôa JV, Almeida TCM, Valôes JL, Marques WF, Duarte MDDC, Goralch-Lira K (2016) Production of Rhamnolipids and Diesel Oil Degradation by Bacteria Isolated from Soil Contaminated by Petroleum. Biotechnol Prog 32: 262-270. doi.org/10.1002/btpr.2208

Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C (2013) Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. Plos one 8: e74487. doi.org/10.1371/journal.pone.0074487

López-Martínez S, Aguilar-Guadarrama A. Berenice, Rios MY (2011) Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. Phytochem. Lett. 4: 275-279. doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.014

Lotfabad BT, Abassi H, Ahmadkhaniha R, Roostaazad R, Masoomi F, Zahiri HS, Ahmadian G, Vali H, Noghabi KA (2010) Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. Colloid Surface B 81: 397-405

Martínez-Toledo A, Rodríguez-Vázquez R (2011) Response surface methodology (Box-Behnken) to improve a liquid media formulation to produce biosurfactant and phenanthrene removal by *Pseudomonas putida*. *Ann Microbiol* 61: 605-613. [doi.org/10.1007/s13213-010-0179-0](https://doi.org/10.1007/s13213-010-0179-0)

Mata-Sandoval JC, Karns J, Torrents A (1999) High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromatogr. A.* 864: 211–220. [doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00979-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00979-6)

Nitschke M, Sousa e Silva S (2017) Recent Food Applications of Microbial Surfactants. *Crit Rev Food Sci* 58:631-638. [doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635)

Ortega-de la Rosa DN, Vázquez-Vázquez JL, Huerta-Ochoa S, Gimeno M, Gutiérrez Rojas M (2018) Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. *Bioprocess Biosyst Eng* 41:859-869. [doi.org/10.1007/s00449-018-1920-5](https://doi.org/10.1007/s00449-018-1920-5)

Pereira BL, Fernandes AFA., Galeno SS, Dos Santos JC, Venus J, Schneider R, Silvério S (2017) Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. *Bioresour. Technol* 243: 264-272. [doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.088](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.088)

Pereira JFB, Gudiña EJ, Dória ML, Domingues MR, Rodrigues LR, Teixeira JA, & Coutinho JAP. (2012). Characterization by electrospray ionization and tandem mass spectrometry of rhamnolipids produced by two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Brazilian crude oil. *EJMS.* 18: 399–406. [doi.org/10.1255/ejms.1194](https://doi.org/10.1255/ejms.1194); [doi.org/10.1255/ejms.1194](https://doi.org/10.1255/ejms.1194)

Roldán-Carrillo T, Martínez-García X, Zapata-Peñasco I, Castorena-Cortéz G, Reyes-Avila J, 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. *Colloids Surf B* 86:384-389. [doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.026](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.026)

Rosas-Galván SN, Martínez-Morales F, Marquina-Bahena S, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Bertrand B, León-Rodríguez R, Guzmán-Aparicio J, Álvarez-Berber L, Trejo-Hernández MR (2018) Improved production, purification and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain. *Biotechnol Appl Biochem* 69: 690-700. [doi.org/10.1002/bab.1652](https://doi.org/10.1002/bab.1652)

Saburani N, Latif J, Radiman S, Hamzah A (2016) spectroscopic analysis of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T. *MJAS.* 20:31-43

Saikia RR, Deka H, Goswami D, Lahkar J, Borah SN, Patowary K, Baruah P, Deka S (2014) Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. *J Surfactants Deterg* 17: 563-571. [doi.org/10.1007/s11743-013-1520-y](https://doi.org/10.1007/s11743-013-1520-y)

Sammarco PW, Kolian SR, Warby RAF, Bouldin JL, Subra WA, Porter SA (2013) Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Mar Pollut Bull* 73: 129-143. doi.org/10.1016/j.marpollbul.2013.05.029

Sari M, Kusharyoto W, Artika I (2014) Screening for biosurfactant-producing yeast: confirmation of biosurfactant production. *Biotechnology* 13:106-111. doi.org/10.3923/biotech.2014.106.111

Schenk T, Schuphan I, Schmidt B, (1995) High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Chromatogr. A*. 693:7-13. doi.org/10.1016/0021-9673(94)01127-Z

Siegmund I, Wagner F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted *Pseudomonas* species During Growth on Mineral Agar. *Biotechnol Tech* 5:265-268

Soares Dos Santos A, Pereira JN, Freire DM (2016) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ* 4:e2078. doi.org/10.7717/peerj.2078

Twigg MS, Tripathi L, Zompra A, Salek K, Irorere VU, Gutierrez T, Spyroulias GA, Marchant R, Banat IM (2018) Identification and characterisation of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 8537-8549. doi.org/10.1007/s00253-018-9202-3

Wadekar SD, Kale SB., Lali AM, Bhowmick, DN, Pratap AP (2012) Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42: 249–266. doi:10.1080/10826068.2011.603000

Fig.1

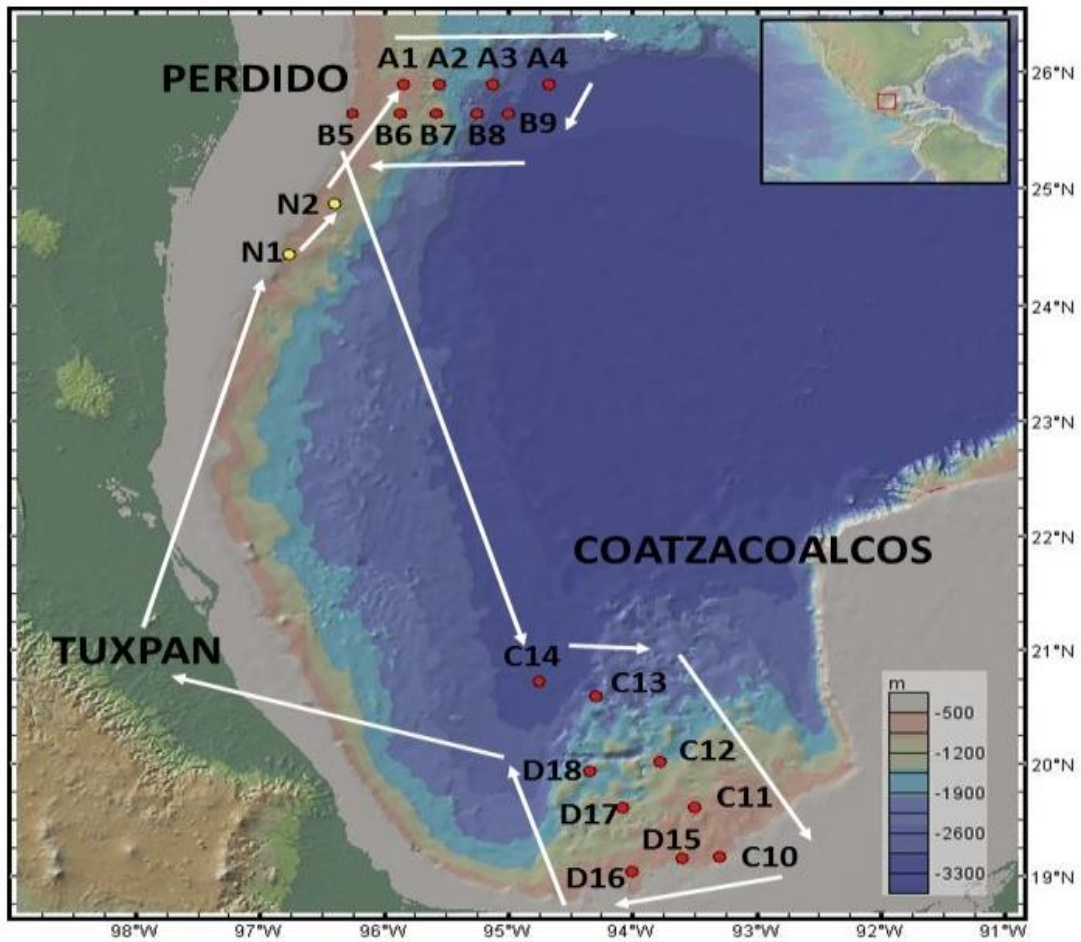
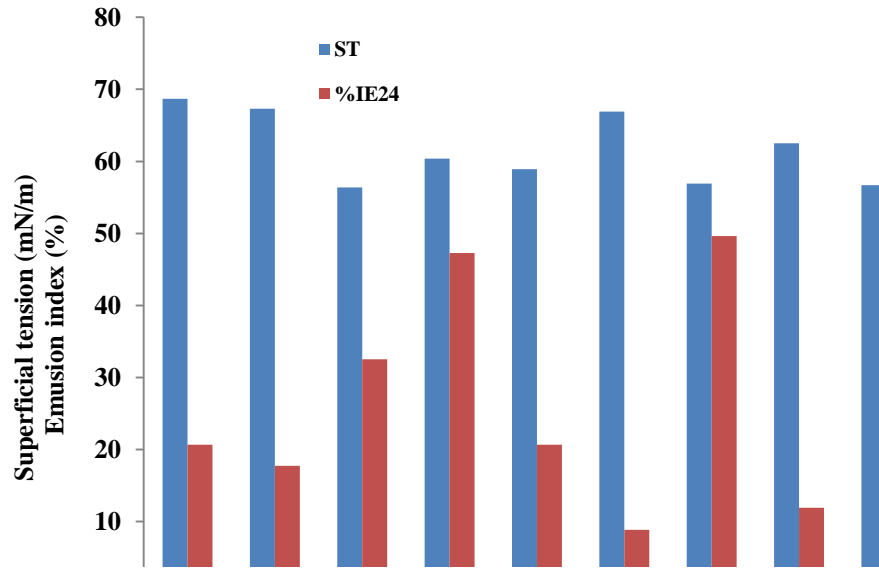


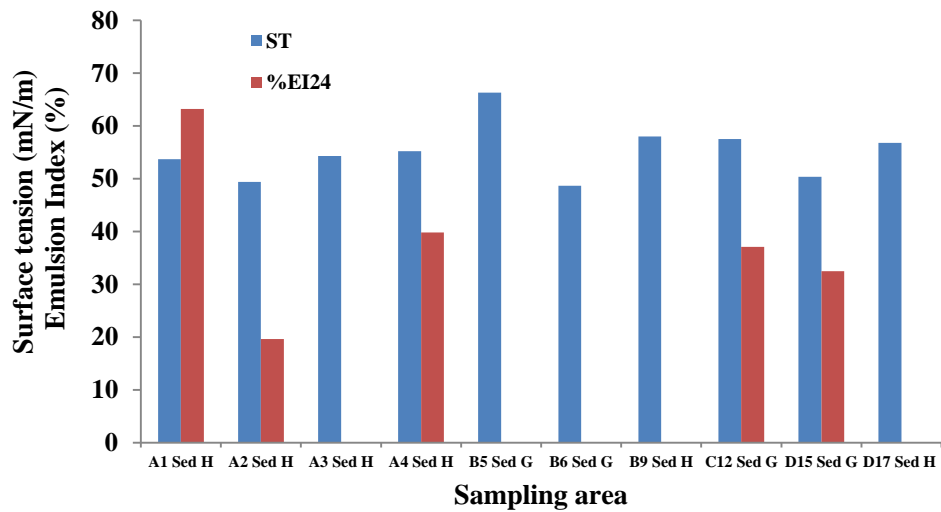
Fig.1 Sampling locations of water and sediments of the Gulf of Mexico (GoM)

Fig. 2

A)



B)



**Fig. 2** Screening of Bs activity in consortia isolated of the Gulf of Mexico. A) in water column and B) in marine sedimentation. (mO= Minimum oxygen, Mf= Maximum fluorescence, Seabed, Sed: Sediment)

Fig. 3

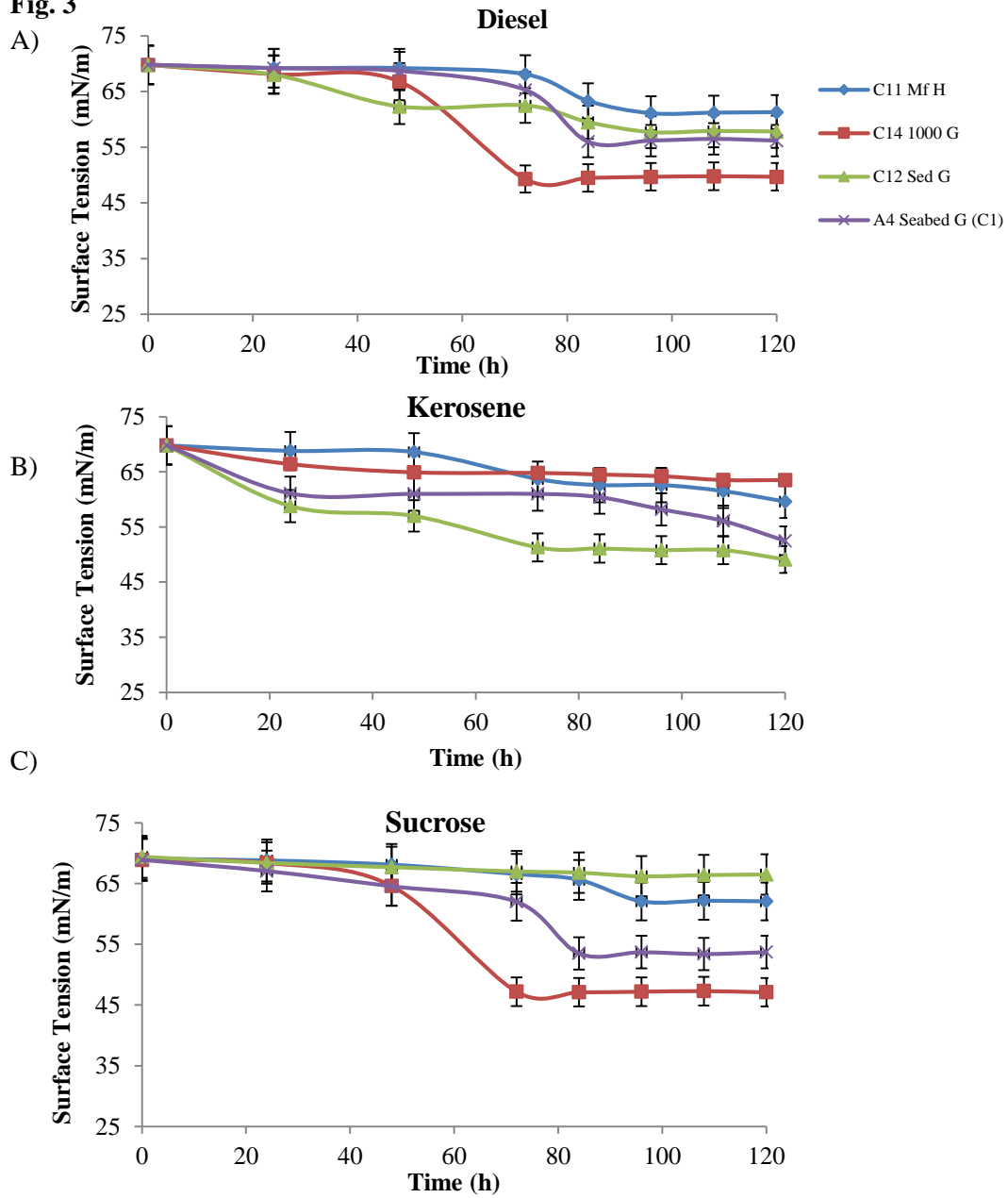
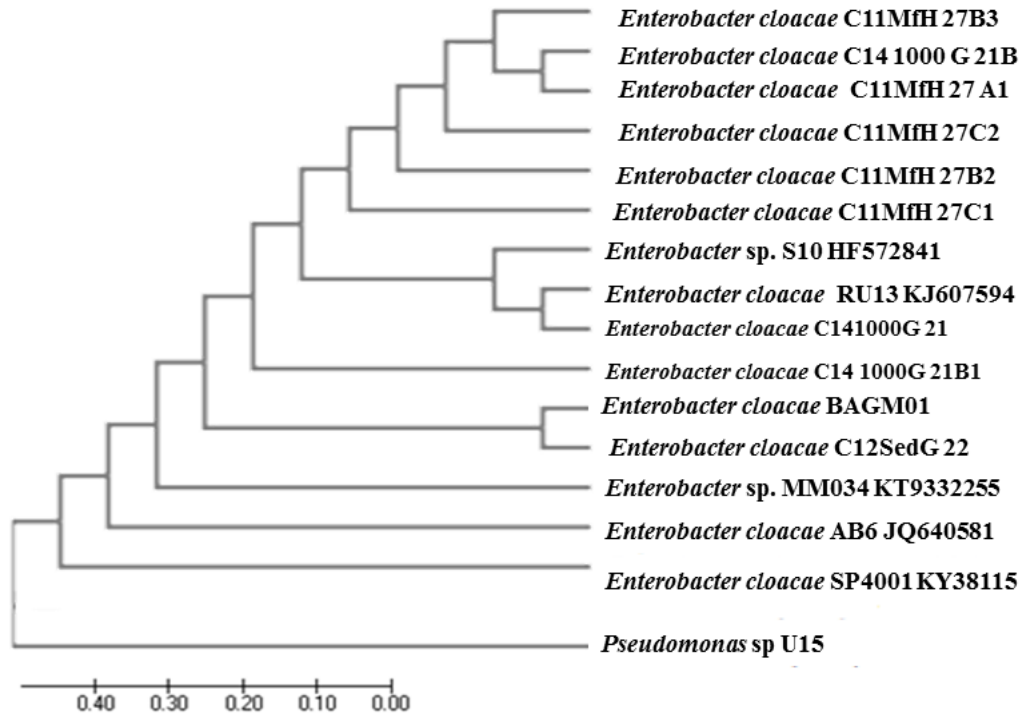


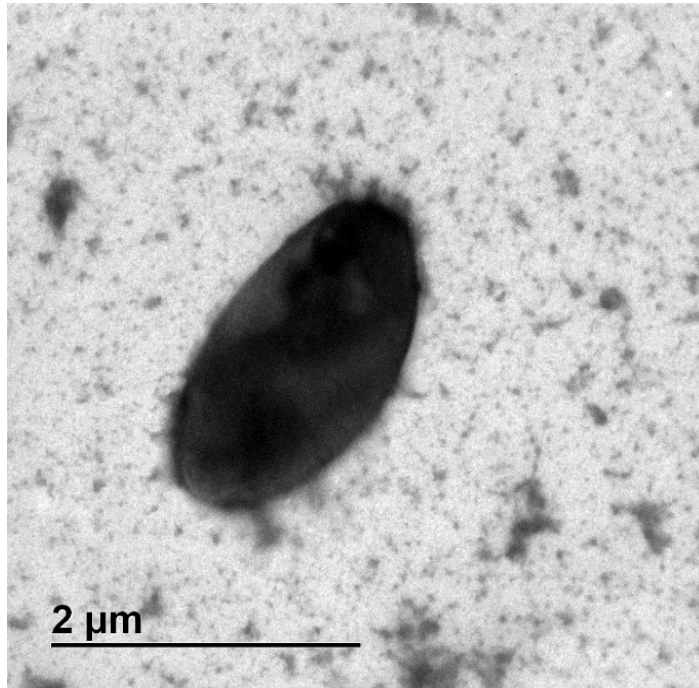
Fig. 3 Effect of different carbon sources A) Diesel, B) Kerosene and C) Sucrose on surface tension reduction by consortia isolated from Gulf of Mexico

Fig. 4

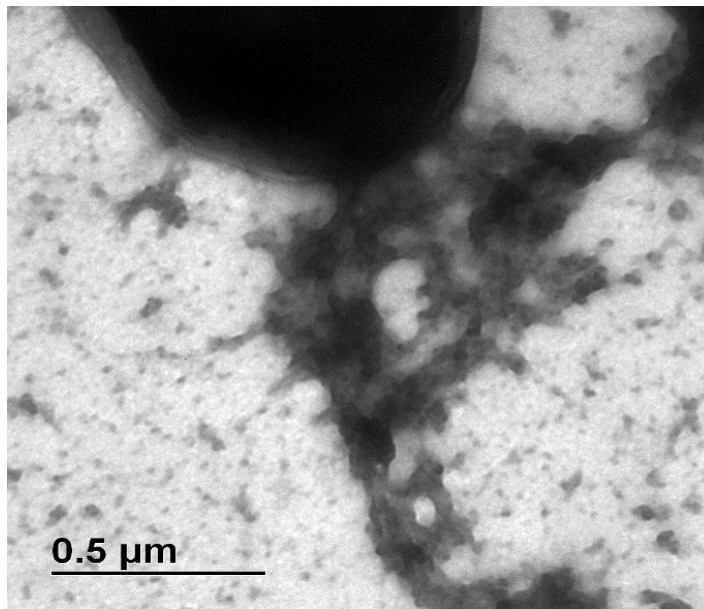


**Fig. 4** Phylogenetic tree of rRNA sequences of *Enterobacter cloacae* strains isolated from the water column and sediments of the Gulf of Mexico. The tree was constructed using sequences of comparable region of the 16s rRNA gene sequences available in public databases

**Fig. 5**  
A)



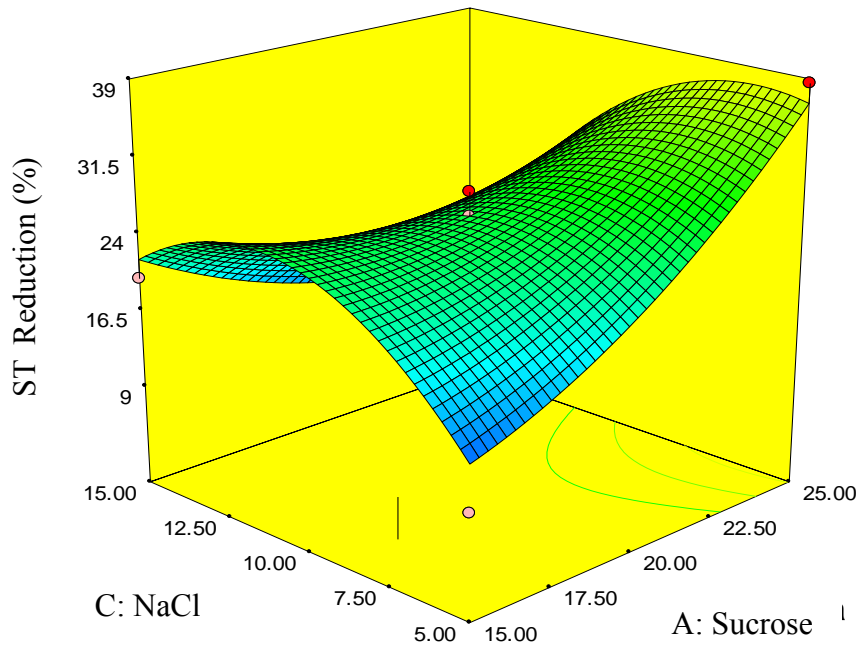
B)



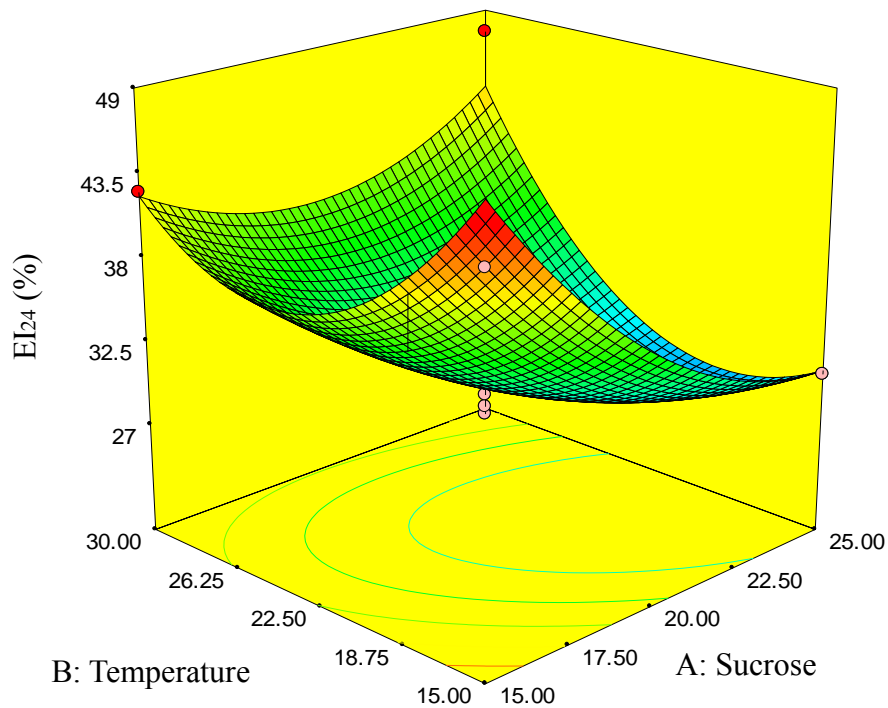
**Fig. 5** Cell morphology of *Enterobacter cloacae* BAGM01, cultivation of 24 h, 150 rpm, 30 °C, in minimum medium with sucrose A) Short bacillus B) flagellum

**Fig. 6**

A)

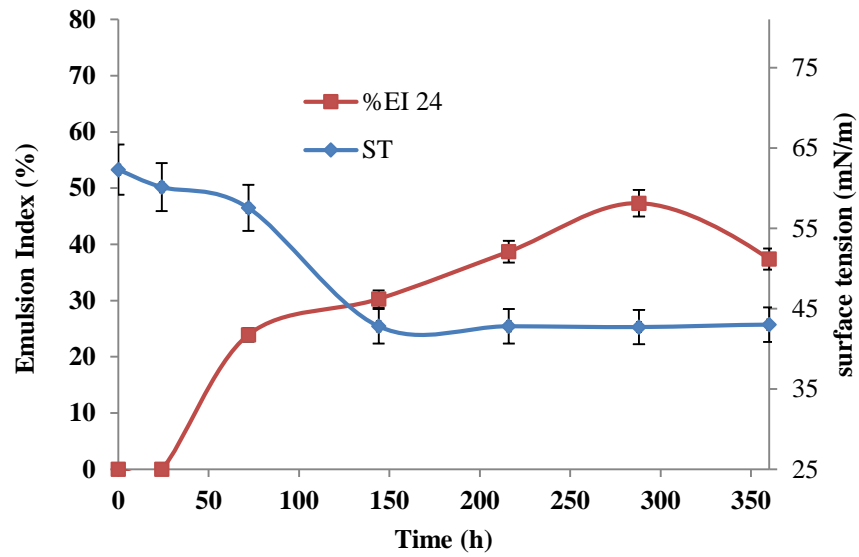


B)



**Fig. 6.** Factors and interactions with significant effect on the production of Bs by *E. cloacae* BAGM01. A) Sucrose-NaCl interaction with effect on the reduction of the ST (%), B) Sucrose-temperature interaction on the emulsion index (% IE<sub>24</sub>)

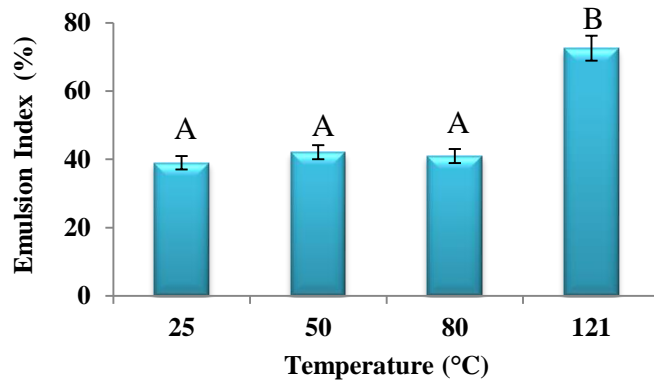
Fig. 7



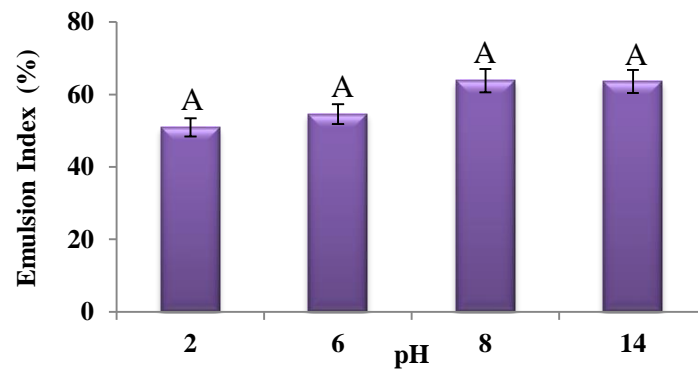
**Fig. 7** BAGM01 Bs production, surface tension and IE<sub>24</sub> profile of *E. cloacae* BAGM01 grown in optimized medium at 30°C, 150 rpm

**Fig.8**

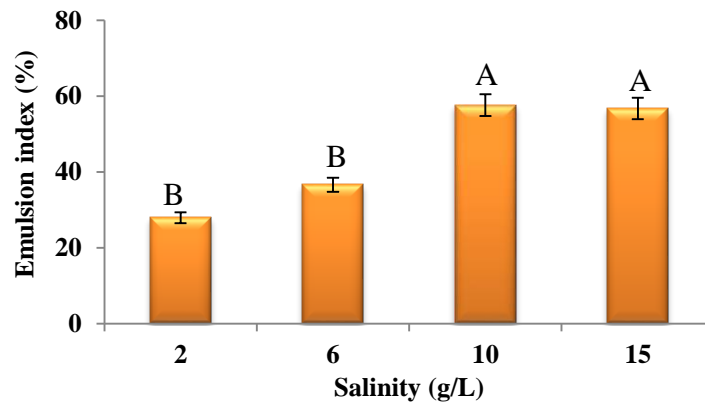
A)



B)

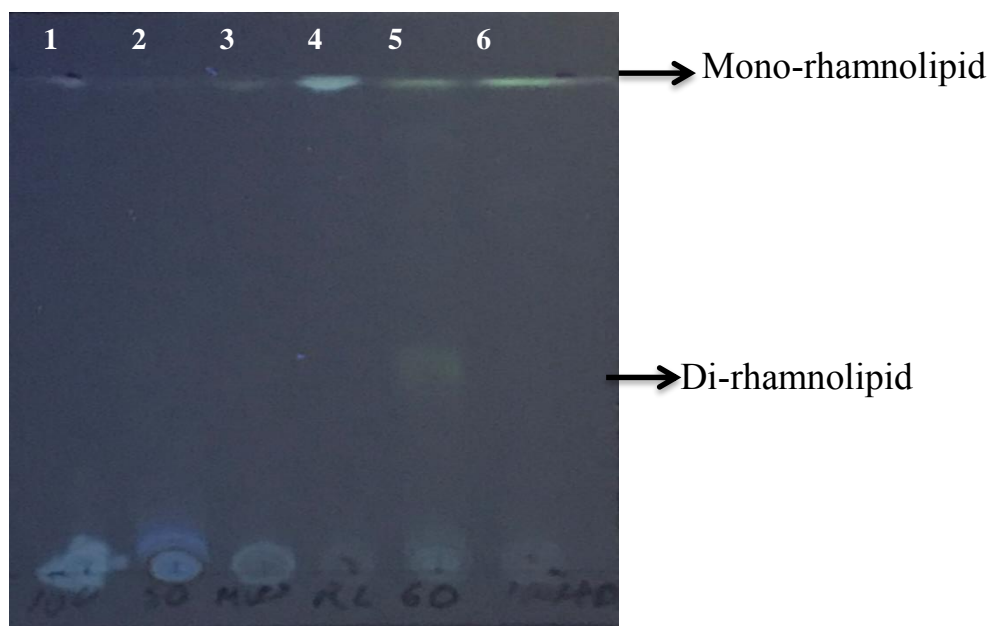


C)



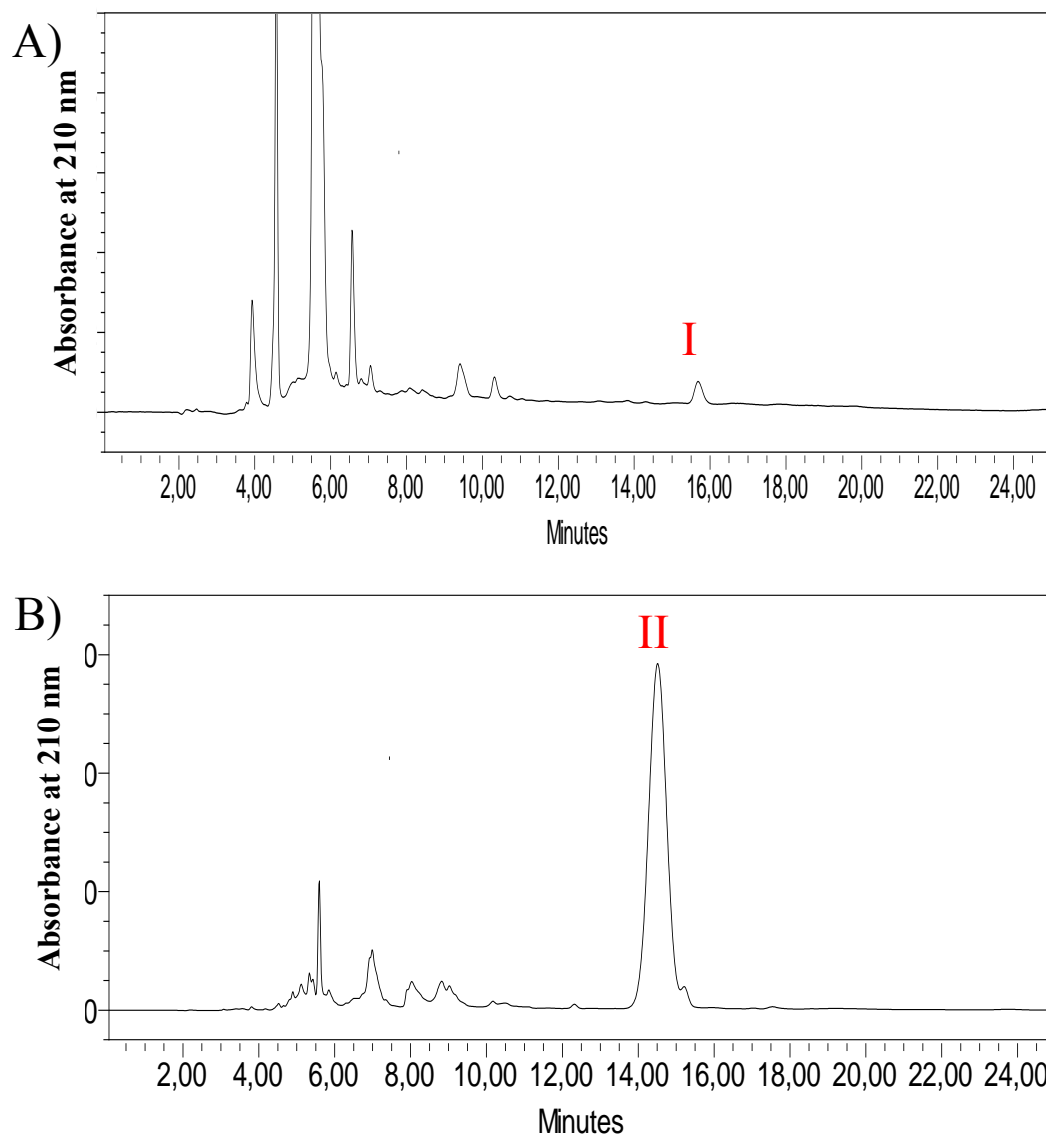
**Fig. 8.** Effect of A) temperature, B) pH and C) salinity, over stability of Bs crude extract of *Enterobacter cloacae* BAGM01. Equal letters means statistically non-significant differences

Fig. 9



**Fig. 9** TLC fractions of crude extract of *E. cloacae* BAGM01 Revealed UV, 1) Fraction 100% H<sub>2</sub>O, 2) Fraction 80:20% 3) Crude extract BAGM01, 4) Rhamnolipid control, 5- Fraction 60:20%, 6) Fraction 100% Methanol at short wavelength

Fig. 10.



**Fig. 10** Characterization by HPLC-derivatized method of rhamnolipids produced by *E. cloacae* BAGM01. (A) BAGM01 Bs-p-bromophenacyl ester and (B) reference compounds Rhamnolipid-L-p-bromophenacyl ester

Fig. 11

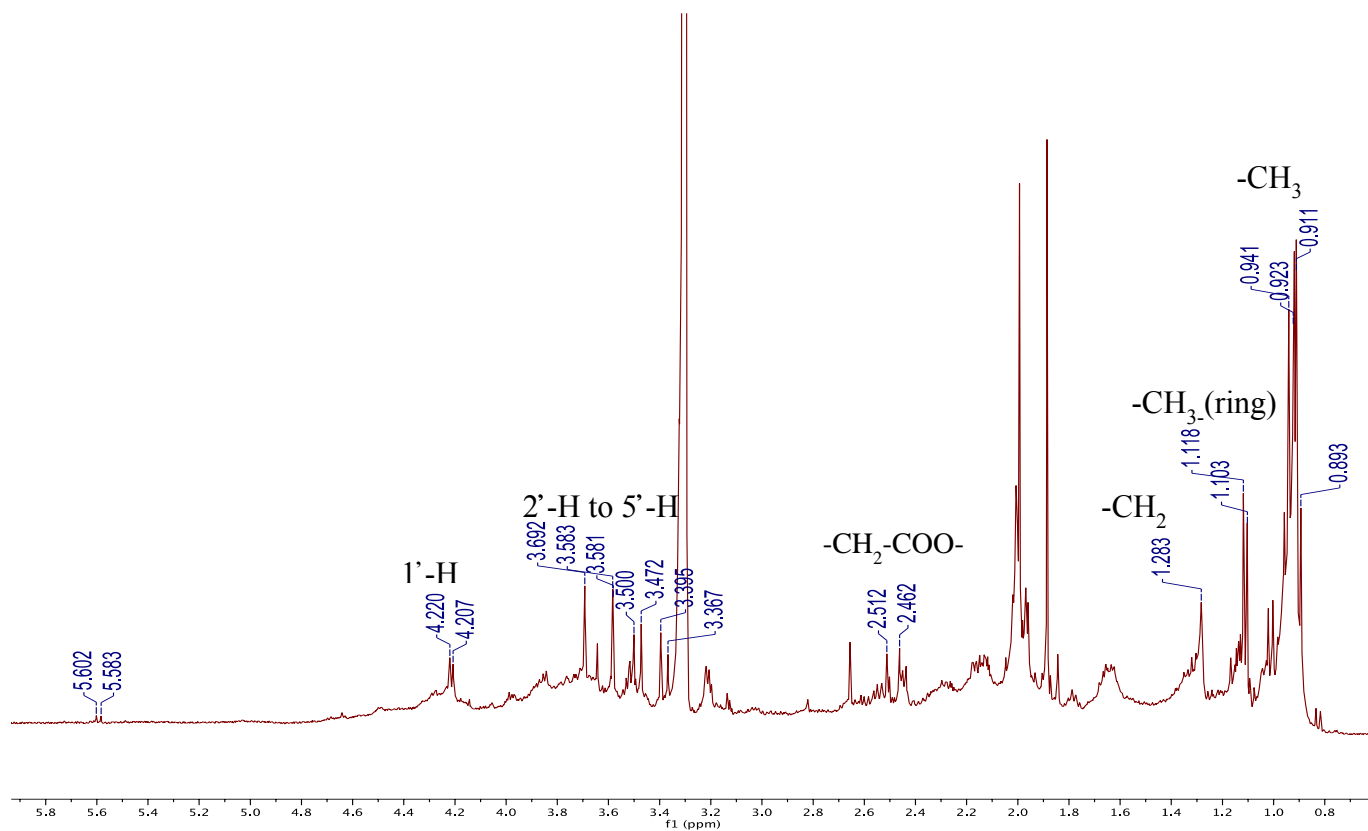
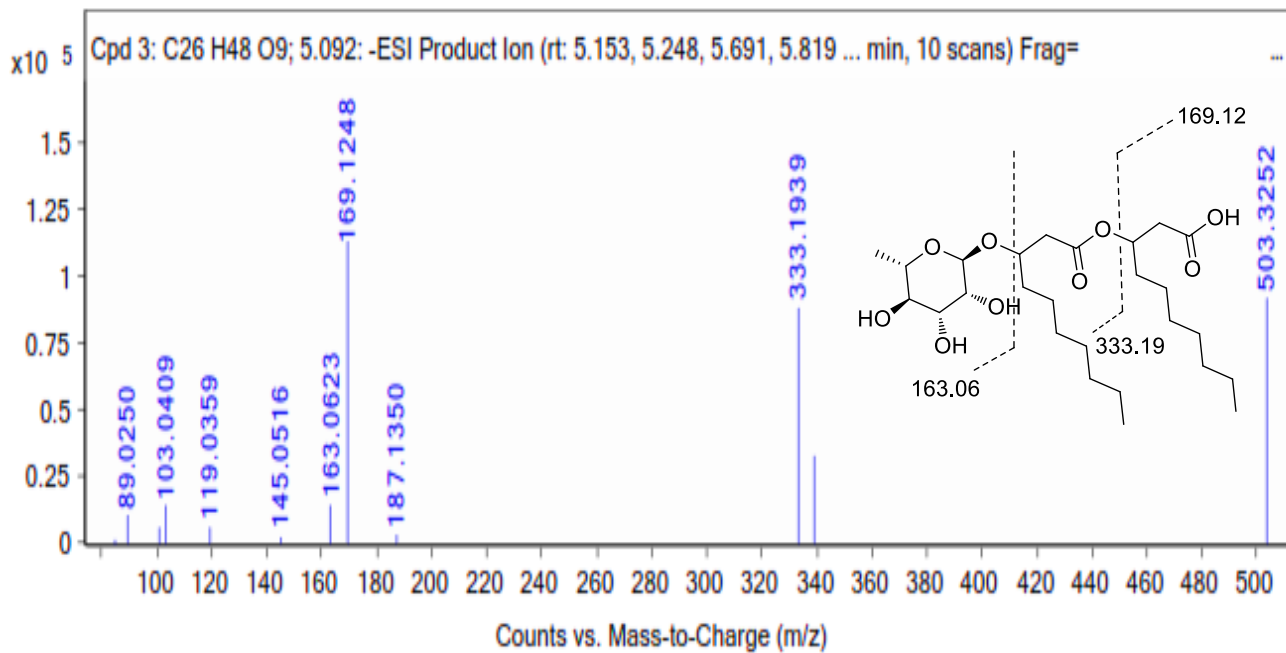
**Fig.11**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of rhamnolipid by *E. cloacae* BAGM01 isolated from GoM

Fig. 12



**Fig. 12** ESI-MS/MS spectra in negative ion mode of fragmentation of mono-rhamnolipid (Rha-C10-C10) ( $m/z$  503) produced by *E. cloacae* BAGM01

**Table 1.** Evaluation of the carbon source, temperature and concentration of NaCl in the production of BS by *E. cloacae* BAGM01 strains (Box-Behnken design).

Treatment	Variable			Response			
	A: Su- crose	B: tempera- ture	C: NaCl	% Reduction <sup>a</sup> of ST	% Reduction <sup>b</sup> of ST	% IE <sub>24</sub> <sup>a</sup>	% IE <sub>24</sub> <sup>b</sup>
1	-1	-1	0	37.1	37.0	44.6	48.4
2	1	-1	0	26.6	32.9	30.4	30.7
3	-1	1	0	35.5	29.2	42.4	42.1
4	1	1	0	47.7	47.8	47.5	43.7
5	-1	0	-1	9.2	13.7	43.9	42.5
6	1	0	-1	38.6	36.7	24.1	26.3
7	-1	0	1	19.8	21.7	35.6	33.4
8	1	0	1	17.7	13.2	32.0	33.4
9	0	-1	-1	38.5	34.1	42.7	40.3
10	0	0	-1	22.7	22.1	32.7	30.2
11	0	-1	1	15.0	13.2	31.7	30.0
12	0	1	1	25.4	29.8	40.2	42.6
13	0	0	0	25.7	26.4	28.2	29.9
14	0	0	0	25.8	26.4	27.7	29.9
15	0	0	0	28.3	26.4	34.8	29.9
16	0	0	0	25.9	26.4	29.0	29.9

Coded values for sucrose g/L: (-1) = 15; (0) = 20; (+1) = 25

Coded values for temperature °C: (-1) = 15; (0) = 25; (+1) = 30

Coded values for NaCl g/L: (-1) = 5; (0) = 10; (+1) = 15.

<sup>a</sup> Experimental data.

<sup>b</sup> Estimated data.

**Table 2.** Isolated microbial consortium of marine sediments and column waters at different

Consortia	Depth (m)	Hemolytic activity	CTAB-methylene blue	Surface Tension (mN/m)	%EI <sub>24</sub>
A1 Mf H	61	+	-	-	+
A1 mO <sub>2</sub> G	253	+	-	-	+
A1 Seabed H(C1)	859	+	-	+	+
A1 Seabed H (C2)	859	+	-	+	+
A2 Mf G (C1)	52	+	-	+	+
A2 Mf G (C2)	52	+	-	+	+
A4 Seabed G (C1)	2946	+	+	+	+
C11 Mf H	48	+	+	+	+
C14 1000 G	1000	+	+	+	-
A1 Sed H	879	-	-	+	+
A2 Sed H	2066	+	-	+	+
A3 Sed H	2390	-	-	+	-
A4 Sed H	2966	-	-	+	+
B5 Sed G	550	-	-	+	-
B6 Sed G	1018	-	-	+	-
B9 Sed H	2946	-	-	+	-
C12 Sed G	1329	+	+	+	+
D15 Sed G	622	+	-	+	+
D17 Sed H	900	-	-	+	-

\*mO= minimum oxygen,  
 \*Mf= Maximum fluorescence  
 \*Sed: sediment

Table 3. Nucleotide alignment analysis (BLAST, from partial sequences of the 16S ribosomal gene).

Isolated	BLAST	Total cover	Identity (%)
C141000G 21	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial se- quence	100% 1404	100%
C141000G 21B1	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial se- quence	93% 1810	98%
C12SedG 22	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial se- quence	100% 1404	100%
C11MfH 27 A1	<u><i>Enterobacter</i> sp. BAB-3165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	98% 1033	87%
C11MfH 27B2	<u><i>Enterobacter cloacae</i> strain OS5.7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	92% 1602	99%
C11MfH 27B3	<i>Enterobacter cloacae</i> subp dissolvens strai TN2002013 16s ribosomal RNA gen, parcial se- quence	92% 1607	99%
C11MfH 27C1	<u><i>Enterobacter cloacae</i> strain VITPASJ1 16S riboso- mal RNA gene, partial sequence</u>	58% 1596	99%
C11MfH 27C2	<u><i>Enterobacter cloacae</i> strain OS5.7 16S ribosomal RNA gen</u>	57% 1583	99%
BAGM01	<u><i>Enterobacter cloacae</i> strain VITPASJ1 16S riboso- mal RNA gene, partial sequence</u>	58% 1598	99%
A4 Seabed G 48B	<u><i>Enterobacter</i> sp. cp-h73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	96% 1611	99%

**Table 4.** Biochemical characterization of *E. cloacae* isolated strains from GoM (API 20E test).

Characteristics	BAGM01	C141000G 21	C141000G 21B1	C12SedG 22	A4SeabedG 48B	C11MfH 27A1	C11MfH 27B2	C11MfH 27B3	C11MfH 27C1	C11MfH 27C2
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dehydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoín Production	+	+	+	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Mannitol Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sorbitol Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhramnose Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melobiosa Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose Fermentation/oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO <sub>2</sub> Production	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
N <sub>2</sub> Production	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

\* N/A: Not Analyzed

**Table 5.** The antibiotic sensibility of *E. cloacae* BAGM01.

Antibiotic sensitivity	<i>E. cloacae</i> BAGM01
Tetracycline	+
Chloramphenicol	+
Vancomycin	-
Polymyxin B	+
Bacitracin	-
Erythromycin	+
Nitrofurantoin	+
Tobramycin	+
Trimethoprim	+
Gentamicin	+
Streptomycin	+
Ampicillin	+
Cefoxitin	-
Clindamycin	-
Kanamycina	+
Piperacillin	+
Nalidixic acid	+

**Table 6.** Evaluation of BS activity in strains *E. cloacae*.

Strain	Surface tension (mN/m)	Emulsion index (% EI <sub>24</sub> )	CTAB	Hemolytic activity	Drop collapse
<i>Enterobacter cloacae</i> C141000G 21	50.8	0	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C141000G 21B1	46.0	21.41	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C12SedG22	55.3	0	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C11MfH 27 A1	46.2	0	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C11MfH 27B2	40.8	21.58	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C11MfH 27 B3	48.1	20.04	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C11MfH 27C1	35.4	0	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> C11MfH 27C2	44.8	0	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> BAGM01	35.4	58.4	+	+	+

\*Mf: Maximum fluorescence

\*Sed: Sediments

**Table 7.** Chemical assignments of purified rhamnolipid in  $^1\text{H}$  NMR spectra produced by *E. cloacae* BAGM01.

Assign- ment	$^1\text{H}$ Chemical shift (ppm) Rhamnolipid BAGM01
-CH <sub>3</sub>	0.91
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1.28
-CH <sub>2</sub> -COO-	2.4, 2.5
-CH <sub>3</sub> .(ring)	1.11
1'-H	4.21
2'-H to 5'-H	3.1- 3.8

**Table 8.** Chemical compositions with varies of fatty acids in rhamnolipid congeners produced by *E. cloacae* BAGM01

Rhamnolipid Congeners	M-H ( <i>m/z</i> )
Mono-rhamnolipids	
Rha-C8-C10	475
Rha-C10-C8	555*
Rha-C10-C10	503
Rha-C10-C12	531
Rha-C14-C12	588
Rha-C18-C18	728
Di-rhamnolipids	
Rha-Rha-C10-C12:1	676
Rha-Rha-C10-C12	678
Rha-Rha-C12-C12	706
Rha-Rha-C16-C16	818

\*M+Br<sup>-</sup>



Cuernavaca, Morelos a 13 Feb - 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN  
RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO  
DE MÉXICO

Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CUIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## 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

Cuernavaca, Morelos a 13 Febrero 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN  
RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO  
DE MÉXICO

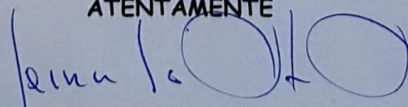
Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CURIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

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

ATENTAMENTE



Dr. Fernando Martínez Morales

Cuernavaca, Morelos a 13 febrero de 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN  
RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO  
DE MÉXICO

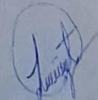
Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CURIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

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

ATENTAMENTE



Dr. Luis Caspeta Guadarrama



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Centro de Investigación en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos a 13 febrero 2020

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN  
RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO  
DE MÉXICO

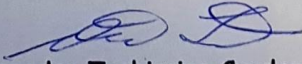
Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CURIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

## VOTO

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

ATENTAMENTE

  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa



Cuernavaca, Morelos a 17 - 02 - 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO DE MÉXICO

Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CUIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Cuernavaca, Morelos a 13-Febrero-2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama  
Dr. Luis Caspeta Guadarrama  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber  
Dr. Marco Antonio Rogel Hernández

Tesis: PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN DE UN  
RAMNOLÍPIDO DE LA CEPA *Enterobacter cloacae* BAGM01 AISLADA DEL GOLFO  
DE MÉXICO

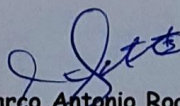
Alumno que la presenta a revisión: NIDYA FABIOLA CURIEL MACIEL

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**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