

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ingeniería



***“Optimización de condiciones de cultivo para la
producción de biosurfactantes microbianos.”***

Tesis que presenta

Maria Noemi Rios Ruelas

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Directores de tesis: Dra. Aseneth Herrera Martínez

Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez

Mexicali B.C.

19 de noviembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios principalmente por prestarme vida y salud para cumplir cada uno de los sueños puestos en mí. Por enviarme a personas que me ayudan a mantenerme fuerte en circunstancias difíciles.

Agradezco a mi familia por confiar en mí en cada paso que doy para cumplir una meta más, por siempre apoyarme y nunca decirme que no a cumplir mis sueños si no al contrario me impulsan a seguir adelante y no rendirme.

Agradezco a mis amigos de siempre por estar ahí, escuchándome hablar cada vez de lo mismo y darme palabras de apoyo. Aquellos que hice en el camino hasta hoy, que a pesar de que no estuvieron en el proceso, son parte de él.

Agradezco a la Dra. Aseneth por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo junto con el Dr. Fernando. Por compartir sus conocimientos, confiar y permitirme trabajar en el laboratorio de bioingeniería.

Agradezco a Conacyt por otorgarme una beca durante este periodo de educación, ya que por esto es que logre realizar un sueño más.

“Esfuézate y se valiente...”

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	1
2.1 Laguna Salada	1
2.2 Microorganismos extremófilos	2
2.3 Mezquite	2
2.4 Contaminación de suelos por hidrocarburos y metales pesados.....	3
2.5 Surfactantes sintéticos	3
2.6 Biosurfactantes.....	5
2.7 Sideróforos.....	8
3. ANTECEDENTES.....	9
3.1 Aplicaciones de BS en la industria.....	9
3.2 Biorremediación con Biosurfactantes.....	9
3.3 Residuos agroindustriales en la producción de BS.....	11
3.4 Variación de la fuente de nitrógeno y sus efectos en la producción de biosurfactantes.....	14
3.5 Aislados microbianos utilizados en el presente trabajo de investigación.....	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6. HIPÓTESIS.....	18
7. METODOLOGÍA.....	19
7.1 Reactivación de aislados microbianos.....	19
7.2 Identificación de aislados microbianos productores de biosurfactantes y cinética de crecimiento bacteriano.....	19
7.3 Descripción morfológica y tinción de Gram	20
7.4 Tensión superficial de los sobrenadantes celulares.....	21
7.5 Determinación del índice de emulsificación a las 24 horas.....	21
7.6 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de carbono.....	21
7.7 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de nitrógeno	22
7.8 Aislamiento de biosurfactantes.....	22
7.9 Pruebas de solubilidad del biosurfactante aislado en diferentes solventes	23

7.10 Pruebas de termoestabilidad, halotolerancia y resistencia a niveles altos de pH del biosurfactante.....	23
7.11 Producción de Sideroforos.....	23
7.12 Análisis estadísticos.....	24
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
8.1 Reactivación de aislados microbianos.....	25
8.2 Identificación de aislados microbianos productores de biosurfactantes y cinética de crecimiento bacteriano.....	26
8.3 Descripción morfológica y tinción de Gram.....	26
8.4 Tensión superficial.....	31
8.5 Determinación del índice de emulsificación a las 24 horas.....	32
8.6 Evaluación de la producción de biosurfactantes con fuentes de carbono alterna: harina de mezquite y aceite de oliva.....	33
8.7 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de nitrógeno.	37
8.8 Aislamiento de biosurfactantes.....	39
8.9 Pruebas de solubilidad.....	40
8.10 Pruebas de estabilidad.....	43
8.11 Sideróforos.....	45
9. CONCLUSIONES.....	51
10. BIBLIOGRAFIA.....	54

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se centra en evaluar diferentes condiciones de cultivo en las cuales se varía la fuente de carbono y de nitrógeno para lograr un alto rendimiento en la producción de biosurfactantes (BS) de origen microbiano (Lara-Severino, et al. 2013). En base a los resultados, se establecieron las condiciones generales del cultivo, esperando encontrar el sustrato que permita obtener un bajo costo de producción y un buen rendimiento que a futuro pueda permitir el escalamiento de estas biomoléculas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Laguna Salada

El acuífero Laguna Salada, localizado en el estado de Baja California, entre los paralelos 31°23' y 32°39' de latitud norte y los meridianos 115°02' y 115°59' de longitud oeste, cubre una superficie aproximada de 5,689 km². En la superficie de este lugar, se presentan tres tipos de clima: el clima seco semicálido en la porción sur del acuífero; el clima seco templado en los extremos oriental y occidental, en las zonas topográficamente más altas; y el tipo muy seco semicálido en la porción central del acuífero (CONAGUA, 2018).

Este sitio ha sido objeto de estudio del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California. En 2015, López Arreguin registró la textura del suelo de la Laguna Salada, como tipo franco arcillo-limoso en algunas zonas y arcilloso en otras. Con un pH 8.3 a 9.4, conductividad eléctrica de 71 dS/m hasta 185 dS/m, contenido de 0.18 a 1.82 % de materia orgánica, 18 a 33 kg ha⁻¹ de nitrógeno, 179 a 184 kg ha⁻¹ de fósforo y 2,628 kg ha⁻¹ de potasio.

Es sabido que las condiciones climáticas y edáficas, tales como en el pH del suelo, contenido de carbono, fertilidad y procesos biogeoquímicos, permiten la adaptación de las plantas y los microorganismos del suelo (Delgado-Baquerizo et al., 2016; Eldridge, 2020; Berdugo et al., 2020), por lo que surge el interés de estudiar los microorganismos

cultivables presentes en este tipo de condiciones ambientales y las capacidades biotecnológicas de estos microorganismos.

2.2 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos son aquellos microorganismos que sobreviven y crecen en ambientes con condiciones extremas, se pueden aislar de ambientes con temperaturas extremas, alto o bajo pH, elevada salinidad, entre otros. Estos microorganismos pueden adaptarse a ambientes con factores extremos (Morozkina et al., 2010) y se clasifican en base a la condición físicas, químicas o combinaciones de éstas del ambiente donde se desarrollan como: termófilos (temperatura óptima de crecimiento entre 45 °C y 80 °C), dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C) (Gómez y Perez, 2007), psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento por abajo de 10 °C); acidófilos (pH óptimo de crecimiento por abajo de 5), alcalófilos (pH óptimo de crecimiento por arriba de 8), halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % de sal), osmófilos (viven en altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm) (Kumar, Awasthi y Singh, 2011; Maliukova, 1983; Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016; Raddadi, Cherif, Daffonchio, Neifar y Fava, 2015).

2.3 Mezquite

El mezquite (*Prosopis sp.*) es un recurso biótico con amplia distribución geográfica y ecológica en zonas áridas y semiáridas de México, Sudán y Australia (Rodríguez et al., 2014). Esta especie vegetal es un árbol de 6-10 m de alto, con tallo recto, corteza lignificada con fisuras de color negruzca; hojas caducas, compuestas, bipinnadas verde pálido y glabras; presenta flores en racimos axilares, de color blanco-amarillento, muy perfumadas; el fruto es una vaina de color pardo amarillenta a rojiza, casi cilíndrica terminada en punta. El mezquite es utilizado en programas de reforestación urbana, es una especie muy resistente a la sequía; su madera se utiliza como combustible, construcción de cercas, sus vainas como forraje y alimento para el ser humano, su resina

se emplea en la fabricación de barnices y pegamentos, mientras que sus flores son importantes en la producción de miel.

En Mexicali hay poca diversidad del género *Prosopis*, en su mayoría *Prosopis glandulosa* y *P. pybescens* son los géneros que destacan en los Valles de Mexicali (Flores et al., 2014).

2.4 Contaminación de suelos por hidrocarburos y metales pesados.

Los hidrocarburos son combustibles fósiles, estos son utilizados alrededor del mundo principalmente para generar diferentes formas de energía, debido a su bajo costo y accesibilidad (Valdés-González et al., 2020). Sin embargo, en ocasiones puede generar contaminación de agua y suelo, a casusa de derrames accidentales, sobre todo en países productores (Velásquez, 2017; Zamora, Ramos y Arias, 2012). Debido al crecimiento que ha tenido la explotación de hidrocarburos, la contaminación por estos ha sido de igual forma significativa. Entre 2008 y 2013 en México, se identificaron 627 sitios contaminados por emergencias ambientales, cuyos responsable fue Pemex con 127 toneladas (20.3 %) (Semarnat, 2014).

Los hidrocarburos, impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos físicos y químicos simultáneos, como evaporación y penetración. Según el tipo de hidrocarburo y las condiciones donde se encuentre, el proceso puede ser más o menos lento, ocasionando una toxicidad mayor (Benavides López de Mesa et al., 2006). Entre las consecuencias que estas condiciones genera, se encuentra el daño que ocasiona a la flora y fauna del área donde esta contaminación está presente (Ortiz y Silva, 2019).

Existe una variedad de hidrocarburos, debido a su composición química, estos son fáciles de biodegradar, a excepción de aquellos compuestos polares pueden presentar pesos moleculares mayores a los saturados y aromáticos, agregando a esto su estructura compleja, se consideran resistentes a la biodegradación (Delgado-Estrella y et al., 2014).

2.5 Surfactantes sintéticos

Los surfactantes sintéticos (SS) son sustancias químicas que están formadas por moléculas anfifílicas. Las moléculas anfifílicas son aquellas que contienen un grupo

apolar (hidrofóbico) y uno polar (hidrofílico) unidos por enlaces covalentes (Figura 1)(Fernández et al., 2009). Estas moléculas van concentrándose entre fases inmiscibles y remplazan gradualmente el disolvente interfacial como el agua, provocando la disminución de la polaridad en la fase acuosa y por lo tanto, se ve reducida la tensión superficial y a su vez, se puede acelerar la disolución de los contaminantes (Mao et al., 2015).

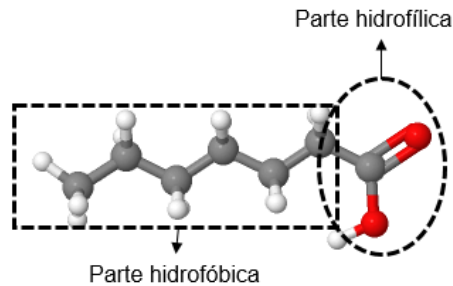
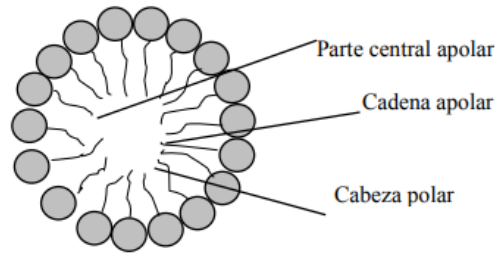


Figura 1. Representación de una molécula anfifílica.

Cuando estas moléculas se encuentran en una concentración específica, conocida como la concentración crítica micelar (CMC), la interfase de la sustancia en la cual el surfactante es agregado, se satura de estas moléculas, provocando su asociación en agregados llamados micelas (Figura 2), donde las cadenas apolares se mantienen en el centro y las cabezas polares se dirigen hacia la disolución. Debido a esta formación se logra minimizar la interacción entre las cadenas de hidrocarburo y el agua de la disolución, dispersando fácilmente los contaminantes y mejorando su solubilidad (Aranberri et al., 2006; McKee y McKee, 2009; Nagy, 2018; Vishnyakov, Lee, y Neimark, 2013). Una vez que los contaminantes están disueltos en la fase acuosa tienen mejor movilidad, lo que favorece la posterior eliminación de contaminantes a través de rutas bióticas (por ejemplo, absorción por plantas y degradación microbiana) o rutas abióticas (por ejemplo, lavado del suelo y posterior separación) (Roane et al., 2012; Sepúlveda y Velasco, 2002).



*Figura 2 Formación de una micela.
Fuente: (Aranberri et al., 2006).*

Esto le permite reducir la tensión superficial e interfacial del medio en el que se encuentran disueltos (Muthusamy et al., 2008). Los SS se pueden clasificar en aniónicos, catiónicos y no-iónicos (Riojas et al., 2011). Desde su descubrimiento, han sido utilizados en una gran variedad de industrias (cosmética, alimenticia, limpieza, ambiental, entre otras). (Alvarez, 2004; Davis y Foegeding, 2007; Gharibzahedi et al., 2012; Zhu y Aitken, 2010).

2.6 Biosurfactantes

Los microorganismos utilizan diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono para su crecimiento. Cuando estos compuestos se vuelven inaccesibles debido a algún factor, como condiciones ambientales, aquellos microorganismos con la capacidad de producir biosurfactantes (BS) los generan para disponer de la fuente de carbono (Fernandes et al., 2007; Islas et al., 2010). Los BS son biomoléculas con las características de un SS, con la diferencia de que los primeros son producidos como subproductos metabólicos de microorganismos (Cai et al., 2019). Se pueden clasificar según su estructura química o el tipo de microorganismo que los produce. En el grupo hidrofílico puede estar compuesto por: aminoácidos, péptidos catiónicos o aniónicos, monosacáridos o polisacáridos. La parte hidrofóbica está compuesta principalmente de ácidos grasos saturados o insaturados (Banat, Makkar y Cameotra, 2000; Desai y Banat, 1997). En la Tabla 1 se muestran los BS por tipo y los microorganismos que los producen.

Los BS tienen ventajas sobre los SS (Tabla 2) entre las más destacables podemos encontrar su biodegradabilidad (Banat, 1995), baja toxicidad (Batista, Mounteer, Amorim y Tótoła, 2006), el tipo de materia prima que se puede utilizar para su obtención y las características de su producción a gran escala (Kosaric, 2010; Rane et al., 2017).

Tabla 1 Principales clases de biosurfactantes y microorganismos involucrados en su producción.
Modificada de Shakeri et al., (2020).

Tipo de biosurfactante	Microorganismo que lo produce
Glicolípidos	Ramnolípidos <i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas, Chlororaphis, Serratia Rubidea</i>
	Soforolípidos <i>Torulopsis bombicola, T. antarctica, Torulopsis petrophilum, C. botistae, C. apicola, C. riodocensis, C. stellata, C. bogoriensis</i>
	Trehalolípidos <i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp. Arthrobactersp., Nocardia erythropolis, Corynebacterium sp.</i>
	Lípidos de celobiosa <i>Ustilagomaydis</i>
	Glicolípido <i>Streptococcus thermophiles</i>
	Diglicicosildiglicéridos Lípidos manosileritritol <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Candida antarctica, Kurtzmanomyces sp., Pseudozyma Siamensis</i>
Lipopeptidos y lipoproteínas	Péptido-lípido y Liquenisina <i>Bacillus licheniformis</i>
	Estreptofactina <i>Streptomyces tendae</i>
	Viscosina <i>Pseudomonas fluorescens, Leuconostoc mesenteriods</i>
	Serrawettin <i>Serratia marcescens</i>
	Surfactina, Subtilisina elturin <i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina <i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina <i>Bacillus polymyxa</i>
	Serrawettin <i>Serratia marcescens</i>
	Lípidos de poliol <i>Rhodotorula glutinis, R. graminis</i>
	Ornitinelípidos, péptidos de lisina <i>seudomonas sp., Thiobacillus, thiooxidans, Agrobacterium sp., Streptomyces sioyaensis, Gluconobactercerinus</i>
	Pumilacidina <i>Bacillus pumilus</i>
Ácidos grasos, fosfolípidos de lípidos neutros	Sulfonilípidos Artrofactina <i>T. thiooxidans, Corynebacterium alkanolyticum</i> <i>Arthrobacter sp., Corynebacterium sp</i>
	Ácido graso <i>Corynebacterium lepus, Capnoytophaga sp. Penicillium spiculisporum Arthrobacter paraffineus</i>
	Lípidos neutros Fosfolípidos <i>Talaromycestrachyspermus, Norcadia erythropolis</i> <i>Nocardia erithropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Tensioactivos poliméricos	Emulsan y Biodispersan Liposan Carbohidratos- lípidos-proteínas Manano-lípido- proteína Proteína PA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica, C. tropicalis</i> <i>Pseudomonas fluorescens, Debaryomyces, Polmorphus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>P.aeruginosa</i>
Tensioactivo particulado	Vesículas y fimbrias Células enteras Alasan Surfactante particulado (PM)	<i>Acinetobacter calcoaceticus, P.marginilis, P. Maltophila</i> <i>Various bacteria such as Cyanobacteria</i> <i>A. radioresistens</i> <i>Pseudomonas marginalis</i>

Otra característica destacable de los BS, es su estabilidad al utilizarse en condiciones extremas de pH, salinidad, temperatura; esto ha llamado la atención para su utilización en la biorremediación de suelos contaminados (De la rosa, Nuvia, Sanchez-Salinas y Ortiz-Hernández, 2015; Desai y Banat, 1997; Miller, 1995; Ron y Rosenberg, 2002).

Tabla 2 Comparación de las principales características entre surfactantes y biosurfactantes.

Característica	Surfactante	Biosurfactante
Biodegradabilidad	No biodegradables	Biodegradables
Toxicidad	Alto	Baja
Biocompatibilidad	No	Si
Materia prima	Principalmente derivados del petróleo	Residuos agroindustriales, aceites naturales, aceites reciclados, entre otros residuos reutilizables.
Costo de Producción	Económica	Elevado. (Se puede utilizar fuentes renovables para disminuir costos)
Utilización en la biorremediación de suelos	No son viables debido a su toxicidad.	Altamente utilizados
Estabilidad en condiciones extremas	No tolerantes	Altamente tolerantes

2.7 Sideróforos

El hierro (Fe), es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después del oxígeno, silicio y aluminio (Allégre, Poirier, Humler, y Hofmann, 1995; Anderson, 1983). El papel principal de los sideróforos es la solubilización extracelular de Fe a partir de minerales o sustratos orgánicos en condiciones de privación celular de este elemento y el transporte específico de Fe en células microbianas. La razón biológica para la producción de sideróforos por microorganismos es el papel insustituible del Fe en los procesos de oxidación y reducción de las células, debido a esto y a la insolubilidad extrema del hidróxido de hierro a pH fisiológico es necesaria la producción de sideróforos para aumentar su biodisponibilidad.

A pesar de la considerable variación estructural encontrada en los sideróforos, su característica común es formar complejos octaédricos de seis coordenadas. Los grupos quelantes casuales son catecolatos, fenolatos e hidroxamatos. Los catecolatos y fenolatos son típicos de las bacterias, mientras que los hidroxamatos son característicos de hongos y microorganismos actinomicetos (Welch, 1992; Winkelmann, 1991).

En la Figura 3 se observa como una célula microbiana libera sideróforos para formar complejos con el hierro y aumentar de esta manera la disponibilidad de Fe en la célula. En la Figura 3A se representa la producción de sideróforos del tipo hidroxamatos (H) y en la Figura 3B la producción de sideróforos del tipo catecol (C).

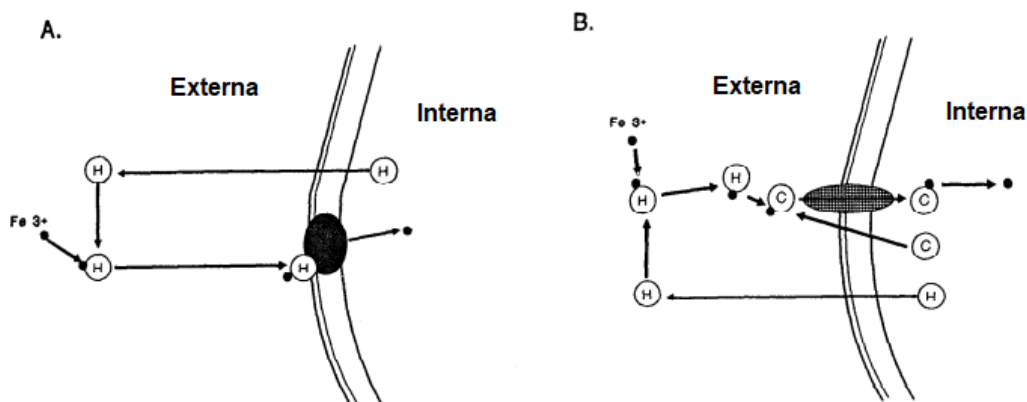


Figura 3. Formación de sideróforos tipo hidroxamatos (A) y catecol (B) para la asimilación de Fe.
Fuente: (Wilhelm y Trick, 1994)

3. ANTECEDENTES

3.1 Aplicaciones de BS en la industria

Al igual que los SS, los BS se pueden utilizar en una amplia variedad de industrias debido a sus características.

En 2016 Priyadharshini & Latha, aislaron el BS obtenido por *Bacillus sp* de suelo contaminado con petróleo, para evaluar su capacidad antimicrobiana. Utilizaron muestras de *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii* y *Staphylococcus aureus* y colocaron el BS a una concentración de 20 mg / 10 ml. Se tuvo como resultado que los aislados presentaron actividad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* y *Shigella boydii*. Esto podría ser una opción para sustituir a los SS los cuales presentan una alta toxicidad.

En 2017, Ferreira y colaboradores realizaron una investigación utilizando BS obtenidos por *Lactobacillus paracasei* comparando la capacidad de emulsificación con dodecil sulfato de sodio (SDS) un surfactante sintético. Los resultados obtenidos después de 7 días al medir el volumen y la estabilidad de la emulsión con aceite de almendra a diferentes concentraciones fueron un volumen de emulsión (VE) entre 50 y 57% similar al DSS a las mismas concentraciones. Llegando a la conclusión de que el BS producido por podía *Lactobacillus paracasei* utilizarse como ingrediente natural en emulsiones cosméticas.

Entre otras industrias se encuentra la de petróleo, donde utilizan los BS para la reducción de la viscosidad del aceite y humectación de superficies sólidas. La industria de alimentos los utiliza como agentes lubricantes, espesantes y/o emulsionantes. Entre otras grandes aplicaciones (Almeida et al., 2016; Banat et al., 2000; Brown, 1991; Cortés-Sánchez et al., 2017).

3.2 Biorremediación con Biosurfactantes.

El uso de Surfactantes Sintéticos (SS) en ocasiones es contraproducente ya que después de actuar pueden convertirse en una fuente extra de contaminación dada su naturaleza, pues que la mayoría son derivados del petróleo (Matvyeyeva, Vasylychenko y

Aliieva, 2014; Muthusamy et al., 2008). Por lo que se buscaron alternativas de sideróforos más amigables con el medio ambiente (Becerra y Horna, 2016; El-Sheshtawy y Doheim, 2014).

La contaminación de suelos por hidrocarburos, metales pesados u otros contaminantes, puede provocar daños severos en la salud y al medio ambiente, afectando tanto a la flora como a la fauna del área contaminada (Zivelyte, Valters y Vasarevicius, 2017). Es por esto que existen métodos como la remediación que se encargan de recuperar dichos suelos contaminados y evitar daños mayores.

Existen diversas tecnologías de remediación que pueden clasificarse en base a la estrategia que utilizan, el lugar en que se realiza el proceso de remediación y el tipo de tratamiento (INECC, 2007). Cuando hablamos por tipo de tratamiento, estos pueden ser biológicos, o también conocidos como biorremediación, las cuales aprovechan las actividades metabólicas de algunos microorganismos (Lászlová et al., 2018; Reis et al., 2013).

La biorremediación utiliza microorganismos o procesos microbiológicos, para degradar contaminantes ambientales, incluye la degradación enzimática que consiste en agregar enzimas al sitio contaminado con el fin de degradar sustancias nocivas, la fitorremediación, tecnología que utiliza plantas para la descontaminación, y la degradación microbiana que implica la adición de microorganismos al sitio contaminado para descomponer sustancias tóxicas (Fabelo, 2017). Adicionalmente, el uso de biosurfactantes (BS) microbianos en procesos de biorremediación es interesante debido a las ventajas que ofrecen sus características como baja toxicidad y aumento en la biodisponibilidad del contaminante, lo cual facilita el proceso de biodegradación (De la rosa, Sanchez y Ortiz, 2015; Roane et al., 2012).

Lovaglio y colaboradores en el 2011, comparan la capacidad de emulsificación de ramnolípidos de *P. aeruginosa*, cultivada en MSM a pH 3 suplementado con aceite de soya como única fuente de carbono y energía, del benceno, keroseno y aceite de soya contra un surfactante sintético (SS) comercial. Demostrando que el SS tuvo una mayor eficacia en medios ácidos con pH menores a 4, manteniéndose estable en un Índice de Emulsificación a las 24 horas (IE₂₄) de 70%, sin embargo, al aumentar el pH el valor de

IE₂₄ bajo a 60 y 50 %, mientras que el BS produjo emulsificaciones mayores y estables con un IE₂₄ en los rangos de pH de 4 a 9.

A pesar de que el BS en este caso no emulsionó en pH por debajo de 4, se puede comprobar que, encontrando las condiciones adecuadas, un BS puede ser igual o más eficiente que un SS.

3.3 Residuos agroindustriales en la producción de BS

Los BS se han utilizado en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Almeida et al., 2016; Martínez, 2015) y metales pesados (Giraldo y Gutiérrez, 2014; Mosa et al., 2016). Sin embargo, a pesar de las grandes ventajas que aporta su utilización, el proceso de producción de BS a gran escala resulta costoso, debido al alto costo de los componentes del medio y por el bajo rendimiento que este genera (Almeida et al., 2016).

Existen diversas investigaciones enfocadas al uso de residuos agroindustriales en la producción de BS, dada su facilidad de acceso y bajo costo, esto con la finalidad de disminuir los costos en la producción de BS y eliminar la barrera que hay del uso de éstos en vez de los SS.

En el 2006 se realizaron estudios en México donde se estimó que 60.13 millones de toneladas de residuos agroindustriales correspondían a tallos de maíz, tallos de sorgo, copas y hojas de caña (Valdez-Vázquez, Acevedo-Benítez y Hernández-Santiago, 2010). Este análisis permite ver la oportunidad que hay en nuestro país para utilizar residuos agroindustriales como fuente alternativa de carbono en la producción de BS.

Gudiñay colaboradores, en 2015 utilizaron licor de maíz fermentado donado por Companhia Portuguesa de Amidos, S. A. como medio de cultivo para evaluar la producción de BS por *Bacillus subtilis* #573, aislado que en estudios anteriores se demostró que era productor de BS. El medio fue preparado con el licor de maíz fermentado y agua destilada en diferentes concentraciones 5, 10 y 15% (v/v).

Para evaluar la producción de BS se midió la tensión superficial y el índice de emulsificación. El medio con una concentración del 5% a las 24 h presento la mayor

disminución de la tensión superficial, de 51.4 dinas/cm a 32.8 y un índice de emulsificación de 28%. Mientras que el medio de 10 y 15% presentaron una mayor disminución e índice de emulsificación a las 48 h. El medio al 10% disminuyó la tensión superficial de 52.8 a 30.7 dinas/cm y un índice de emulsificación de 55%. Por otro lado, el medio al 15% disminuyó la tensión superficial de 50.5 a 31.8 dinas/cm y obtuvo un índice de emulsificación de 40.3%.

En base a los resultados obtenidos, donde el licor de maíz fermentado presentó buenos resultados como medio de cultivo, se evaluó el costo del medio estándar a este medio modificado, dando una diferencia de 39.996 €.

De esta forma podemos confirmar que el uso de residuos agroindustriales puede beneficiar a sustituir los SS por BS.

Yañez-Ocampo y colaboradores, en 2017, en Chiapas, evaluaron la producción de BS utilizando residuos de café (líquido) de una cafetería como fuente de carbono. La concentración utilizada fue de 2, 6, 10, 14 y 18% (v/v) en un medio MSM. Se evaluaron 3 aislados nativos de Chiapas proporcionado por la universidad local (A, B y 83).

Para evaluar su efectividad, se midió la tensión superficial, así como el índice de emulsificación. Después de 24 h, los 3 aislados presentaron una disminución de la tensión superficial de 50 dinas/cm a 30-29 dinas/cm. Los aislados A y 83 presentaron un índice de emulsificación de 58%.

En base a este estudio se demostró el potencial de estos aislados nativos de Chiapas para la producción de BS y también el potencial de los residuos de café de cafeterías locales como fuente de carbono.

En el 2017, Rane y colaboradores en India, utilizaron melaza, suero de leche y extractos de cáscaras de papa, cáscaras de naranja, cáscaras de plátano y bagazo de caña de azúcar como sustrato para evaluar la producción de BS de *Bacillus subtilis* cepa ANR 88. En la tabla 3 se puede observar el rendimiento para producción de BS utilizando las distintas fuentes de carbono, en este trabajo se utilizó como control positivo de producción de BS utilizando glucosa como fuente de carbono.

Comparando la producción BS utilizando glucosa como fuente de carbono, que es el sustrato que se usa a nivel laboratorio para este tipo de cultivos, el rendimiento en producción de BS con respecto a la melaza fue de 0.241 g/l, un rendimiento similar al rendimiento en producción de BS con respecto a la glucosa 0.207 g/l, el bagazo de caña de azúcar genero un rendimiento de BS de 0.127 g/l, la cáscara de naranja 0.089 g/l, la cáscara de plátano 0.049 g/l, cáscara de papa 0.022 g/l, mientras que con el suero de leche no se obtuvo producción de BS. La cascara de papa contenía una concentración mínima de azúcar, por lo tanto, la producción de biosurfactantes fue mínima. El suero de leche está compuesto por un 75% de lactosa este ha sido efectivo como fuente de carbono para BS glicolípidos (Joshi et al., 2008), sin embargo, el BS producido en este estudio fue un lipopéptido.

Tabla 3 Comparación del rendimiento de los diferentes sustratos. Modificada de Rane et al., (2017).

Sustrato	Producción de biosurfactantes (g/l)
Glucosa	0.207
Melaza	0.241
Suero de leche	0.000
Cáscara de naranja	0.089
Cáscara de papa	0.022
Cáscara de plátano	0.049
Bagazo de caña de azúcar	0.127

En 2020, Ribeiro y colaboradores utilizaron aceite de oliva, aceite de soya como fuentes de carbono, comparándolo con glucosa (fuente de carbono en el medio estándar) y NH_4NO_3 o licor de maíz fermentado como fuentes de nitrógeno. El mejor resultado obtenido en base a la disminución de la tensión superficial fue utilizando aceite de soya al 1% como única fuente de carbono y licor de maíz fermentado al 1% como única fuente de nitrógeno. Demostrando que la mejor opción fue el uso de aceite de oliva y soya como fuente de carbono y licor de maíz fermentado como fuente de nitrógeno.

Estos estudios son evidencia de que, al utilizar residuos agroindustriales como fuentes alternas de carbono, bajo las condiciones adecuadas, se pueden obtener

rendimientos favorables en la producción de BS disminuyendo significativamente el costo de producción de estas biomoléculas.

3.4 Variación de la fuente de nitrógeno y sus efectos en la producción de biosurfactantes.

La fuente de nitrógeno es un factor importante en la producción de BS ya que las proteínas dependen de ésta para su síntesis. Encontrar una fuente de nitrógeno adecuada, que permita un alto rendimiento en la producción de BS combinado con la fuente de carbono alterna (a base de residuos agroindustriales) permitiría disminuir aún más el costo de producción.

Fonseca y colaboradores en 2007, evaluaron la producción de BS con *B. subtilis* YRE207 el cual fue aislado de unas muestras de suelo contaminado con petróleo en Brasil. Fue incubado en medio MSM con 5 diferentes fuentes de nitrógeno, 3.0 g/l de urea, 10.0 ml/l de residuos de levadura de cerveza, 8.5 g/l de NaNO_3 , 6.6 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 4.0 g/l de NH_4NO_3 . La fuente de carbono se mantuvo estable, utilizando sacarosa a 10 g/l.

Para evaluar la influencia de estas variaciones en la producción de BS, se realizó la medición de la tensión superficial. Obteniendo como resultados que el medio con NH_4NO_3 disminuyó un 52.8 % la tensión superficial, siendo este el que mayor disminución seguido por Urea que disminuyó un 40.1% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ un 37%. Mientras que los residuos de levadura de cerveza solamente disminuyó un 12.9% y el NaNO_3 un 11.2%.

En base a los resultados obtenidos, Fonseca y colaboradores concluyeron que las fuentes de nitrógeno cuya tensión superficial fue disminuida en mayor porcentaje supera el promedio de otras investigaciones donde se registra que el rango de porcentaje de tensión superficial que *B. subtilis* disminuye en medio convencional esta entre 30 y 40%. También el equipo observó que las células cultivadas en el medio adicionado con NH_4NO_3 tienen una morfología diferente a las cultivadas en otro medio.

Pereira y colaboradores en 2013 realizaron una investigación acerca de la capacidad productora del BS surfactina en tres aislados de *Bacillus subtilis* con diferentes fuentes de nitrógeno: citrato de amonio (AC), nitrato de amonio (AN), sulfato de amonio

(AS), extracto de carne (ME), nitrato de sodio (SN), triptona (TRY), urea (U) y extracto de levadura (YE), manteniendo como fuente de carbono la sacarosa. Este estudio demostró que YE tuvo un alto rendimiento de producción del BS en los tres aislados microbianos, el AC genero un rendimiento similar en los tres aislados. Por otra parte, con TRY se obtuvo un bajo rendimiento en la producción de BS para los tres aislados.

Ishaq y colaboradores en 2015 utilizaron como fuente de nitrógeno: NH_4NO_3 , NH_4Cl , KCl y KNO_3 a diferentes concentraciones. Obteniendo una mayor producción de biomasa en aquellos tratamientos en los que se utilizó 1.0 g/l NH_4NO_3 y 0.5 g/l KNO_3 . Mientras que la mayor producción de BS se dio en los tratamientos con 0.5 g/l de NH_4NO_3 y 0.5 g/l de KNO_3 . Logrando una producción de BS estable después de 196 h de incubación. Este estudio enfatiza la importancia de la fuente de nitrógeno en la biosíntesis de BS.

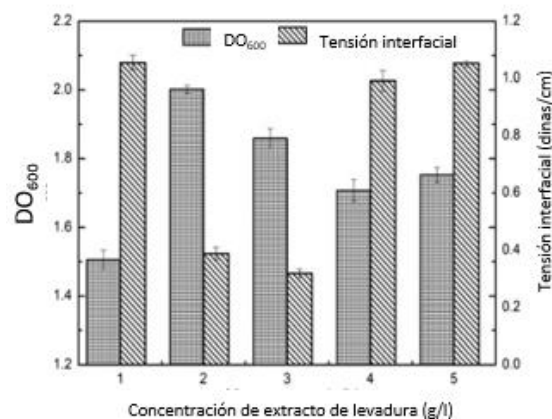


Figura 4. DO_{600} y tensión superficial a diferentes concentraciones de extracto de levadura. Modificada de (Chen et al., 2018)

Chen y colaboradores en 2018, utilizaron extracto de levadura como fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 g/l) para evaluar la producción de BS. Los resultados se pueden observar en la Figura 4 donde se graficaron la DO_{600} y la tensión interfacial a diferentes concentraciones de extracto de levadura. A una concentración de 2.0 y 3.0 g/l la fermentación del BS es mejor, ya que la DO_{600} es mayor y la tensión interfacial es menor. Por cuestiones de economía, se determinó que la concentración optima fue de 2.0 g/l

3.5 Aislados microbianos utilizados en el presente trabajo de investigación.

En trabajos de tesis anteriores, dirigidas por el grupo de trabajo del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental, se aislaron microorganismos de la Laguna Salada y se realizaron diferentes pruebas para evaluar la producción de BS. El suelo de la Laguna Salada presenta un alto contenido de sales y se encuentra expuesto a altas temperaturas (CONAGUA, 2018), por lo que los microorganismos aislados de esta área son considerados extremófilos.

López Arreguín en 2015, evaluó la capacidad emulsificadora de diecinueve aislados bacterianos provenientes de la Laguna Salada, diez de ellos presentaron capacidad emulsificante. Parte de estos aislados fueron estudiados también por Valenzuela Avilés en 2017, quien evaluó la actividad tensoactiva de los sobrenadantes celulares obtenidos, encontrando que cinco de éstos presentaban dicha actividad.

Saldaña Robles en el 2016, evaluó la capacidad emulsificante de 24 aislados bacterianos, de los cuales tres mostraron un índice de emulsificación a las 24 horas (IE_{24}) mayor a 8 y 10 aislados un IE mayor a 22.91, demostrando que los microorganismos aislados podrían tener la capacidad de producir BS.

Un estudio posterior de Campos Grajeda en el 2017 encontró que 100 g de harina de mezquite contiene 12.27 g de proteína total, 24.74g de azúcares totales, 2.51 g de lípidos y 6.4 g de fibra. En general la harina de mezquite presenta un alto contenido de proteína, hidratos de carbono totales y fibra por lo que podría emplearse como fuente alterna de carbohidratos en la producción microbiana de BS.

Con base en estas investigaciones previas, en el presente estudio se evaluaron la producción de BS de aislados microbianos modificando la fuente de carbono y nitrógeno. Para esto, se utilizó harina de mezquite por su alta cantidad de azúcares, y aceite de oliva como fuentes alternas de carbono, ambos producidos en la región lo que los hace disponibles.

4. JUSTIFICACIÓN

Los biosurfactantes (BS), moléculas tensoactivas, emulsificantes y dispersantes producidas por el metabolismo microbiano, a diferencia de los surfactantes sintéticos (SS) poseen ventajas importantes (baja toxicidad, biodegradabilidad y aumentan la biodisponibilidad de ciertas sustancias). Éstos pueden ser producidos a partir de fuentes renovables como residuos agroindustriales, lo cual contribuye a disminuir su costo de producción a gran escala y da un valor agregado a los desechos derivados de la industria agrícola. Pese a que se han realizado diversos estudios referentes a la utilización de residuos agroindustriales como fuente de carbono alterna en la producción de BS, es importante evaluar el uso de estos residuos en la producción de BS en el municipio de Mexicali B.C., ya que en la región se generan grandes cantidades de estos residuos y existen microclimas extremos donde se encuentran microorganismos productores de las biomoléculas de interés; con lo que se ofrecen alternativas que reducirían la huella ecológica que genera la quema de residuos pues estos podrían ser utilizados como fuentes alternas de carbono en futuros procesos de producción de BS.

La presente investigación busca establecer las condiciones adecuadas de cultivo para obtener un alto rendimiento en la producción de BS, proveniente de microorganismos pertenecientes al banco de microorganismos del grupo de investigación de biotecnología y cuidado ambiental de la FIM, mediante la sustitución de la fuente de carbono (glucosa) por fuentes alternas de carbono como aceite de oliva y harina de mezquite, además de modificar la fuente de nitrógeno, volumen y la velocidad de agitación de los cultivos. Con dichas modificaciones se pretende sentar las bases experimentales que permitan en un futuro escalar la producción de estas sustancias y utilizarlas biotecnológicamente (procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados, evaluación del efecto de estas sustancias en líneas celulares, entre otros).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Optimizar las condiciones de cultivo, llegando a establecer las adecuadas para producir de manera eficiente una mayor cantidad de biosurfactantes.

5.2 Objetivos específicos

Identificar la fuente de nitrógeno que permita una mayor producción de biosurfactantes en los diferentes aislados microbianos.

Identificar la fuente de carbono que permita una mayor producción de biosurfactantes en los diferentes aislados microbianos.

Identificar aquellos microorganismos productores de sideróforos.

6. HIPÓTESIS

Modificar las condiciones de cultivo como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el volumen del medio de cultivo permitirá establecer las condiciones de cultivo ideales que permitirán aumentar el rendimiento en la producción de biosurfactantes.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivación de aislados microbianos

Los 45 aislados microbianos a los que se le evaluó la capacidad productora de biosurfactantes (BS) pertenecen al banco de microorganismos del Laboratorio de Investigación de Bioingeniería. Éstos fueron aislados (en trabajos previos del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental), conservados por liofilización o en glicerol al 15%, y almacenados en refrigeración y congelación respectivamente.

Para la reactivación de las muestras microbianas liofilizadas, entre 4 y 8 perlas de alginato conteniendo los aislados microbianos fueron depositadas en microtubos de 2 ml conteniendo 1 ml de solución de bicarbonato de sodio al 4%. Se dejó reposar 30 minutos, agitando ocasionalmente hasta disolver las perlas de alginato. Para la reactivación de las muestras microbianas liofilizadas en leche descremada, se agregaron 2 µg de éstas en viales de 2 ml conteniendo 1 ml de agua destilada estéril y se agitaron hasta disolver. En ambos casos, una vez disueltos los aislados microbianos, se tomaron 100µl de cada una de las suspensiones microbianas, se sembraron por separado y por duplicado por extensión con varilla sobre agar Reasoner's 2A (R2A) contenido en placas de Petri. Las palcas de R2A inoculadas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas o hasta observar crecimiento celular.

7.2 Identificación de aislados microbianos productores de biosurfactantes y cinética de crecimiento bacteriano

En matraces Erlenmeyer de 125 ml estériles, se colocaron 50 ml de medio mínimo de sales (MSM, por sus siglas en inglés) que contiene por litro: NaNO₃ 2.5 g; NaCl 1 g; KCl 1g; CaCl₂·2H₂O 0.05g; MgSO₄·7H₂O 0.4g; H₃PO₄ (85%) 10 ml, pH final de 7.2. 1ml de la solución B que contiene por cada 100 ml: FeSO₄·7H₂O 50 mg; ZnSO₄·7H₂O 150mg; MnSO₄·H₂O 150 mg, H₃BO₃ 30 mg, CoCl₂·6H₂O 15 mg, CuSO₄·5H₂O 15 mg y NaMo₂O₄·2H₂O 10 mg; y como fuente única de carbono y energía glucosa al 2 % v/v. (Bodour et al., 2004). Las soluciones se esterilizaron por separado a 121 °C y 15 lb de presión por 15 min y luego se mezclaron en un matraz estéril bajo condiciones de esterilidad.

El medio se inoculó en condiciones de esterilidad tomando con un palillo de madera estéril una pequeña cantidad de una sola colonia microbiana de no más de 24 horas de vida desarrollada sobre R2A. El MSM glucosa 2 % contenido en los matraces fue inoculado con los distintos aislados microbianos, se incubó a 35 °C con agitación oscilatoria de 100 rpm hasta que los cultivos presentaran una densidad óptica (DO) de 1 a una longitud de onda de 600 nm, (Martínez et al., 2000) el medio MSM se utilizó como blanco y con él se ajustó la DO_{600} a 0 para obtener preinóculos de cada uno de los aislados microbianos de interés. Se registró su tiempo de crecimiento en horas. Aquellos cultivos microbianos que formaron pellets y/o no presentaron crecimiento fueron descartados.

Se tomaron 200 µl de aquellos cultivos que presentaron crecimiento y no presentaron pellets. 50 ml MSM 2 % de glucosa, contenidos en matraces Erlenmeyer de 125 ml estériles fueron inoculados por triplicado. Se tomaron 2 ml de muestra durante 5 intervalos de tiempo para aquellos cultivos microbianos cuyo crecimiento fue de 24 horas (2, 4, 6, 12 y 24 h) y 10 intervalos de tiempo para aquellas que su tiempo de crecimiento registrado fue mayor a 24 h: para aquellos cultivos identificados con crecimiento hasta las 48 h se tomaron a las 2, 4, 8, 12, 24, 26, 28, 32, 38 y 48 h; aquellos cultivos con crecimiento de 96 horas se tomaron a las 12, 24, 36, 48, 60, 72, 76, 80, 84 y 96 h; los cultivos celulares con crecimiento hasta las 168 horas se tomaron muestras a las 24, 47, 72, 96, 120, 132, 144, 168, 180 y 192 h esto con la finalidad de obtener una curva de crecimiento y definir el tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria para cada cultivo microbiano.

Posteriormente, se obtuvo el caldo libre de células (sobrenadante celular), centrifugando el contenido de cada matraz a una velocidad de 2 750 rpm por 30 minutos, los sobrenadantes celulares se almacenaron a 4 °C para ser utilizados en pruebas posteriores (Becerra y Horna, 2016; Lara-Severino et al., 2017; Tahseen, 2017).

7.3 Descripción morfológica y tinción de Gram

Para cada aislado microbiano productor de BS en medio MSM glucosa 2 %, se realizó la descripción de morfología colonial (forma, elevación, color, margen y textura), y se determinó su morfología celular y tinción de Gram. Estos datos se registraron

mediante toma de fotografías a las colonias celulares y microfotografías de observaciones al microscopio para el caso de morfología celular y tinción Gram.

7.4 Tensión superficial de los sobrenadantes celulares

Para cuantificar la actividad tensoactiva de los sobrenadantes celulares de los distintos aislados se utilizó un tensiómetro CSC-Du Nouy 70535. Se tomaron 15 ml de la muestra del caldo libre de células a temperatura ambiente y se depositaron en cajas Petri limpias para posteriormente determinar su tensión superficial (TS) en el tensiómetro. Las mediciones de TS se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante del tensiómetro Du Nouy y se hicieron por triplicado para cada uno de los sobrenadantes celulares obtenidos para su posterior registro. Previo a las mediciones de TS de las muestras, el tensiómetro se calibró con agua desionizada (TS= 71.5 ± 0.5 N/cm).

7.5 Determinación del índice de emulsificación a las 24 horas

Para evaluar la capacidad de formar emulsiones de cada sobrenadante de los cultivos, se llevó a cabo el análisis IE₂₄ basado en el método de Cooper y Goldenberg (1987). Se agregaron 3 ml de diésel y 2 ml de caldo libre de células en un tubo de ensaye de vidrio de 15 ml. Estas mezclas se agitaron en el vortex durante 2 minutos y se dejaron reposar verticalmente a temperatura ambiente por 24 horas. Esto se realizó por duplicado para cada muestra. El IE₂₄ se determinó con la Fórmula 1, en la cual el IE₂₄ es calculada dividiendo la altura de la capa emulsificada entre altura total de la emulsión por 100. Se registraron los datos obtenidos para su posterior análisis.

$$IE_{24} = \frac{\text{altura de la capa emulsificada}}{\text{altura total}} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo del índice de emulsificación.

7.6 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de carbono

Se preparó medio MSM líquido modificando la fuente de carbono, harina de mezquite o aceite de oliva en vez de glucosa. Se varió la concentración de estas dos fuentes alternas de carbono a un nivel más bajo, igual y más alto tomando como base la cantidad de glucosa utilizada, es decir 1, 2 y 3 % v/v. Evaluando de esta manera, que concentración presenta una mayor producción de BS.

Se inocularon por separado, 200 µl de preinóculos de aquellos sobrenadantes celulares que presentaron mayor disminución de la TS y se incubaron bajo las condiciones experimentales mencionadas en el apartado 7.2. Se tomaron muestras a 4 intervalos de tiempo según el tiempo de crecimiento (para aquellos de 24 h, intervalos de 6 h; para aquellos de 48 h, intervalos de 12 h; para aquellos de 96 h, intervalos de 24 h) y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Se registró el tiempo en que cada una de las muestras microbianas llegó a una DO=1 y se comparó con la curva de crecimiento con el tratamiento estándar o control (MSM 2% glucosa). Se obtuvo el sobrenadante celular por centrifugación y se determinó el IE₂₄ en base a la metodología descrita en el apartado 7.5 y la TS para comparar los resultados obtenidos.

7.7 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de nitrógeno

Se modificó la fuente de nitrógeno del medio MSM, por litro como se indica: NaNO₃ 2.5g, NaNO₃ 2g, NaNO₃ 1.5g, KNO₃ 2g, KNO₃ 1.5g, Ca(NO₃)₂ 2g y Ca(NO₃)₂ 1.5g. La fuente de carbono fue seleccionada con base a la prueba de Tukey en Minitab17 (aceite de oliva al 1% para Q2 y III, aceite de oliva al 2% para R4 y VI, aceite de oliva al 3% para R3, dextrosa al 1% para Q1, Q5, U1 y VII y harina de mezquite al 1% para A, H, Q4, S1, S2, II, IX, X, XV, XVIII, XXII, XXV, XXVI, XXVIII Y XXX). 200 µl de cada preinóculo, de los aislados microbianos, se colocaron por separado en medio de soya tripticaseina contenido en tubos falcón de 15 ml estériles y se cultivaron a 35 °C durante 24 horas a 100 rpm. este fue llevado a DO=1 a una longitud de onda de 600 nm, se incubó bajo las mismas condiciones mencionadas en el apartado 7.2. Se obtuvo el sobrenadante celular por centrifugación a 2 500 rpm, se midió y registró la TS en dinas/cm, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

7.8 Aislamiento de biosurfactantes

Se incubaron 8.3 ml del preinoculo microbiano en 1L de medio MSM con la fuente de carbono y nitrógeno en la que se produjo el BS que presento mayor disminución de TS a 35 °C a 100 rpm, durante 72 h. Esto se llevó a cabo por triplicado.

Posteriormente, se obtuvo el caldo libre de células siguiendo la metodología descrita anteriormente y se realizó una extracción líquido-líquido con acetona en relación

1:1 (v/v). El precipitado se dejó reposar 4 °C durante 24 horas y se centrifugó a 13500 rpm a 4 °C por 10 min descartando el sobrenadante (Pereira et al., 2013).

En un crisol llevado a peso constante, se colocó el precipitado obtenido. Se mantuvo en el horno para su secado a 37 °C por no más de 6 h y vigilando constantemente. Se registró su peso.

7.9 Pruebas de solubilidad del biosurfactante aislado en diferentes solventes

En tubos de ensaye se colocaron 10 ml de agua, 10 ml de etanol al 70 % y 10 ml de acetona grado HPLC. Se sumergieron 3 mg del BS crudo y se dejó reposar por 24 h (Elkhawaga, 2017; Goswami y Deka, 2019).

7.10 Pruebas de termoestabilidad, halotolerancia y resistencia a niveles altos de pH del biosurfactante

Para evaluar la termoestabilidad, se colocaron 6 mg de BS crudo y se mantuvo en rangos de temperaturas entre 40 y 120 °C por 30 minutos. Posteriormente, se disolvió en 10 ml de agua destilada. Para la prueba de halotolerancia, se utilizó NaCl a diferentes concentraciones (2-12% p/v), este fue agregado en tubos de ensaye con la concentración de solvente y BS. Por último, se varió el pH, utilizando HCl 6N y NaOH para variar el pH de la solución (2,5,7,9 y 12). Para estas pruebas se midió la TS por triplicado (Datta, Tiwari y Pandey, 2018; Goswami y Deka, 2019; Santos et al., 2018).

7.11 Producción de Sideroforos

Se preparó medio O-CAS por sus siglas en inglés (Overlay-Chromo Azurol S). El medio consta de una solución A: en 40 ml de agua destilada se disolvieron 9.7 mg de CAS, se agregó 1.6 ml de solución de hierro (1 mM FeCl₃·6H₂O en 10 mM HCl) y 11.7 mg de HDTMA (tornándose en un azul brillante), manteniendo la agitación y aforando a 80 ml; y una solución B: en 40 ml de agua destilada se agregaron 4.86 g de PIPES (Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico)) hasta disolver, enseguida se adiciono a gotas solución de NaOH al 50% (p/v) hasta que la solución se tornara transparente, se agregó agarosa al 0.9% p/v y se aforo a 80 ml (Pérez-Miranda et al., 2007).

Por separado se prepararon 40 ml de caldo de soya tripticaseínaona (CST), disolviendo 1.6 g de ésta en 40 ml de agua destilada. Las tres soluciones (A, B y CST)

fueron esterilizadas por separado. Cuando alcanzaron temperatura ambiente, se agregó la solución A, a la solución B y por último el CST y se homogenizó por agitación magnética. La solución final se vació en cajas Petri de 60 mm x 20 mm estériles. Una vez solidificado el medio CAS-CST. Se sembraron por duplicado sobre su superficie aislados bacterianos de interés con no más de 24 h de vida y se incubaron a 35 °C por un máximo de 72 h para posteriormente registrar si hubo o no producción (por cambio en la coloración del medio CAS-CST) de sideróforos.

7.12 Análisis estadísticos

Para todas las pruebas, se utilizó el promedio de tres pruebas. Para el análisis de estos experimentos, se utilizó la prueba de Tukey para evaluar qué tratamiento fue el que obtuvo mejores resultados de manera individual y se realizó un diseño factorial completamente al azar para evaluar la interacción entre los diferentes tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Reactivación de aislados microbianos

Los 45 aislados microbianos utilizados se propagaron y cultivaron sobre medio R2A. 25 de éstos requirieron de la adición de NaCl 12 % (p/p) en el medio pues de lo contrario no se observaba crecimiento sobre las placas de R2A. En la tabla 4 se indica con un signo (+) los cultivos microbianos que fueron suplementados con NaCl 12 % y favorecer su crecimiento. Los aislados A, B, E, F, H,L, M, N, Q1, Q2, Q4, Q5, R3, R4, S1,S2, S3 Y U1, fueron obtenidos de muestras tomadas de suelo de la Laguna Salada correspondientes a doce puntos de muestreo donde no existe la presencia de plantas (Lopez, 2015). Los aislados I, II, III, IV, V, VI, VIII, IX, X, XI, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XX, XXI, XXII, XXIII, XXV, XXVI, XXVIII, XXX, XXXI y XXXIV la fueron obtenidos de muestras tomadas de la rizósfera de varias plantas representativas de la periferia de la Laguna Salada (Saldaña, 2016).

Tabla 4. Aislados microbianos reactivados sobre agar R2A con y sin suplementación de NaCl 12 %.

Clave del aislado	Suplementación del medio R2A con NaCl 12%	Clave del aislado	Suplementación del medio R2A con NaCl 12%	Clave del aislado	Suplementación del medio R2A con NaCl 12%
A	-	S1	-	XIV	-
B	-	S2	-	XV	+
E	+	S3	+	XVI	+
G	+	U1	-	XVII	+
F	-	I	+	XVIII	-
H	+	II	+	XX	+
L	-	III	+	XXI	+
M	-	IV	+	XXII	+
N	-	V	-	XXIII	-
Q1	-	VI	-	XXV	+
Q2	+	VII	+	XXVI	+
Q4	+	IX	+	XXVIII	-
Q5	+	X	+	XXX	-
R3	-	XI	-	XXXI	+
R4	-	XIII	+	XXXIV	+

8.2 Identificación de aislados microbianos productores de biosurfactantes y cinética de crecimiento bacteriano

Se midió la absorbancia de cada cultivo microbiano de los distintos aislados en un espectrofotómetro por intervalos de 2 h a una longitud de onda de 600 nm, hasta que ésta llegara a una DO₆₀₀ igual a 1. Con estos resultados, se realizó una curva de crecimiento con la que se determinó el tiempo que cada aislado llegó a su fase estacionaria. Una vez establecidas las cinéticas de crecimiento microbiano, se determinó el tiempo al cual se producen BS a una temperatura de 35 °C, 100 rpm y el tiempo fue diferente para cada aislado, en la tabla 5 se encuentran registrados el tiempo total que tarda cada aislado microbiano en producir BS. Como se observa, 16 tardaron 24 h, 11 aislados bacterianos más 48 h, mientras que los aislados H y XV tardaron 96 h y G, XIV y XVI tardaron más de 150 h.


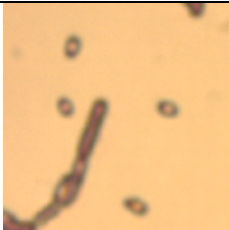
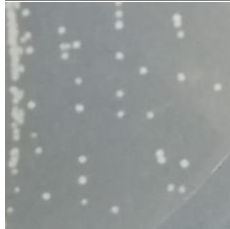


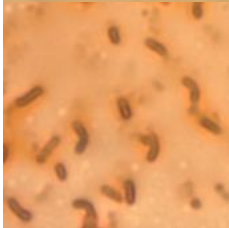

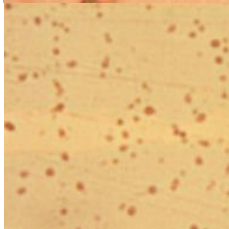
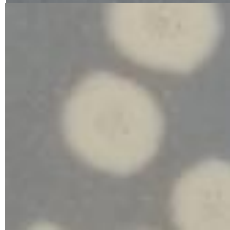
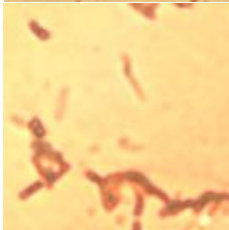
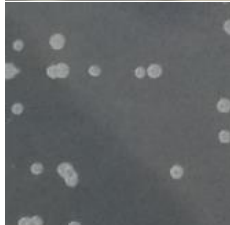
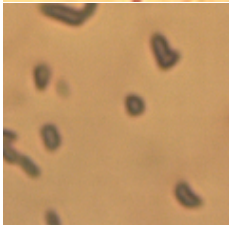
Tabla 5 Tiempo de crecimiento en MSM de cada aislado microbiano

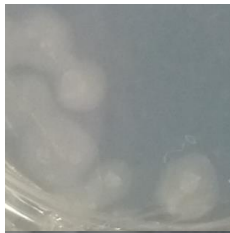
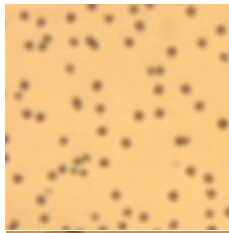
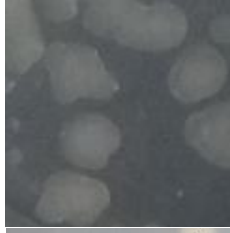

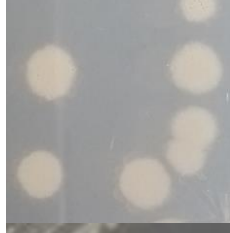
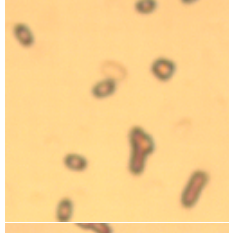
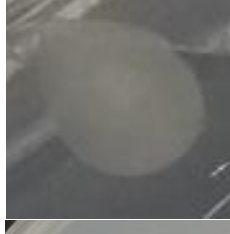
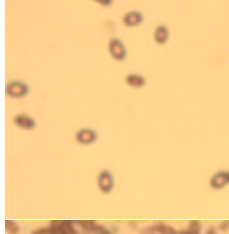
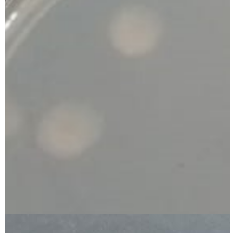


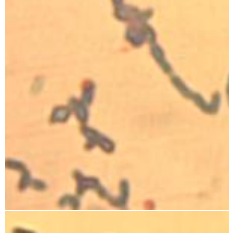


Clave del aislado	Horas necesarias para producción de biosurfactante	Clave del aislado	Horas necesarias para producción de biosurfactante	Clave del aislado	Horas necesarias para producción de biosurfactante
A	24	S2	24	XIV	168
G	192	U1	24	XV	96
H	96	I	48	XVI	168
L	24	II	48	XVIII	48
Q1	24	III	24	XXI	24
Q2	48	IV	24	XXII	48
Q4	48	VI	24	XXV	24
Q5	24	VII	24	XXVI	48
R3	48	IX	48	XXVIII	48
R4	24	X	24	XXX	48
S1	24	XIII	24		


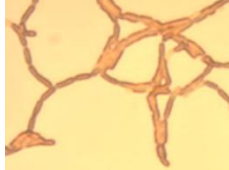

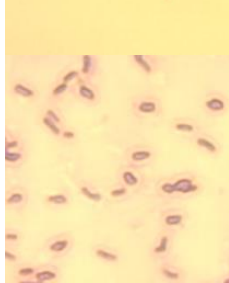







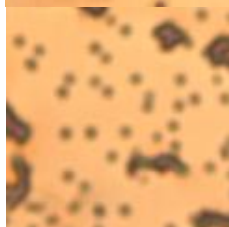

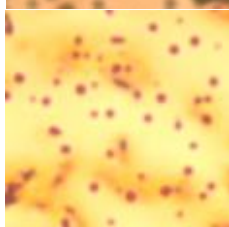
8.3 Descripción morfológica y tinción de Gram


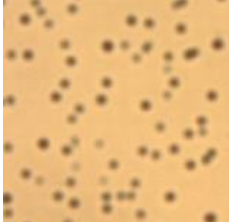


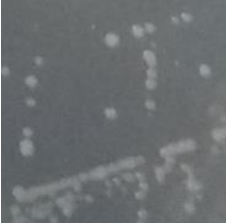
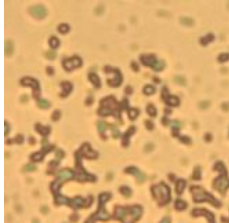





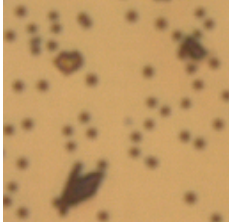

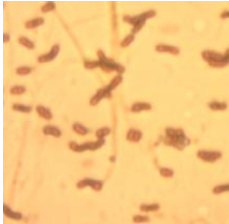
En la tabla 6 se muestran los resultados de la caracterización colonial y tinción de Gram para cada aislado microbiano. Del total de los aislados, 11 de ellos son cocos Gram +, 10 cocos Gram -, 5 bacilos Gram +, 4 bacilos Gram - y 1 actinomiceto Gram +.

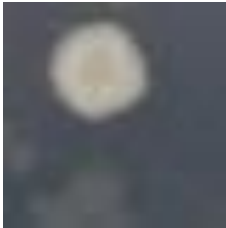
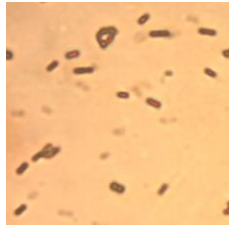

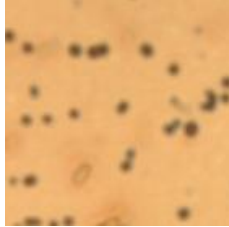

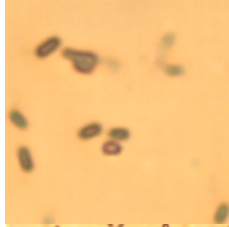

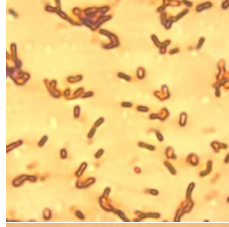
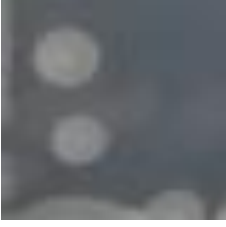
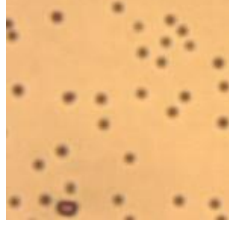
Tabla 6 Morfología colonial y tinción de Gram de los aislados microbianos

Clave del aislado	Morfología colonial	Morfología microscópica y tinción de Gram
A	 <p>Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca</p>	 <p>Cocos Gram (+)</p>
G	 <p>Forma: Puntiforme Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Dura Coloración: Amarilla</p>	 <p>Actinomicetos Gram (+)</p>
H	 <p>Forma: Irregular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Amarilla</p>	 <p>Bacilos Gram (-)</p>
L	 <p>Forma: Irregular Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Amarilla</p>	 <p>Cocos Gram (-)</p>
Q1	 <p>Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Dura Coloración: Amarilla</p>	 <p>Cocos Gram (-)</p>
Q2	 <p>Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Dura Coloración: Blanca</p>	 <p>Cocos Gram (-)</p>

Q4		Forma: Irregular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
Q5		Forma: Irregular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Diplococo Gram (-)
R3		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Amarilla		Cocos Gram (-)
R4		Forma: Irregular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (-)
S1		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entera Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Bacilos Gram (-)
S2		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Semi amarillo		Bacilos Gram (+)
U1		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)

I		Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Bacilos Gram (-)
II		Forma: Irregular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
III		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Bacilos Gram (+)
IV		Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Amarilla		Bacilos Gram (+)
VI		Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado Textura: Semidura Coloración: Beige		Diplococos Gram (+)
VII		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
IX		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (-)

X		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Transparente		Cocos Gram (+)
XIII		Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Filamentoso Textura: Semi dura Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
XIV		Forma: Puntiforme Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Beige		Cocos Gram (-)
XV		Forma: Circular Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Dura Coloración: Blanca		Bacilos Gram (+)
XVI		Forma: Irregular Elevación: Plana Margen: Ondulado Textura: Pastosa Coloración: Beige		Cocos Gram (+)
XVIII		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Beige		Cocos Gram (+)
XXI		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Dura Coloración: Blanca		Cocos Gram (-)

XXII		Forma: Irregular Elevación: Convexa Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Beige		Bacilos Gram (+)
XXV		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
XXVI		Forma: Fusiforme Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Viscosa Coloración: Blanca		Cocos Gram (+)
XXVIII		Forma: Circular Elevación: Elevada Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Beige		Bacilos Gram (-)
XXX		Forma: Circular Elevación: Plana Margen: Entero Textura: Pastosa Coloración: Beige		Cocos Gram (-)

8.4 Tensión superficial

Los datos obtenidos de tensión superficial (TS) fueron registrados en dinas/cm. En la tabla 7 se puede observar la comparación de los 31 aislados microbianos que dieron positivo a la producción de BS. La TS del medio sin inocular se utilizó como referencia. 24 de los 31 aislados disminuyeron la tensión superficial por debajo de 35 dinas/cm, este rango fue seleccionado debido a que se considera que un BS efectivo es aquel que logra disminuir la TS de 72 a 35 dinas/cm o menos (Mulligan, 2005), por lo que se seleccionaron para futuros análisis, los 7 restantes se descartaron.

Tabla 7. Tensión superficial de los distintos sobrenadantes celulares

Clave del aislado	TS dinas/cm	Clave del aislado	TS dinas/cm	Clave del aislado	TS dinas/cm	Clave del aislado	TS dinas/cm
Control	71.50	Q5	27.83	III	29.00	XV	30.00
A	26.50	R3	31.00	IV	60.50	XVIII	28.67
G	54.00	R4	32.67	VI	34.97	XXI	36.00
H	28.83	S1	27.83	VII	29.00	XXII	33.17
L	55.67	S2	27.67	IX	29.67	XXV	27.33
Q1	28.83	U1	28.33	X	27.33	XXVI	28.67
Q2	32.00	I	50.50	XIII	54.83	XXVIII	29.67
Q4	29.83	II	29.00	XIV	58.33	XXX	28.00

Con base a los resultados, 18 de los aislados redujeron la TS por debajo de las 30 dinas/cm, 7 de ellos son mayores a 30 y menores de 40 dinas/cm y 6 están entre las 50 y 60 dinas/cm. El sobrenadante del aislado microbiano A mostró una mayor reducción de la TS con un valor de 26.5 dinas/cm, mientras que IV fue el que presentó una menor disminución de TS con un valor de 60 dinas/cm.

Joshi y colaboradores en el 2013, realizaron un trabajo con aislados de bacterianos de ambientes extremos encontrando una TS máxima entre 35-27 dinas/cm, mientras que en el presente trabajo se encontró que el aislado A disminuyó de 72 a 26.50 dinas/cm. Este aislado presentó uno de los valores más bajos reportado para la especie *Bacillus sp* (Joy, Rahman y Sharma, 2017).

8.5 Determinación del índice de emulsificación a las 24 horas

En la tabla 8 se encuentra registrados el índice de emulsificación a las 24 horas (IE_{24}) de cada aislado microbiano. Los aislados A, Q2, XIII y XV no presentaron emulsificación, mientras que los aislados G, H, R4, S2, VI, XIV y XVIII presentaron un IE_{24} menor a 10 %, Q1, R3, U1, IV, VII, X, XXI y XXVI presentaron un IE_{24} entre 10 y 30 %, L, Q5, II, III, IX, XXV y XXVIII presentaron porcentaje mayor a 35 y menor a 45 y los

aislados Q4, S1, I y XXII presentaron un IE_{24} mayor a 45% siendo estos los aislados los de mayor índice de emulsificación de los 32 evaluados.

Tabla 8 Índice de emulsificación a las 24 horas de los sobrenadantes celulares.

Clave del aislado	IE_{24} %	Clave del aislado	IE_{24} %	Clave del aislado	IE_{24} %	Clave del aislado	IE_{24} %
A	00.00	R3	11.84	IV	18.33	XVIII	06.00
G	06.00	R4	05.00	VI	05.37	XXI	16.67
H	06.67	S1	51.79	VII	18.33	XXII	51.67
L	35.46	S2	01.67	IX	38.33	XXV	43.38
Q1	28.68	U1	26.00	X	26.67	XXVI	16.67
Q2	00.00	I	46.19	XIII	00.00	XXVIII	35.00
Q4	51.67	II	40.00	XIV	08.00	XXX	23.68
Q5	41.67	III	37.33	XV	00.00		

Sohail y Jamil (2020), reportan índices de emulsificación para especies de *Bacillus subtilis* de 21.73%. Los resultados de IE_{24} obtenidos para las especies de *B. subtilis* (Q1 y R4) obtenidos en el presente trabajo de tesis, fueron de 28.68% y 5.00% respectivamente. Mientras que otros géneros como *B. anthracis* (Q4), presentan un índice de emulsificación alto de 51.67%, por lo tanto, la emulsión de Q4 es más estable que Q1 y R4 ya que un índice de emulsificación mayor a 50% representa una estabilidad mayor del BS (Lara-Severino et al., 2017)

8.6 Evaluación de la producción de biosurfactantes con fuentes de carbono alterna: harina de mezquite y aceite de oliva

En la tabla 9 se muestran los resultados de crecimiento celular máximo de cada aislado microbiano, en que tiempo se presentó y con cual fuente de carbono. El mayor crecimiento celular se dio con la harina de mezquite y con dextrosa.

Tabla 9. Tiempo y tratamiento necesario para lograr el máximo crecimiento de los aislados microbianos

Clave de aislado	Concentración celular DO ₆₀₀	Tiempo h	Fuente de carbono	Cantidad de fuente de carbono %
A	1.18	8	Harina de Mezquite	3
H	1.45	96	Dextrosa	1
Q1	1.70	24	Harina de Mezquite	3
Q2	1.24	48	Harina de Mezquite	2
Q5	1.44	24	Dextrosa	2
R4	1.67	48	Harina de Mezquite	3
S1	1.39	24	Dextrosa	3
S2	1.45	24	Harina de Mezquite	2
U1	1.70	30	Dextrosa	1
II	1.59	24	Harina de Mezquite	1
VI	1.68	48	Dextrosa	3
IX	1.41	48	Harina de Mezquite	3
X	1.40	24	Dextrosa	2
XV	1.36	52	Dextrosa	3
XVIII	1.50	24	Harina de Mezquite	1
XXV	1.64	24	Dextrosa	1
XXVIII	1.41	48	Dextrosa	3

En la tabla 10 se observan los valores mínimos de TS registrada para cada sobrenadante proveniente de los cultivos líquidos de los aislados microbianos y la fuente de carbono utilizada. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio donde se utilizó harina de mezquite y dextrosa como fuente de carbono.

El tratamiento en el cual se obtuvo una mayor disminución de la TS fue aquel donde se utilizó harina de mezquite al 1 % como fuente de carbono y el sobrenadante del cultivo del aislado "X" cuya TS fue 26.78 dinas/cm. Para el caso del medio suplementado con dextrosa al 3% e inoculado con el aislado bacteriano U1 se observó una TS de 28.11 dinas/cm. De estos tratamientos 3 disminuyeron la TS a menos de 30 dinas/cm, 10 entre 30 y 40 dinas/cm y 4 arriba de 40 dinas/cm.

Tabla 10. valores de tensión superficial mínima obtenidos para cada aislado microbiano

Clave del aislado	TS mínima dinas/cm	Fuente de carbono	Cantidad en % de fuente de carbono
A	29.00	Dextrosa	2
H	43.11	Harina de Mezquite	2
Q1	33.61	Dextrosa	1
Q2	39.67	Aceite de oliva	2
Q5	33.50	Dextrosa	3
R4	42.44	Dextrosa	1
S1	35.44	Dextrosa	3
S2	32.00	Harina de Mezquite	1
U1	28.11	Dextrosa	3
II	32.50	Dextrosa	3
VI	38.22	Dextrosa	1
IX	43.11	Harina de Mezquite	1
X	26.78	Harina de Mezquite	1
XV	39.56	Harina de Mezquite	1
XVIII	31.94	Dextrosa	3
XXV	32.28	Harina de Mezquite	1
XXVIII	40.89	Dextrosa	3

En la tabla 11 se muestran los valores más altos obtenidos al evaluar el IE₂₄ para cada sobrenadante celular de los aislados bacterianos, así también los valores del Índice de Emulsificación (IE) a las 48 y 72 h para evaluar la estabilidad de la emulsión. Obteniendo que el sobrenadante del aislado S2 cultivado en medio suplementado con harina de mezquite al 3 % presento un 40 % de emulsión a las 24 h y se mantuvo estable durante 48 h, éste decreció significativamente a las 72 h.

Se ha demostrado que la eficiencia del BS depende completamente de la composición del medio, ya que, cuando la fuente de carbono esta inaccesible por su baja solubilidad es cuando se producen los BS para disponer de la fuente de carbono, siendo esta una de las técnicas de supervivencia de los microorganismos. (Islas et al., 2010)

Tabla 11. Porcentaje de índice de emulsificación a las 24, 48 y 72 horas

Clave Aislado bacteriano	% IE ₂₄	% Estabilidad		% Fuente de carbono
		48 h	72 h	
A	1.90	1.90	1.90	3 HM
H	9.52	9.05	0.33	2HM
Q1	17.1	13.3	0.50	3D
Q2	14.29	11.90	0.37	1 D
Q5	0.95	0.00	0.00	1 HM
R4	5.71	2.86	0.10	3 HM
S1	4.29	3.33	0.13	3 HM
S2	40.95	38.87	1.27	3 HM
U1	35.71	24.76	0.73	1 D
II	25.24	31.90	1.63	1 HM
VI	32.38	14.76	0.27	1 D
IX	28.10	27.62	0.70	3 HM
X	5.71	3.81	0.13	3 HM
XV	16.19	13.81	0.53	2 HM
XVIII	37.62	20.95	0.73	1 D
XXV	20.00	19.52	0.67	2 HM
XXVIII	20.95	20.48	0.77	1 D

HM= harina de mezquite, D= dextrosa

Como puede observarse en la figura 5, no se obtuvo la misma disminución de TS con respecto al primer análisis con el medio MSM dextrosa 2 %. (Korayem, Abdelhafez, Zaki y Saleh, 2015). Los microorganismos al disminuir su fuente de energía producen a los BS para hacer uso de la fuente de carbono. Para este análisis, se utilizaron dextrosa, el cual es un azúcar simple, harina de mezquite, que contiene aproximadamente 7.42 g/100g de azúcar (Garcia, 2020; Reyes, Sandoval, Méndez y Barriada, 2017) y aceite de oliva el cual no contiene azúcar. En base a las cantidades de azúcar de cada fuente de carbono utilizada, es que se obtienen diferentes resultados con el medio control (MSM 2% de dextrosa) que, con la modificación de cada uno de ellos, ya que hay menor disposición de azúcar.

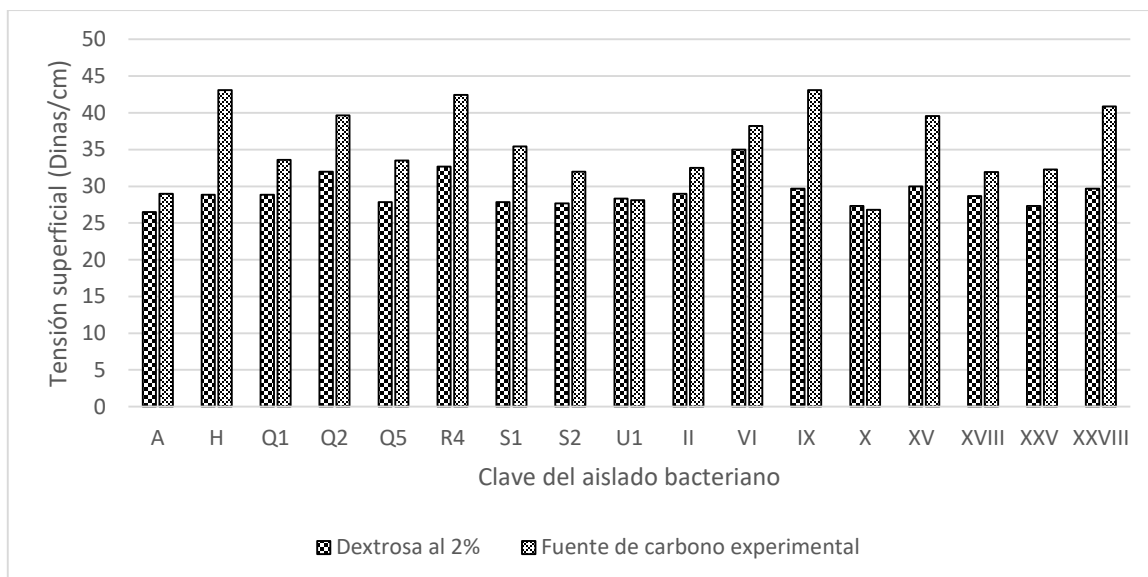


Figura 5. Comparación de la reducción de la tensión superficial con diferentes fuentes de carbono, dextrosa al 2% como control y fuente de carbono con mayor reducción de tensión superficial para cada aislado.

8.7 Evaluación de la producción de biosurfactantes con diferentes fuentes de nitrógeno.

Se realizó un diseño factorial al azar con la finalidad de encontrar cuál de los tratamientos con diferentes concentraciones por litro de fuentes de nitrógeno (NaNO_3 2.5g, NaNO_3 2g, NaNO_3 1.5g, KNO_3 2g, KNO_3 1.5g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2g y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.5g) tiene mejores resultados en la disminución de la TS. Los resultados se indican en la tabla 12, Para el 63 % de las aislado bacterianos, el NaNO_3 la fuente de nitrógeno en la que se presentó mayor disminución de TS.

Se realizó un análisis de medias para evaluar que sobrenadantes celulares de los aislados bacterianos presentaban mayor disminución de la TS. Todos aquellos sobrenadantes de los aislado bacterianos que presentaron valores de TS arriba de 40 dinas/cm fueron descartadas. Se analizó la interacción de factores en Minitab de las aislado bacterianos seleccionadas para obtener el tratamiento que permite que la TS disminuya.

Saikia, Deka, Deka y Banat (2012), evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno entre ellas KNO_3 y NaNO_3 . Los tratamientos con estas fuentes de nitrógeno presentaron un alto IE₂₄ con respecto al resto de las fuentes de nitrógeno evaluadas. Onwosi y Odibo (2012) evaluaron la producción de BS con, extracto de levadura y urea, obteniendo el mejor

resultado con NaNO_3 . Por lo tanto, basado en estas investigaciones, la sustitución de NaNO_3 por otras fuentes de nitrógeno no afecta de manera positiva a la producción de BS. Sin embargo, Saika y colaboradores obtuvieron buenos resultados utilizando KNO_3 como única fuente de nitrógeno.

Tabla 12. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de biosurfactantes microbianos

Clave de aislado bacteriano	TS dinas/cm*	Fuente de nitrógeno	Cantidad de Fuente de nitrógeno g
A	34.96 ± 2.236	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.5
H	40.31 ± 2.062	KNO_3	1.5
Q1	37.09 ± 1.764	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.5
Q2	42.86 ± 2.028	NaNO_3	1.5
Q4	33.54 ± 1.130	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.5
Q5	46.86 ± 2.369	NaNO_3	1.5
R3	44.09 ± 1.691	NaNO_3	2.0
R4	46.21 ± 1.481	NaNO_3	2.5
S1	48.60 ± 3.710	NaNO_3	2.5
S2	50.93 ± 3.840	KNO_3	1.5
U1	38.97 ± 2.000	KNO_3	1.5
II	35.29 ± 2.550	NaNO_3	1.5
III	36.52 ± 2.242	KNO_3	1.5
VI	41.98 ± 1.414	NaNO_3	2.5
VII	39.55 ± 1453	KNO_3	2.0
IX	47.60 ± 3.670	NaNO_3	2.0
X	36.54 ± 1.424	NaNO_3	2.0
XV	42.08 ± 5.12	NaNO_3	1.5
XVIII	34.88 ± 0.601	NaNO_3	2.0
XXII	37.81 ± 3.660	KNO_3	1.5
XXV	34.65 ± 1.118	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2.0
XXVI	40.78 ± 3.420	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.5
XXVIII	34.99 ± 0707	NaNO_3	2.0
XXX	40.19 ± 2.108	NaNO_3	1.5

*La TS es la media de una muestra de 9.

Con base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se seleccionaron los siguientes tratamientos para futuros análisis. Aislado A con harina de mezquite al 1 % y 1.5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, aislado III con aceite de oliva al 1 % y 1.5 g de KNO_3 , aislado XVIII con harina de mezquite al 1 % y 2.0 g de NaNO_3 , aislado XXV con harina de mezquite al 1 % y 2.0g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y como control se utilizará el siguiente tratamiento ya que se obtuvo una muy baja disminución de tensión superficial, aislado S2 con harina de

mezquite al 1 % y 1.5 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

8.8 Aislamiento de biosurfactantes

Los siguientes tratamientos fueron incubados con agitación oscilatoria durante 72 h: aislado A en medio suplementado con harina de mezquite al 1% como fuente de carbono y 1.5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como fuente de nitrógeno, aislado III en medio suplementado con aceite de oliva al 1% como fuente de carbono con 1.5 g de KNO_3 como fuente de nitrógeno, aislado XVIII inoculado en medio suplementado con harina de mezquite al 1% como fuente de carbono con 2.0 g de NaNO_3 como fuente de nitrógeno y aislado XXV en medio suplementado con harina de mezquite al 1% y 2.0g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante celular que se colocó en hielo para evitar degradación del BS, se realizó una separación líquido-líquido agregando acetona a 4 °C. En la tabla 13 se indica la cantidad de BS crudo obtenida de los cuatro mejores aislados bacterianos, así como la evaluación de la medición de la TS.

Tabla 13. Rendimiento máximo obtenido de biosurfactantes microbianos.

Clave del aislado bacteriano	Concentración de biosurfactante (g/L)	Tensión superficial (dinas/cm) \bar{x} (n=9)
A	1.6070	34.778 ± 0.833
III	3.0313	35.333 ± 1.000
XVIII	3.5391	30.444 ± 0.726
XXV	1.5300	38.333 ± 2.345

El tiempo de secado varía según la consistencia del precipitado obtenido, para el caso de la aislado bacteriano III cuya fuente de carbono fue aceite de oliva al 1%, se obtuvo un precipitado con consistencia cremosa, ya que la humedad fue eliminada, pero las propiedades del aceite no permiten que quede sólido en su totalidad. Para el caso de la aislado bacteriano XXV, provocó una reacción con la acetona pues se generó un agregado, razón por la que se realizó una filtración y posteriormente se realizó el mismo proceso que con el resto de los sobrenadantes celulares de los distintos aislados bacterianos para obtener el BS.

Se midió la TS de cada una de las réplicas registrando el promedio de las nueve replicas. Para el sobrenadante celular del aislado bacteriano A no hubo cambio alguno en la TS al utilizar un volumen menor, sin embargo, el sobrenadante obtenido de las aislado bacterianos III y XVIII si disminuyeron su capacidad de reducir TS al llevarlo volúmenes más grandes, siendo en esta última una disminución de 4 dinas/cm aproximadamente. Mientras tanto el sobrenadante obtenido del aislado bacteriano XXV aumentó la capacidad de reducir la TS al llevarlo a una escala de mayor volumen, esto debido a que los nutrientes están más disponibles en el medio, y los microorganismos pueden aprovecharlos de mejor manera (De Araujo et al., 2008).

De esta manera se puede obtener que al variar el volumen de medio en el que la aislado bacteriano sea cultivada, también es un factor que puede afectar en su eficiencia. Ostendorf, Silva, Converti y Sarubbo (2019), reportaron una concentración de biosurfactantes máxima de 2.05 ± 0.32 (g/L) con una TS de 27.2 ± 0.1 dinas/cm con el método de precipitación ácida con HCl.

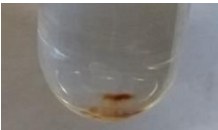



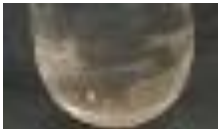
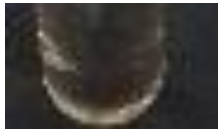






8.9 Pruebas de solubilidad




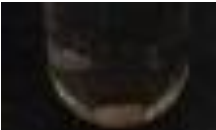
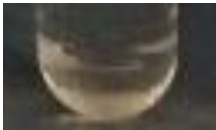

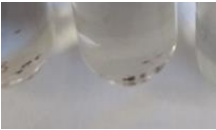





En tubos de ensaye de 15 ml se agregaron 10 ml del agua destilada, etanol 70% y acetona para evaluar la capacidad del BS de disolverse en diferentes solventes. A cada tubo se le adicionaron 3 mg de BS crudo. Los resultados fueron registrados en la tabla 15.







Goswami y Deka, (2019), demostraron que los BS producido por el aislado bacterianos de género *Bacillus spp*, se disolvieron completamente en etanol 70 % y fueron parcialmente solubles en agua destilada. En el presente trabajo de tesis se observó que los BS producidos por las aislado bacterianos A y XVII después de las 24 h no se disolvieron ni en agua destilada, etanol 70% ni en acetona ultrapura, por lo que se procedió agitar con vortex por 10 segundos y se dejó reposar por otras 24 horas. El BS crudo del aislado bacteriano A fue parcialmente soluble en agua destilada a las 48 horas en agitación, mientras que en etanol al 70% no se disolvió a pesar de la agitación y el tiempo extra de reposo.

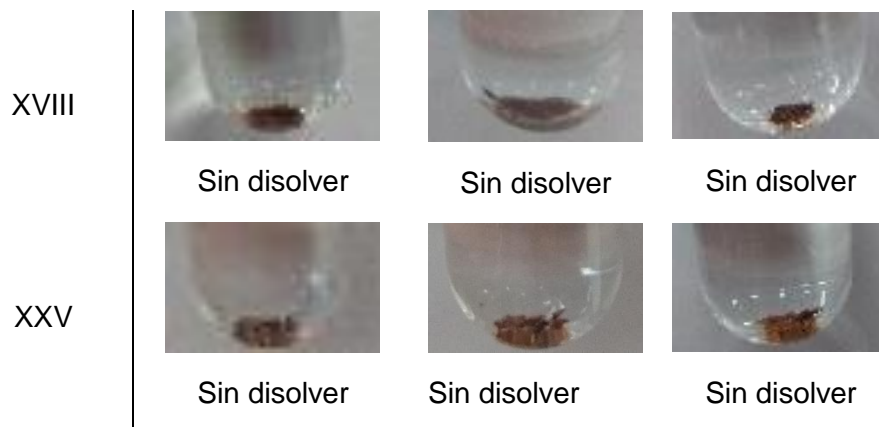
El BS obtenido de la aislado bacteriano XVIII, no se disolvió en ninguno de los solventes utilizados a pesar de la agitación. Se presentaron dificultades técnicas con el BS obtenido de la aislado bacteriano III debido a su textura provocada por el aceite de oliva, por esta razón el BS obtenido se dejó secar en un desecador totalmente sellado y después proceder a pesar.

Tabla 14. Prueba de solubilidad de los biosurfactantes crudos.

Clave de aislado bacteriano	Agua destilada		
	0 h	24 h	48 h
A	 Sin disolver	 Sin disolver	 Parcialmente disuelto
III	 parcialmente disuelto	 Disuelto	 Disuelto
XVIII	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver
XXV	 Sin disolver	 Sin disolver	 Parcialmente disuelto

Clave de aislado bacteriano	Etanol 70%		
	0 h	24 h	48 h
A	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver
III	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver
XVIII	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver
XXV	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver

Clave de aislado bacteriano	Acetona ultrapura		
	0 h	24 h	48 h
A	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver
III	 Sin disolver	 Sin disolver	 Sin disolver



El BS obtenido del aislado “A” se disolvió parcialmente en agua destilada a las 24 horas y después de 48 horas se disolvió por completo; utilizando etanol al 70 % se disolvió parcialmente a las 24 horas y se mantuvo en esta condición por el resto del tiempo. El BS obtenido del aislado III se disolvió a las 24 horas en agua destilada, en etanol al 70% se disolvió parcialmente a partir de las 24 horas y mantuvo esta condición el resto del tiempo. El surfactante obtenido del aislado XVII no se disolvió en agua destilada y en etanol se mantuvo parcialmente disuelto a partir de las 24 horas. Mientras que el surfactante obtenido del aislado XXV se disolvió parcialmente después de las 48 horas en agua destilada y no presentó cambio alguno en etanol al 70 %. Ningún BS fue soluble en acetona.

8.10 Pruebas de estabilidad

Se evaluó la estabilidad del BS crudo, bajo las siguientes condiciones: concentración de NaCl (2%, 4%, 6% y 8%), nivel de pH (2, 5, 7,9,12), y termoestabilidad (4, 30, 65 y 120 °C). Cada prueba se realizó por triplicado para cada muestra. Se midió la TS para evaluar su capacidad de reducirla y se registró. En la figura 6 se muestran los resultados de la prueba de halotolerancia, tomando como control agua destilada.

La TS del BS obtenido del aislado A, disminuyó considerablemente en presencia de NaCl 8%, mientras que en las concentraciones más bajas de sal se mantuvo estable. El BS obtenido del aislado III disminuyó la TS en las concentraciones de NaCl de 4 y 6%. El BS obtenido del aislado XVII no presentó resultados significativos de TS en concentraciones altas de NaCl mientras que el BS del aislado XXV mostró su máxima disminución de TS a la concentración más alta de NaCl.

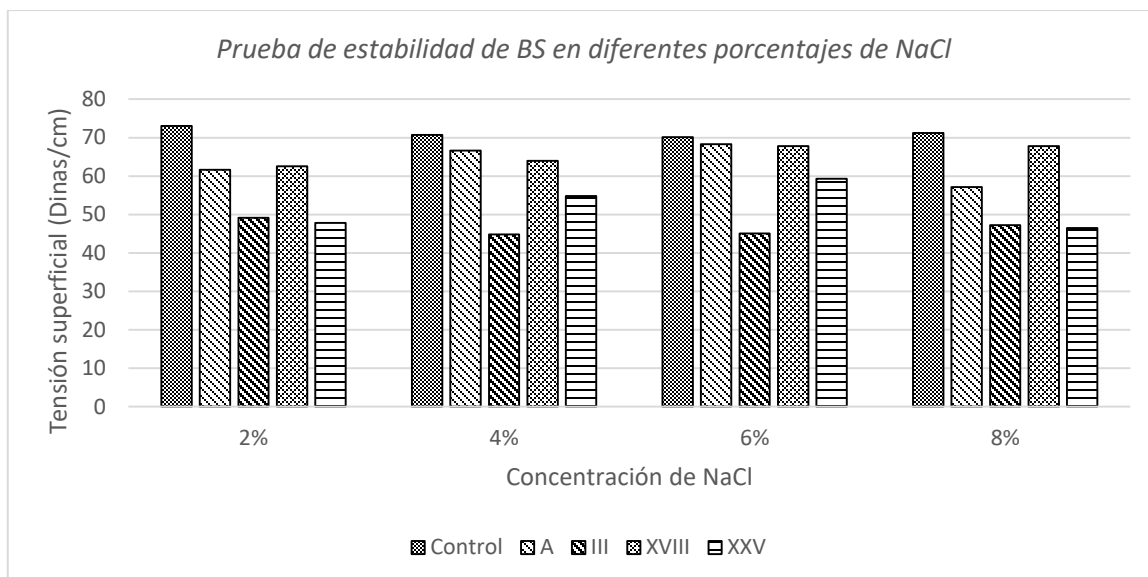


Figura 6. Prueba de estabilidad de BS en diferentes porcentajes de NaCl, comparando la disminución de la TS.

El aislado XXV fue el que presentó mayor estabilidad en el tratamiento con 4% y 6% mientras que el resto de los aislados, a pesar de que si disminuyeron la TS no hubo diferencia a diferentes concentraciones. En porcentajes, el aislado III fue aquel que disminuyó más del 30%. De acuerdo con Goswami y Deka, (2019) la estabilidad del BS en condiciones de alta salinidad, permite que este microorganismo sea apto para la biorremediación de sitios con una concentración alta de sales.

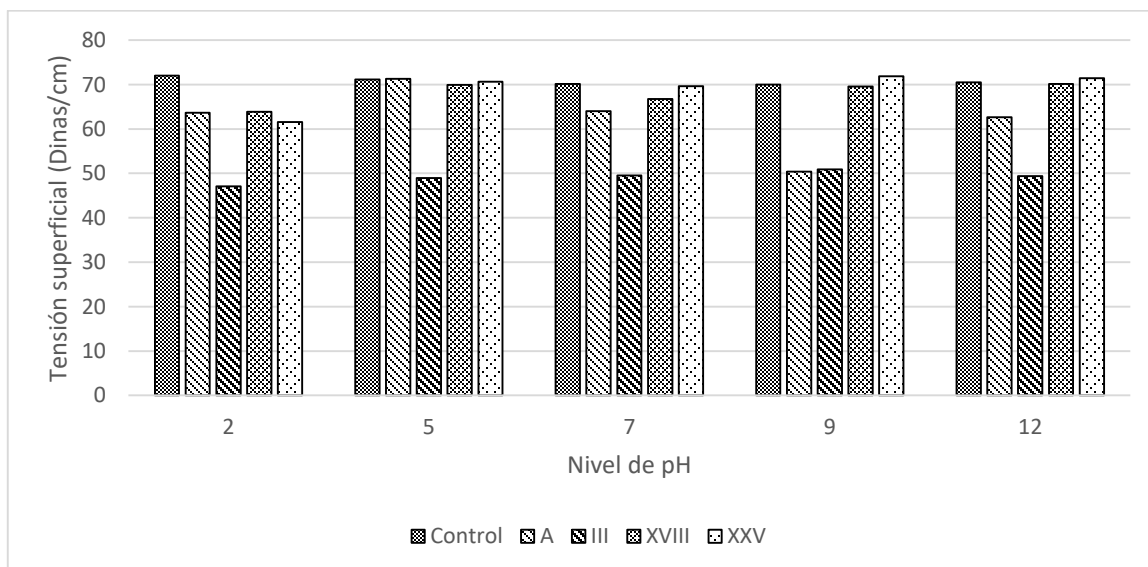


Figura 7. Prueba de estabilidad de biosurfactantes en diferentes niveles de pH.

En la figura 7 se muestran los resultados de estabilidad de los BS de los aislados bacterianos a diferentes niveles de pH. Para el aislado "A" hubo una mayor disminución

de TS a pH de 9, mientras que, a pH de 1, 7 y 12 la de TS se mantuvo constante, a pH de 5 no hubo disminución. En el caso del aislado "III" no hubo diferencia respecto a la disminución de TS en los diferentes niveles de pH. El sobrenadante del aislado XVIII al igual que XXV presentaron mayor disminución de TS a pH 2 mientras que a pH 5, 7, 9 y 12 la disminución de TS fue mínima.

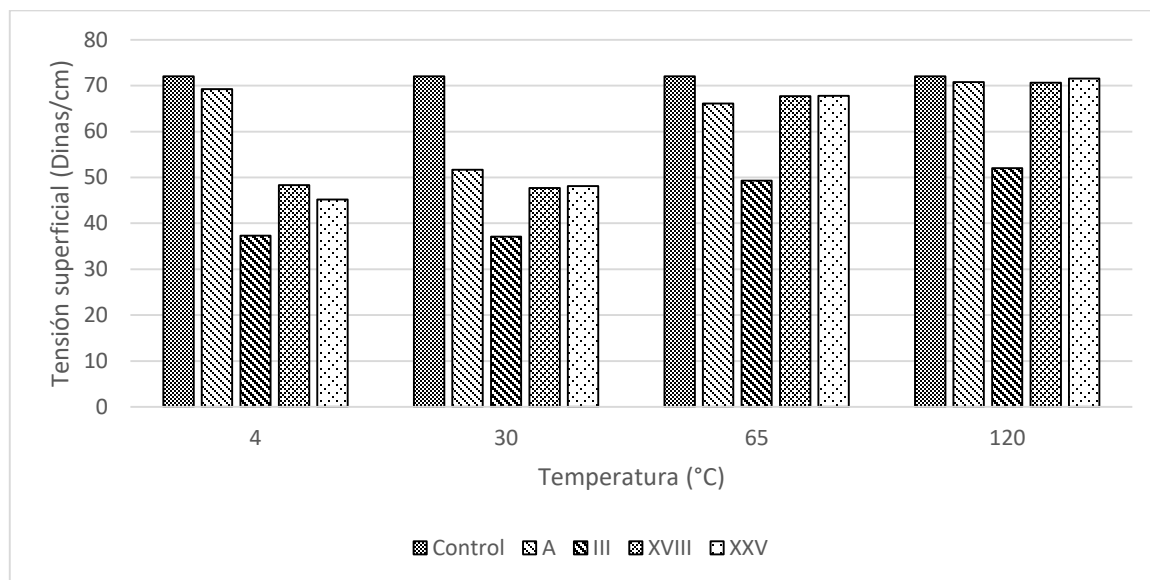


Figura 8 Prueba de estabilidad de biosurfactantes a diferentes niveles de temperatura

En la figura 8 se muestran los resultados de la prueba de estabilidad a diferentes niveles de temperatura. En este caso, el BS crudo se expuso a la temperatura correspondiente y posteriormente se disolvió en agua para ver su efecto sobre la TS.

Los BS obtenidos de los aislados A, XVIII y XXV, al llevarlos a una temperatura alta de 120 °C, no presentaron disminución de la TS, sin embargo, a 4 y 30 °C estos surfactantes biológicos disminuyeron significativamente la TS. El BS del aislado "A" presentó una mayor disminución de la TS a 30 °C.





8.11 Sideróforos



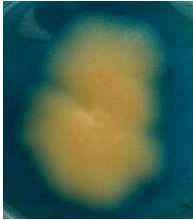

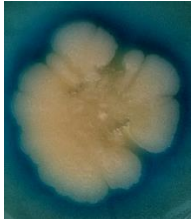
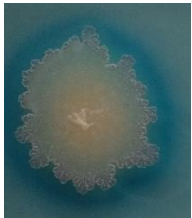
Se evaluó la capacidad productora de sideróforos de aquellos aislados bacterianos productores de BS. Los resultados se muestran en la tabla 15.

De los 24 aislados bacterianos evaluados, 13 de ellos no presentaron producción de sideróforos. Los aislados R3, S1, U1, VI, XXVIII y XXX dieron positivo para la

producción de sideróforos de dos tipos carboxilato y catecol, ya que se presentaron dos halos de colores amarillo claro y azul. Mientras que los aislados H, VIII, XVIII y XXII dieron positivo para la producción de sideróforos del tipo carboxilato ya presentaron halo de color amarillo. Para producción de sideróforos del tipo hidrozamatos (halo naranja), solo el asilado XV dio positivo.

Tabla 15. Evaluación de la producción de sideróforos de los aislados bacterianos

Clave del aislado bacteriano	Aislado	Descripción del halo observado
A		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
H		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Amarillo claro</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Carboxilato</p>
Q1		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
Q2		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>

Q4		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
Q5		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
R3		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol</p>
R4		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
S1		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol</p>
S2		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>

U1



Presencia: Si

Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul

Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol

II



Presencia: No

Color: N/A

Tipo de sideróforo producido: N/A

III



Presencia: No

Color: N/A

Tipo de sideróforo producido: N/A

VI



Presencia: Si

Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul

Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol

VII



Presencia: Si

Color: Amarillo claro

Tipo de sideróforo producido: Carboxilato







IX



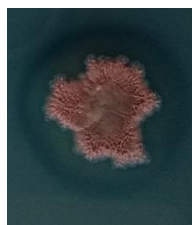
Presencia: No

Color: N/A

Tipo de sideróforo producido: N/A

X		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
XV		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Naranja</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Hidroxamato</p>
XXVIII		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Amarillo claro</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Carboxilato</p>
XXII		<p>Presencia: Si</p> <p>Color: Amarillo claro</p> <p>Tipo de sideróforo producido: Carboxilato</p>
XXV		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>
XXVI		<p>Presencia: No</p> <p>Color: N/A</p> <p>Tipo de sideróforo producido: N/A</p>

XXVIII



Presencia: Si

Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul

Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol

XXX



Presencia: Si

Color: Se presentan dos colores del centro hacia afuera, amarillo claro y azul

Tipo de sideróforo producido: Carboxilato y catecol

9. CONCLUSIONES

El uso de BS o surfactantes microbianos ha sido una opción para sustituir el uso de SS los cuales pueden traer daños extras al área donde se aplica. En el presente trabajo, se demostró que, al modificar la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el volumen, se obtienen diferentes resultados en la producción de BS, en algunos casos favorables como en los casos de los aislados bacterianos III y XVIII en los cuales la TS disminuyo al llevarlos a un mayor volumen.

Así también en el análisis de las modificaciones al medio de cultivos MSM 2% glucosa, se demostró que algunos de los sobrenadantes libres de células que no disminuían significativamente la TS, al modificar la fuente de carbono y/o nitrógeno se lograba una mayor disminución. Este es el caso del sobrenadante obtenido del aislado bacteriano X el cual en medio MSM suplementado con dextrosa a 2% disminuyó la TS a 28.33 dinas/cm mientras que utilizando harina de mezquite al 1% se logró disminuir a 26.78 dinas/cm, sin embargo, el resto de los sobrenadantes libres de células de los distintos aislados bacterianos, que se evaluaron sólo modificando la fuente de carbono, no disminuyeron la TS más que cuando se utilizó dextrosa al 2%. A pesar de esto, es importante recalcar, que, aunque estas no disminuyeron la TS por debajo del control, si hubo un efecto mínimo en la disminución de la TS.

La TS superficial fue medida en los sobrenadantes de cada tratamiento para encontrar aquel con mejor resultado al evaluar las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. El sobrenadante también fue utilizado para obtener el IE24. En cambio, para evaluar la solubilidad y estabilidad, fue necesario extraer el BS.

Aquellos sobrenadantes cuya TS fue disminuida significativamente fueron los obtenidos del aislado A con harina de mezquite al 1% como fuente de carbono y 1.5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como fuente de nitrógeno, al aislar el BS, este presento una leve solubilidad en agua y nula solubilidad en etanol al 70 % y en acetona. Respecto a su estabilidad, en diferentes concentraciones de NaCl varió la disminución de TS en agua destilada, en pH ácido disminuyo más la TS, su comportamiento fue más eficiente a temperaturas altas (120 °C). No hubo producción de sideróforos.

Para el sobrenadante del aislado III, el mejor resultado se obtuvo utilizando aceite de oliva al 1 % como fuente de carbono y 1.5 g de KNO_3 como fuente de nitrógeno. Respecto a su solubilidad en agua fue positiva, mientras que en acetona y etanol al 70 % fue nula. En concentraciones de 4 y 6 % de NaCl se mantuvo estable, mientras que en 2 y 8 % de NaCl no. En pH se mantuvo estable a niveles ácidos (2 y 5) y básicos (9 y 12). Las temperaturas altas (65 y 120 °C) afectaron su capacidad de disminuir la TS. El aislado no presentó producción de sideróforos.

El sobrenadante del aislado XVIII crecido en medio MSM con harina de mezquite al 1% como fuente de carbono y 2.0 g de NaNO_3 como fuente de nitrógeno, disminuyó significativamente la TS. Este sobrenadante no fue soluble en agua, acetona ni etanol al 70 %. Respecto a la concentración de NaCl, en concentraciones altas no disminuyó la TS, se mantuvo estable en niveles de pH ácidos y básicos y en temperaturas bajas (4 °C) y medias (30 y 65 °C). De los sobrenadantes evaluados en base a su disminución en la TS, este fue el único que presentó producción de sideróforos (carboxilato).

Por último, el biosurfactante producido por el aislado XXV en medio MSM modificado: harina de mezquite al 1% y 2.0g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como fuente de nitrógeno, fue insoluble en agua, acetona y etanol al 70 %. La TS del sobrenadante celular fue más baja a concentraciones de NaCl de 2% y 8 %. En niveles de pH ácidos mantuvo una TS baja mientras que en niveles básicos de pH no y en temperaturas altas (120 °C) la TS no disminuyó. Este aislado no es productor de sideróforos bajo las condiciones ensayadas.

Se logró optimizar el proceso de producción de BS a escala laboratorio, ya que se encontraron aquellas fuentes de carbono y nitrógeno con la que cada aislado bacteriano logra disminuir la TS de manera significativa. Encontrando de esta forma, que la harina de mezquite principalmente es una alternativa altamente viable para la producción de BS debido a su alto contenido de azúcares y proteínas. Y al ser un recurso biodisponible en nuestra región, facilita el uso y acceso de este. Así también como el aceite de oliva, aunque el que fue utilizado para este experimento fue de uso comercial.

En total, 11 de los 24 aislados bacterianos productores de BS, presentaron producción de sideróforos, 6 de ellos con coloración amarillo claro y azul (carboxilato y catecol), 4 coloración amarilla (carboxilato) y 1 naranja (hidroxamato).

10. BIBLIOGRAFIA

- Allégre, C., Poirier, J.-P., Humler, E., y Hofmann, A. (1995). *The chemical composition of the Earth* (pp. 5515–5526). pp. 5515–5526. Elsevier.
- Almeida, D. G. De, Cássia, R. De, Da, F. S., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., y Banat, I. M. (2016). *Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances*. 7(October), 1–14.
- Alvarez, M. (2004). La industria de los surfactantes : tendencias mundiales y perspectivas para Colombia. *Revista Palmas*, 25(especial,), 340–353. Retrieved from <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1050>
- Anderson, D. L. (1983). Chemical composition of the mantle. *JGR Solid Earth*, 88(s01), B41–B52.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., y Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboracion y caracterización De de emulsiones estabilizadas por polimeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211–231.
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review BIOSURFACTANTS PRODUCTION A N D POSSIBLE USES IN POLLUTION REMEDIATION: A REVIEW. *Elsevier*, 51(January 1995), 1–12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., y Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508.
- Batista, S. B., Munteer, A. H., Amorim, F. R., y Tótola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97(6), 868–875.
- Becerra, L., y Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23–31.
- Benavides López de Mesa, J., Quintero, G., Vizcaíno, Ms., Guevara, Cáceres, A. L. J., Riaño, Diana Carolina Gutiérrez García, M., y Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82–90. Retrieved from
- Bodour, A. A., Guerrero-barajas, C., Jiorle, B. V, Malcomson, M. E., Paull, A. K., Somogyi,

- A., ... Maier, R. M. (2004). *Structure and Characterization of Flavolipids , a Novel Class of Biosurfactants Produced by Flavobacterium sp . Strain MTN11*. 70(1), 114–120.
- BROWN, M. J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*, 13(2), 61–64.
- Cai, Q., Zhang, B., Chen, B., Zhu, Z., Lin, W., y Cao, T. (2019). Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. 86, 402–419.
- Campos, E. (2017). Aprovechamiento de las vainas de mezquite para la producción de alcohol, empleando hongos en la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos.
- Chen, C., Sun, N., Li, D., Long, S., Tang, X., Xiao, G., y Wang, L. (2018). Optimization and characterization of biosurfactant production from kitchen waste oil using *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14934–14943.
- CONAGUA. *Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Laguna Salda (0209), Estado de baja california*. , (2018).
- Cooper, D. G. y Goldenberg, B. G. (1987). Surface-Active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224 LP – 229.
- Cortés-Sánchez, A. de J.; Díaz-Ramírez, M.; Salgado-Cruz, M. de la P. (2017). *Bacillus cereus* : alimentos, salud y biotecnología. *Agroproductividad*, 10, 3–9.
- D. Desai, Jitendra, Banat, I. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Fuel and Energy Abstracts*, 38(4), 221.
- Datta, P., Tiwari, P.y Pandey, L. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource Technology*, 270, 439–448.
- Davis, J. P. y Foegeding, E. A. (2007). Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- De Araujo, F., Melo, L., Brito, A., Ramos, R., Piacsek, C. y Guimaraes, D. (2008). Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor Oxygen-controlled

- Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 147(June 2020), 33–45.
- De la rosa, Nuvia, Sanchez Salinas, Enrique, Ortiz Hernandez, M. L. (2015). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Fizyoterapi Rehabilitasyon*, 26(2), 73–77.
- Delgado-estrella, A., Rivas-Hernández, G., Barreto-Castro, M., Benítez, J., y Acevedo-Olvera, G. (2014). *Determinación de metales pesados en biopsias de toninas (Tursiops truncatus) de la región de la laguna de Términos, Campeche, México.*
- El-Sheshtawy, H. S., y Doheim, M. M. (2014). Selection of Pseudomonas aeruginosa for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1–6.
- Elkhawaga, M. (2017). Optimization and characterization of biosurfactant from Streptomyces griseoplanus NRRL- ISP5009. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 691–707.
- Fabelo, J. (2017). Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados. *Centro Azúcar*, 44(1), 53–60. Retrieved from
- Fernandes, P. A. V., De Arruda, I. R., Dos Santos, A. F. A. B., De Araújo, A. A., Maior, A. M. S. y Ximenes, E. A. (2007). Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 704–709.
- Fernández, G., García, F., Aparicio, F. y Sánchez, L. (2009). Investigación Química Moléculas anfifílicas orgánicas . *An. Quím*, 105(2), 89–94.
- Fonseca, R., Silva, A., De franca, F., Cardoso, V. y Sérvulo, E. (2007). Optimizing Carbon / Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a Bacillus subtilis Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136–140(May).
- Garcia, A. (2020). *Composición química, propiedades físicas y tecnofuncionales de vaina de mezquite (Prosopis spp) para uso como extensor en productos cárnicos emulsionados.*
- Gharibzahedi, S. M. T., Mousavi, S. M., Khodaiyan, F. y Hamed, M. (2012). Optimization and characterization of walnut beverage emulsions in relation to their composition and structure. *International Journal of Biological Macromolecules*.

- Giraldo, J. D. y Gutiérrez, S. (2014). Actividad Emulsificante Y De Remoción De Metales Pesados Del Ramnolipido Producidos Por Pseudomonas Aeruginosa Pb25. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 80(1), 35–44.
- Gomez P. y Perez M. (2007). Archaeobacterias hipertermófilas: vida en ebullición. *Revista complutense de ciencias veterinarias*, 1(2), 1988-2688
- Goswami, M. y Deka, S. (2019). Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178(August 2018), 285–296.
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A. y Rodrigues, L. R. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–7.
- INECC. (2007). Tecnologías de remediación. Retrieved from SEMARNAT website: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>
- Ishaq, U., Akram, M. S., Iqbal, Z., Rafiq, M., Akrem, A., Nadeem, M., ... Baig, M. A. (2015). Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1035–1045.
- Islas, D. J., Medina, S. A., Noel, J., Rodríguez, G.,. (2010). *Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos*. 26(1), 65–84.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., y Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99(1), 195–199.
- Joy, S., Rahman, P. K. S. M. y Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241
- Korayem, A. S., Abdelhafez, A. A., Zaki, M. M. y Saleh, E. A. (2015). Optimization of biosurfactant production by *Streptomyces* isolated from Egyptian arid soil using Plackett–Burman design. *Annals of Agricultural Sciences*, Vol. 60, pp. 209–217.
- Kosaric, N. (2010). Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation Naim. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 295–304.
- Kumar, L., Awasthi, G. y Singh, B. (2011). Extremophiles: A novel source of industrially

- important enzymes. *Biotechnology*, 10(2), 121–135.
- Lara-Severino, R. del C., Gómez Olivan, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., y Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529–539.
- Lászlová, K., Dudášová, H., Olejníková, P., Horváthová, G., Velická, Z., Horváthová, H., y Dercová, K. (2018). The Application of Biosurfactants in Bioremediation of the Aged Sediment Contaminated with Polychlorinated Biphenyls. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(7).
- Lopez, A. (2015). *Bacterias extremófilas y su potencial en la producción de auxinas y metabolitos con actividad tensoactiva*.
- Lovaglio, R. B., dos Santos, F., Jafelicci, M. y Contiero, J. (2011). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Elsevier*, 85(2), 301–305.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W. y Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Elsevier*, 285, 419–435.
- Martínez, M. (2015). *Obtención de un biosurfactante para el recobro mejorado de petróleo*. 104. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/48150/>
- Matvyeyeva, O. L., Vasylychenko, O. A., y Aliieva, O. R. (2014). Microbial Biosurfactants Role in Oil Products Biodegradation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2(2), 69–74.
- McKee, T., & McKee, J. (2009). *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. Carbohidratos*.
- Miller, R. M. (1995). Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 1), 59–62.
- Morozkina, E. V, Slutskaia, E. S., Fedorova, T. V, Tugay, T. I., Golubeva, L. I., y Koroleva, O. V. (2010). Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1), 1–14.
- Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., y Dhankher, O. P. (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers*

- in Plant Science*, 7(March), 1–14.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, pp. 183–198.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K., y Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci*, 94(6),
- Nagy, G. M. (2018). *Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais*. Universidade Federal de Uberlândia.
- Oliart-Ros, R., Manresa-Presas, A. y Sánchez-Otero, M. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico products in biotechnological development. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*, 11(1), 79–90.
- Onwosi, C. O. y Odibo, F. J. C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 937–942.
- Ortiz, D.,y Silva, J. (2019). Efectos ambientales de los hidrocarburos. Una revision. *Especialización En Control de La Contaminación Ambiental*, 1–11.
- Ostendorf, T. A., Silva, I. A., Converti, A.y Sarubbo, L. A. (2019). *Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater*. 295(November 2018), 71–79.
- Pasquali, R., Brengni, C., & Serrao, R. (2005). Geometría de Micelas y otros Agregados de Sustancias Anfífilas. *Acta Farm. Bonaerense*, 19(5), 461–467.
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., y Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259–268.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S.y Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131.
- Priyadharshini, A. D. y Latha, D. (2016). Biosurfactant production from *Bacillus* sp . and its application in the medical field. *International Research Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(5), 1–8.

- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M. y Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles , extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7907–7913.
- Rane, A. N., Baikar, V. V., Ravi Kumar, V. y Deopurkar, R. L. (2017). Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–12.
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G., y Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications. *Biodegradation - Life of Science*, 3(4).
- Reyes, L., Sandoval, S., Méndez, L y Barriada, L. (2017). Caracterización de polvos (harinas) de Mezquite (*Prosopis laevigata*) para aplicaciones alimentarias .
- Ribeiro, B., dos Santos, M., da Silva, I., Meira, H., de Olivera, A., Guerra, J y Sarubbo, L. (2020). Study of the Biosurfactant Production by *Saccharomyces Cerevisiae* URM 6670 Using Agroindustrial Waste Study of the Biosurfactant Production by *Saccharomyces Cerevisiae* URM 6670 Using Agroindustrial Waste. (April).
- Riojas González, P., Gortáres Moroyoqui, P., Moncada Fernández, I. y Balderas Cortés, J. de J. (2011). Sinergia en surfactantes para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química y Medio Ambiente*, 107, 243–249.
- Roane, T. M., Rensing, C., Pepper, I. L. y Maier, R. M. (2012). Microorganisms and Metal Pollutants. In *Environmental Microbiology*.
- Rodríguez, E., Rojo, G., Ramírez, B., Martínez, R., Cong, M., Medina, S. y Piña, H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. y Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10(3), 173–193.
- Ron, E. Z. y Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M. y Banat, I. M. (2012). Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of Microbiology*, 62(2), 753–763.
- Saldaña, R. (2016). *Bacterias asociadas a plantas de la laguna salada, Baja California y posibles aplicaciones en la industria*.

- Santos, P., Silva, S., Costa, L., Rufino, D., Santos, A., Ramos, C. S., Porto, A. L. F. (2018). Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces sp.* DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(2), 1–10.
- Semarnat. (2014). El medio ambiente en Mééxico. Retrieved October 13, 2020, from https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/07_residuos/7_4_1.html
- Sepúlveda, T. V. y Velasco, J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. D.F.
- Shakeri, F., Babavalian, H., Amoozegar, M. A., Ahmadzadeh, Z., Zuhuriyanizadi, S. y Afsharian, M. P. (2020). Production and Application of Biosurfactants in Biotechnology. *Biointerface REsearch in Applied Chemistry*, 11(3), 10446–10460.
- Sohail, R. y Jamil, N. (2020). Isolation of biosurfactant producing bacteria from Potwar oil fields : Effect of non-fossil fuel based carbon sources. *Green Process Synth*, 9, 77–86.
- Tahseen, R. (2017). *Effect of Biosurfactants on Remediation of Oil Contaminated Soil Razia Tahseen*.
- Valdés-González, G. D., Rodríguez-Ponce, E. R., Miranda-Visa, C. y Lillo-Sotomayor, J. (2020). Estudio de viabilidad de sistemas fotovoltaicos como fuentes de energía distribuida en la ciudad de Arica, Chile. *Informacion Tecnologica*, 31(3), 249–256.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A. y Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153.
- Valenzuela, J. (2015). *Sustancias bioactivas (biosurfactantes y sideróforos) producidos por microorganismos de suelo árido*. Universidad Autonoma de Baja California.
- Velásquez, J. A. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151–168.
- Vishnyakov, A., Lee, M. y Neimark, A. V. (2013). *Prediction of the Critical Micelle Concentration of Nonionic Surfactants by Dissipative Particle Dynamics Simulations*.
- Welch, S. (1992). *Transferrin: The Iron Carrier*.

- Wilhelm, S. y Trick, C. (1994). Iron-limited growth of cyanobacteria : Multiple siderophore production is a common response. *Limnol. Oceanogr.*, 8(39), 1979–1984.
- Winkelmann, G. (1991). *Handbook of Microbial Iron Chelates*.
- Yañez-Ocampo, Gustavo, ong-Villarreal, A. (2013). Biosurfactantes Microbianos , Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*, 17(3), 12–28.
- Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C.y Wong-Villarreal, A. (2017). Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. *Open Agriculture*, 2(1), 341–349.
- Zamora, A., Ramos, J. y Arias, M. (2012). EFECTO DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE UN SUELO DE SABANA. *Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado*.
- Zhu, H. yAitken, M. D. (2010). *Surfactant-Enhanced Desorption and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Contaminated Soil*. 44(19), 7260–7265.
- Zivelyte, V., Valters, K. y Vasarevicius, S. (2017). Comparison between passive remediation and bioremediation for the hydrocarbons contaminated soil clean up. *Energy Procedia*, 128, 339–344.