

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“OBTENCIÓN DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE BACTERIAS AISLADAS
DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS NATIVAS DE MEXICALI. B.C”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

VIANEY MENDEZ TRUJILLO

DIRECTOR

DRA. MONICA CARRILLO BELTRAN

CO-DIRECTOR

DR. DANIEL GONZÁLEZ MENDOZA

Mexicali, B. C.

Septiembre 2015

AGRADECIMIENTOS

Por principio mi agradecimiento a Dios, por permitirme comenzar y finalizar este proyecto junto a mi familia.

A mis padres; Yolanda y José Luis, que a pesar de las distancias estuvieron siempre junto a mí en esencia.

A mi hermano José Luis, siempre apoyándome y animándome a concluir lo comenzado, a everlay, jorge y erick.

Con especial cariño, respeto y amor a Daniel, quien ha caminado junto a mí, apoyándome siempre y en cualquier situación.

A mis hijos Daniela y Xavier, gracias mis amores por que ustedes son el mejor motivo para seguir superándome,

El concluir un proyecto como el que a continuación se presenta, implica la colaboración de personas e instituciones que apoyan, fortalece y enriquecen aún más el trabajo de investigación, es por ello que agradezco a:

CONACYT; por el apoyo económico brindado a lo largo del trabajo de investigación.

INSITUTO DE INGENIERIA UABC; Por las facilidades recibidas para la elaboración de este proyecto de investigación

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS UABC; Por el espacio facilitado para realizar parte de este trabajo.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA. Por permitirme un espacio dentro de su laboratorio y realizar actividades enriquecedoras.

A mi comité de grado:

Dra. Mónica Carrillo Beltrán, Dra. Nallely Rivera Reyna, Dr. Benjamín Váldez Salar, Dr. Daniel González y Dr. Rogelio A. Ramos Irigoyen, por sus valiosas aportaciones al presente trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos:

Yesenia, Olivia, Nallely, Margarita, Julio, José, Eva Ernersto, a todos ustedes gracias por su compañía y apoyo a lo largo de este camino.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de figuras	i
Lista de tablas	iii
Lista de anexos	iv
1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Definición de surfactantes	4
2.1.2. Aplicaciones de los surfactantes	9
2.1.3. Clasificación de los surfactantes	13
2.1.4. Nuevos tipos de surfactantes	16
2.2. Definición y clasificación de los biosurfactantes	21
2.2.1. Aplicaciones de los biosurfactantes	24
2.2.2. Microorganismos productores de biosurfactantes	26
2.2.3. Producción de biosurfactantes	29
2.2.4. Microorganismos productores de biosurfactantes en México	30
2.3. HIPOTESIS	32
2.3.1. OBJETIVO GENERAL	32
2.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1. Selección del sitio de muestreo	34
3.2. Aislamiento y conservación de los microorganismos	36
3.3. Prueba de capacidad hemolítica	37
3.4. Identificación molecular de las cepas aisladas	39
3.5. Formación de biopelícula de los aislados bacterianos	42
3.6. Capacidad de autoagregación de los aislados bacterianos	43
3.7. Estandarización del medio de cultivo para las cepas aisladas	44
3.8. Curvas de crecimiento de las cepas aisladas	44
3.9. Velocidad de crecimiento de las cepas aisladas	46

3.10. Obtención del biosurfactante de las cepas aisladas	47
3.11. Actividad emulsificante (EA) de las cepas aisladas	47
3.12. Técnica de dispersión de aceite en las cepas aisladas	48
3.13. Índice de emulsificación (E_{24}) en las cepas aisladas	49
3.14. Identificación de genes productores de biosurfactantes	50
3.15. Actividad antimicrobiana de los biosurfactantes	52
3.16. Extracción y caracterización de los biosurfactantes	53
3.17. Espectrofotometría de infrarrojo de los biosurfactantes	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1. Caracterización e identificación de microorganismos aislados	56
4.2. Actividad hemolítica y tinción de Gram de las cepas aisladas	58
4.3. Identidad molecular de las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg	61
4.4. Identificación de genes productores de biosurfactantes	67
4.5. Formación de biopelículas de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	71
4.6. Crecimiento de las cepas de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	74
4.7. Antibiograma en las cepas de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	80
4.8. Efecto antagónico de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	81
4.9. Dispersión de aceite por Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	83
4.10. Actividad de emulsificación de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	84
4.11. Índice de emulsificación (E_{24}) de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	86
4.12. Análisis por IR de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	88
5. CONCLUSIONES	93
6. LITERATURA CITADA	96
7. ANEXOS	124

Lista de figuras

Número	Descripción	Página
1	Estructura general de un surfactante	4
2	Concentración micelar crítica y formación de micelas	5
3	Representación esquemática de los tres más comunes formas geométricas de micelas formadas por los surfactantes en soluciones acuosas	6
4	Porcentaje estimado de venta anual de surfactantes por regiones	8
5	Porcentaje de consumo global de surfactantes por área de aplicación	8
6	Representación esquemática de los surfactantes	13
7	Estructura química de biosurfactantes más comunes: (a) lípido manosileritrol (b) surfactina (c) lípido de trealosa (d) soforolipidos (e) ramfolipidos (f) emulsan.	22
8	Proceso general de colecta del suelo para el aislamiento de microorganismos	35
9	Técnica de dilución para el aislamiento de microorganismos del suelo.	36
10	Proceso de tinción de Gram (a,b,c y d) y visualización al microscopio	37
11	Prueba de hemolisis en sangre para identificar propiedades biosurfactantes en los microorganismos aislados.	38
12	Proceso de conservación de las cepas seleccionadas del suelo rizosferico de cachanilla, salicornia y algodón.	39
13	Proceso de extracción del ADN de las cepas seleccionadas de cada planta de Cachanilla, Salicornia y Algodón.	40

14	Representación gráfica del crecimiento y conteo bacteriano	45
15	Diagrama del proceso de medición del índice de emulsificación (E ₂₄)	49
16	Poblaciones de microorganismos presentes de las muestras de la rizosfera de Salicornia, Algodón y Cachanilla..	56
17	Hemolisis de cada aislado procedente del suelo rizosferico de Cachanilla (Bs-cach) Algodón (Bs-Alg) y Salicornia (Bs-Cach01).	58
18	Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de Cachanilla (1), Salicornia (2) y Algodón (3).	60
19	Gel de agarosa que contiene los amplificadores de los genes ribosomales 16S, MM: marcador molecular Ladder 1Kb, Bs-Cach: cachanilla; Bs-Cach01: salicornia y Bs-Alg: algodón	62
20	Secuencias de nucleótidos de cada una de las cepas aisladas de la rizosfera de Cachanilla: 1) Bs-Cach, Salicornia: 2) Bs-Cach01 y Algodón: 3) Bs-Alg	64
21	Árbol filogenético mostrando la relación entre los aislamientos de Bacillus identificados con otras secuencias basados en alineamientos del gen ribosomal 16S y fue construido usando la versión 6.0 del programa MEGA.	66
22	Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleótidos del gen de subtilisina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.	68
23	Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleótidos del gen de subtilisina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.	69

24	Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleotidos del gen de surfactina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.	70
25	Formación de biopelículas por las cepas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 provenientes de la rizofera de plantas de cachanilla, algodón y salicornia	72
26	Capacidad de autoagregación de las cepas de <i>B.subtilis</i> . a) agregación.	73
27	Curva de crecimiento de Bs-Cach a las 48 horas	75
28	Curva de crecimiento de Bs-Cach a las 48 horas en UFC/mL.	76
29	Curva de crecimiento de Bs-Alg a las 48 horas	77
30	Curva de crecimiento de Bs-Alg a las 48 horas en UFC/mL.	78
31	Curva de crecimiento de Bs-Cach01 a las 48 horas	79
32	Curva de crecimiento de Bs-Cach01 a las 48 horas en UFC/mL.	79
33	Prueba de antibiosis en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> aisladas.	80
34	Efecto antagónico de <i>Bacillus subtilis</i> cepa Bs-Cach en <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .	82
35	Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Alg (algodón).	89
36	Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Cach (cachanilla).	90
37	Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Cach01 (salicornia).	91

Lista de tablas

Número	Descripción	Página
1	Microorganismos productores de biosurfactantes	23
2	Aplicación de biosurfactantes en diferentes industrias	25
3	Microorganismos marinos y biosurfactantes producidos	26
4	Microorganismos del suelo y uso del biosurfactante	27
5	La ubicación de los sitios de muestreo	34
6	Secuencia de oligonucleótidos empleados para la identificación de los genes respectivos	51
7	Comparación de medias de las poblaciones de bacterias rizosfericas asociadas con tres parches de vegetación en el Valle de Mexicali	57
8	Tinción de Gram y morfología de los aislados de la rizosfera de Cachanilla, Salicornia y Algodón..	60
9	Registro de secuencias de las cepas aisladas en el GenBank	63
10	Valores de crecimiento calculado a partir de la fase exponencial	77
11	Inhibición de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> por extractos crudos de las cepas de <i>B.subtilis</i> aisladas.	82
12	Comparación de la eficiencia de dispersión de aceite usando extractos crudos de biosurfactante producidos por Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01	84
13	Actividad de emulsificación de biosurfactantes crudos de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 en diferente tipos de aceites	85
14	Porcentaje del Índice de emulsificación de biosurfactantes crudos de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 en diferente tipos de aceites.	87

Lista de Anexos

Número	Descripción	
1	ARTICULO PUBLICADO 1	115
2	ARTICULO PUBLICADO 2 CARTA ACEPTACIÓN	116
3	PARTICIPACION EN CONCURSO CREATIVIDAD	117

RESUMEN

El estudio sobre la diversidad microbiana en el valle de Mexicali presenta un potencial biotecnológico en el área alimentaria que podría abrir nuevas líneas de investigación en el desarrollo de nuevos productos derivados del contenido de metabolitos secundarios de microorganismos nativos. En este aspecto la diversidad de microorganismos productores de biosurfactantes en el valle de Mexicali es poco conocida y estudios encaminados a su identificación son necesarios. Por lo tanto para conocer si los microorganismos asociados a la rizosfera presente en plantas nativas del valle de Mexicali, tienen la capacidad metabólica de biosintetizar biosurfactantes con propiedades antimicrobianas que pueden ser aplicados en el sector alimentario. Se realizaron estudios a nivel bioquímico y molecular la identificación de la capacidad de producción de biosurfactantes por microorganismos nativos presentes en la rizosfera de plantas de salicornia, cachanilla y algodón.

Los resultados mostraron que tres aislados identificados como Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, procedentes de suelo rizosférico de plantas de cachanilla, salicornia y algodón, mostraron actividad hemolítica. El análisis molecular del gen 16S ribosomal de los tres aislados junto el análisis filogenético permitió clasificarlo *Bacillus subtilis* (homología del 99%). El análisis de amplificación molecular de genes de lipopeptidos por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en el ADN de las tres cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, permitió la identificación parcial de fragmentos de genes de iturina, surfactina y subtilisina de forma constitutiva.

No obstante aunque todas las cepas presentaron uno o dos genes de lipopeptidos, únicamente la cepa Bs-Cach presento actividad antifungica in vitro. El análisis de la actividad de los biosurfactantes de cada cepa fue investigada mediante el ensayo de dispersión de la gota de aceite, actividad emulsificante e índice de emulsificación, en donde los resultados indicaron que B-Cach, aislada de raíces de las plantas Cachanilla puede formar una emulsión estable con aceites utilizados en la industria alimentaria. Por otra parte las cepas Bs- Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg mostraron la presencia de lipopeptidos en base a la presencia de grupos funcionales de extracto crudo analizado por IR, lo cual nos da indicio de que las tres cepas producen un lipopeptido.

En este sentido, los resultados de los espectros infrarrojos nos muestran que Bs-Cach01 y Bs-Alg, producen un biosurfactante que posiblemente presenta una estructura similar a surfactina. No obstante futuros estudios son requeridos para confirmar y deducir la composición y estructura molecular exacta. Finalmente, en base a las respuestas presentadas por las tres cepas aisladas del valle de Mexicali, es posible sugerir que las cepas Bs-Cach 01 y Bs-Cach, podrían tener una posible aplicación en el área de alimentos debido a la presencia de lipopeptidos con propiedades anti fúngicas. Sin embargo, estudios encaminados a evaluar su incorporación en el proceso de formulación de alimentos tienen que ser realizados

CAPITULO 2
ANTECEDENTES

2.1. Definición de *surfactantes*

El término agente surfactante o tensoactivo fue acuñado por Antara productos en 1950, y se aplica aquellas sustancias que disminuyen la tensión superficial entre la fase dispersa y continua presente en un líquido o dos líquidos diferentes, facilitando su difusión (Mishra et al., 2009). Los surfactantes presentan una estructura anfifílica (Figura 1) que se manifiesta en la afinidad de cada parte de la molécula hacia una fase de distinta polaridad, y en la concentración del surfactante en la superficie del líquido; disminuyendo la tensión superficial del mismo (Stoyanov et al. 2003).

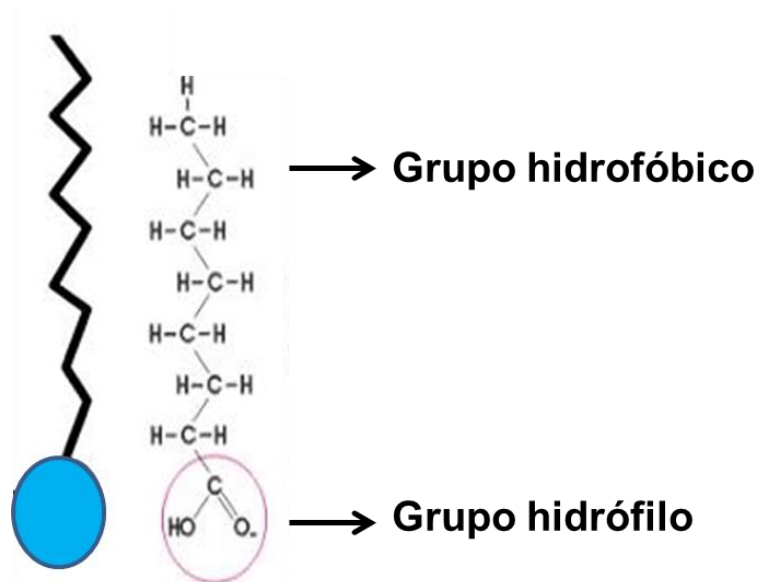


Figura 1. Estructura general de un surfactante

De igual forma, el ordenamiento de los grupos hidrofóbicos para evitar el contacto con el agua, hace que las cabezas de los grupos hidrófilos se orienten hacia la fase acuosa.

Formando agregados de surfactantes que pueden variar en forma dependiendo de la concentración. Este proceso se denomina 'micelación' y los agregados que se conoce como 'micelas. Generalmente, las micelas se empiezan a formar a una concentración distinta y con frecuencia muy baja conocida como la "concentración micelar crítica" o "CMC" (Medina-Moreno y Gracida-Rodriguez, 2010). Por ejemplo cuando a un líquido se le añade un surfactante, este queda disperso en el mismo, conforme aumenta la concentración de este la tensión superficial disminuye progresivamente hasta llegar a una concentración en la que cesa la reducción de la tensión superficial y que corresponde a la CMC, que es el punto en donde las moléculas del surfactante dejan de estar dispersas para unirse en forma de micelas (Figura 2).

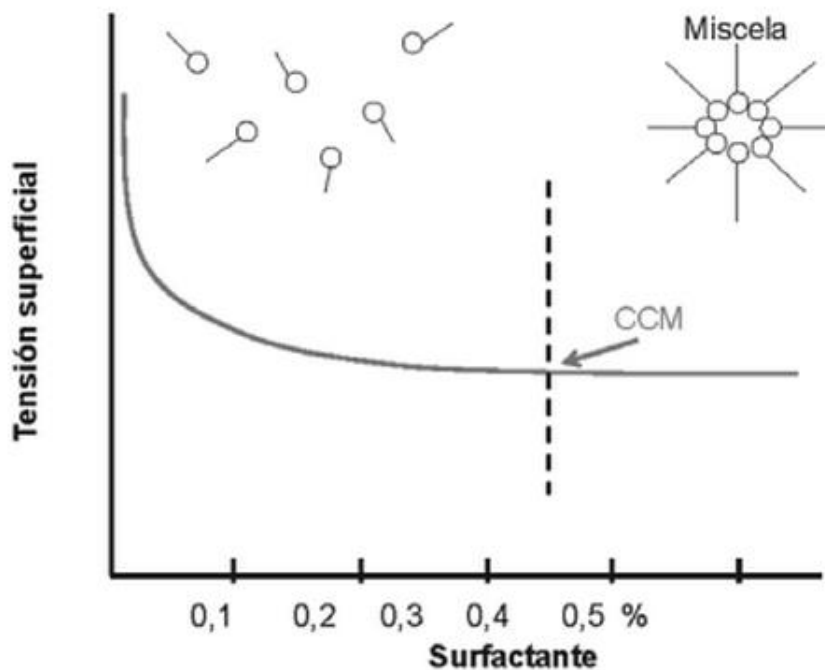


Figura 2. Concentración Micelar Crítica y formación de micelas

Las micelas son entidades frágiles formadas por la agregación no covalente de monómeros de surfactantes y pueden ser esféricas, cilíndricas o panares (discos o bicapas) (Figura 3).



Figura 3. Representación esquemática de los tres más comunes formas geométricas de micelas formadas por los surfactantes en soluciones acuosas.

El tamaño y forma de las micelas puede ser determinado por cambios en la estructura química del surfactantes que incluyen concentración, temperatura, pH, fuerza iónica, composición del surfactante (mezclas de surfactantes) (Rangel-Yagui et al., 2004). El crecimiento micelar se controla principalmente como se mencionó anteriormente por las cabezas de surfactante, ya que el crecimiento unidimensional y bidimensional requiere llevar las cabezas de surfactante lo más cerca del uno al otro con la finalidad de reducir, el área disponible por molécula surfactante en la superficie de la micela, y por lo tanto la curvatura de la superficie micelar (Rangel-Yagui et al., 2005).

Debido a esta propiedad, las moléculas de los surfactantes se ubican en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Jimenez-Islas et al., 2010). Por ello, presentan propiedades tales como la formación de emulsiones, detergencia, espumantes, dispersador y solubilización de fases (Rosen, 2004). Estas propiedades permiten que los surfactantes sean empleados en una amplia gama de aplicaciones en la industria de productos de limpieza, petroquímica, cosmetológica y productos de higiene. En donde el consumo mundial de surfactantes excede los 13 millones de toneladas métricas siendo la mayoría usada como materia prima para la fabricación de detergentes de uso doméstico en Europa y los Estados Unidos de Norteamérica (Figuras 4 y 5) como los principales consumidores (Zoller y Sosis, 2008). El consumo mundial de surfactantes fue valorado cerca de los 20 billones de dólares en el 2006 y se espera que el crecimiento anual sea alrededor del 3% (Janshekar et al., 2006). No obstante, aun cuando se estima que para el 2010 la producción de surfactantes esté alrededor de los 14.3 millones de toneladas, siendo Asia y América Latina, los mercados con más alto crecimiento (goliath.ecnext.com, 2003). Los resultados en el 2012, indican que las mayores áreas de consumo son Europa (31 % del consumo total), seguido de los Estados Unidos y Canadá (28 %) y China (17%). En el Caso de América Latina, Argentina y Brasil son los que muestran un mayor crecimiento. Se estima que la producción se incremente en una media de 2.6% durante el periodo 2012-2017 (<https://www.ihs.com/products/chemical-surfactants-scup.html>, 2013).

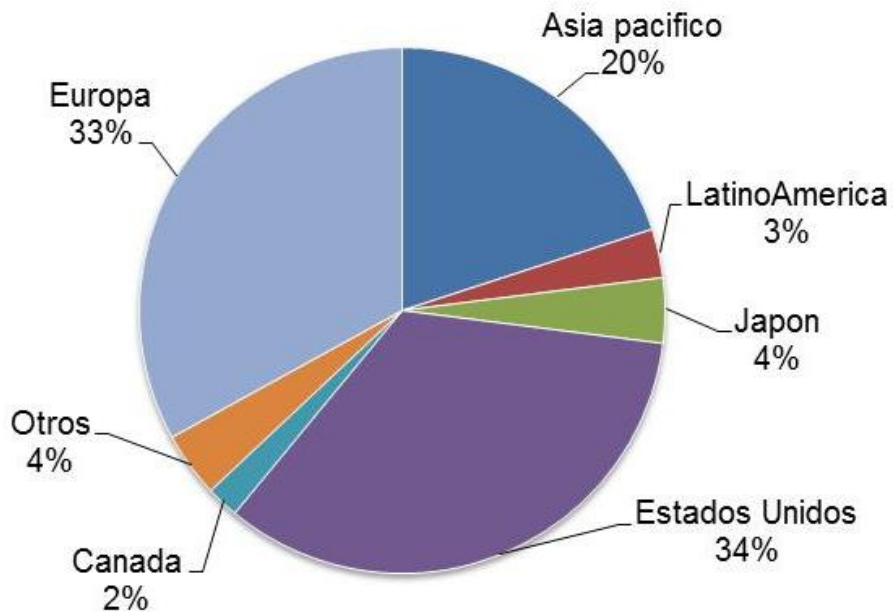


Figura 4. Porcentaje estimado de venta anual de surfactantes por regiones (modificado de Zoller y Sosis, 2008).

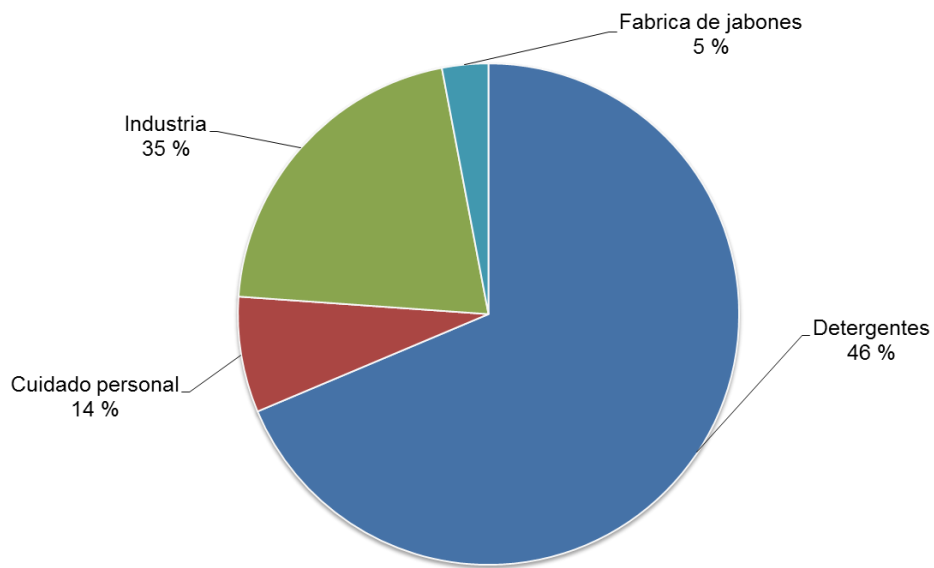


Figura 5. Porcentaje de consumo global de surfactantes por área de aplicación (modificado de Zoller y Sosis, 2008).

2.1.2. Aplicaciones de los surfactantes

Resultado de las propiedades físico-químicas de los surfactantes estos pueden ser empleados en diversas áreas.

1) área médica. Los surfactantes en el área médica, son usados en soluciones limpiadoras de lentes de contacto debido a su acción detergente. En el desarrollo de productos comerciales (ej. Cerumenex o Debrox) como agentes removedores de cerumen, debió a la actividad cerumenolítica de algunos surfactantes como tri-etanolamina-polipeptido-oleato condensado (Li et al.,2009).

También, son usados coadyudantes en el suministro de drogas, debido al efecto de estos en la absorción de ciertos fármacos a nivel del tracto digestivo. Algunos surfactantes monómeros pueden afectar la integridad de la membrana y favorecer el ingreso de drogas a través de la barrera gastrointestinal (Chokshi et al.,2009).

Además, se ha observado que el uso de surfactantes iónicos también incrementa la permeabilidad de la piel, lo cual favorece el transporte de ciertos tipos de drogas de aplicación cutánea. Otras aplicaciones son el uso de preparaciones de surfactantes como terapia de remplazo para el tratamiento de infantes prematuros con síndrome de síndrome de diestres (enfermedad de la membrana hialina). En donde preparaciones del surfactante se utiliza en combinación con el oxígeno y ventilación mecánica para facilitar el intercambio de gases (Logan et al., 2009).

2) cosmetología. Diversos cosméticos están formulados a partir de surfactantes, en donde pueden actuar como solubilizantes de los principios activos o como detergentes. El uso de surfactantes poliméricos en la estabilización de cosméticos dependerá de su absorción y conformación en las interfaces solido/liquida y liquida/liquida de los ingredientes (Kumar y Tyagi , 2014).En el caso de productos emulsionados (ej. Leche o crema), pueden actuar como emulsificantes. En el caso del desarrollo de cosméticos basada en liposomas y microemulsiones, los surfactantes actúan como estabilizantes y mejora su aplicación (Prieto-Blanco et al., 2007).

3). Inhibidores de corrosión. El uso de surfactantes representa una herramienta importante como inhibidor de corrosión en metales ya que presentan alta eficiencia, bajo precio, baja toxicidad y fácil producción (Caroline et al., 2008; Kumar, 2008). De manera general, la inhibición de la corrosión del metal por el surfactante es el resultado de la adsorción de moléculas orgánicas o iones a la superficie del metal formando una capa protectora, la cual, reduce o evita la corrosión del metal (Hany et al., 2013). En donde el grupo funcional del surfactante es absorbido en la superficie del metal, lo cual es un factor crítico para la inhibición de la corrosión. La habilidad de una molécula de surfactante a ser absorbida es relacionada a su habilidad de agregarse para formar micelas (Atkin et al., 2003). La mayoría de los surfactantes inhibidores de ácidos son compuestos orgánicos que contienen átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno (Branzoi et al., 2000).

4) Alimentaria

Los surfactantes presentan numerosas aplicaciones en el área agroalimentaria, su uso en alimentos inicia en 1930 cuando algunas grasas como los mono y diacilgliceridos son incorporados en la industria de la margarina. Sin embargo, el mayor avance fue en 1960 cuando se incorpora a la industria de la panificación, el invento de Chorleywood Bread Process (CBP) publicado en 1961 en Inglaterra (Cauvain, 2003). Esta invención involucraba la adición de surfactantes y una mezcla de la masa a alta velocidad redujeron el tiempo de fermentación de la harina de bajo nivel proteico. La acción de los surfactantes en estas harinas es que afectaba, la estabilidad de los sistemas coloidales y pueden interactuar con todos los componentes principales de la harina (almidón, gluten y lípidos). Los surfactantes también, pueden actuar como lubricantes, emulsificantes, mejorar ciertas cualidades del producto final (vida de anaquel más larga, modificar la cristalización y retener humedad), que permite extender la vida útil del producto (Hasenhuettl et al., 2008). Los principios de la CBP fueron adoptadas en muchos países de todo el mundo y todavía se utilizan para este día en particular en el Reino Unido, Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda y la India. En los EE.UU., Europa Central, del Norte y del Sur Asia Oriental el contenido de proteínas del trigo es alto por lo que el CBP no era adaptable. Sin embargo; es una tendencia que ganado difusión en industria de la panificación debido a que acorta los tiempos de procesamiento y se pueden aplicar ingredientes funcionales (Cauvain, 2003).

Actualmente, la producción de surfactante alimentos en todo el mundo ha llegado a aproximadamente 500 mil toneladas en donde existen alrededor de 20 tipos diferentes, con un crecimiento anual del 3% en el 2008 (Hasenhuettl et al., 2008; Csaki, 2011). Los surfactantes más importantes que se utilizan en la industria alimentaria son: 1) mono- y diglicéridos de ácidos grasos con aplicación en la industria de la panadería; 2) esteres de ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, usados en panadería y productos lácteos; 3) stearoil- 2- lactilato de sodio y stearoil- 2- lactilato de calcio aplicados en los procesos de panificación y en los cereales de desayuno, galletas, galletas, cereales y snacks a base de papa y arroz de cocción rápida; 4) esteres de sacarosa de ácidos grasos, surfactantes no iónicos se utilizan en los panes (0,2% de la harina), alimentos infantiles(120 mg / L) , productos lácteos (Hasenhuettl et al., 2008; Csaki, 2011). Su uso en Europa se emplea únicamente en pasteles y galletas para mejorar la textura y vida útil., emulsión. Esa es la razón por la cual se utilizan ésteres de sacarosa en los productos especiales fórmula para bebés hechas para lactantes alérgicos (Rangan y Barceloux, 2009); 5) esteres de ácidos grasos de poliglicerol, se aplican en la elaboración de margarinas bajas en grasas, pastas, cremas de mantequilla y cereales para el desayuno; 6) esteres de sorbitán de ácidos grasos y sus derivados etoxilados polisorbatos, se usan comúnmente en la industria alimentaria. Son excelentes emulsionantes, agentes y lubricantes en pasteles, aderezos, galletas dulces y saladas de aireación; 7) Mezclas de surfactantes, utilizados en la preparación de alimentos, especialmente para productos horneados (Whitehurst, 2004).

2.1.3 Clasificación de los surfactantes

Los surfactantes poseen una constitución molecular típica, esencialmente lineal y asimétrica, con dos zonas, una hidrófoba y otra hidrófila (Figura 1). Donde, el resto hidrófilo, determinante de la solubilidad en agua, puede ser un grupo polar de carácter ácido (ej. grupos sulfato, sulfonato, carboxilato), de carácter básico (ej. amina, sal de amonio cuaternario o ion piridinio), o puede ser un grupo polar no iónico (Solé-Cabanes, 2014). Mientras que la parte hidrófoba es una cadena alifática, lineal o ramificada, conteniendo en general entre 10 y 18 carbonos (Azarmi y Ashjara 2015). Por lo que dependiendo de la naturaleza del grupo polar, los surfactantes pueden ser clasificados dentro de cuatro grupos (Figura 6): catiónicos, aniónicos, anfotericos (zwiterionicos) y no iónicos (Vieira et al., 2008).

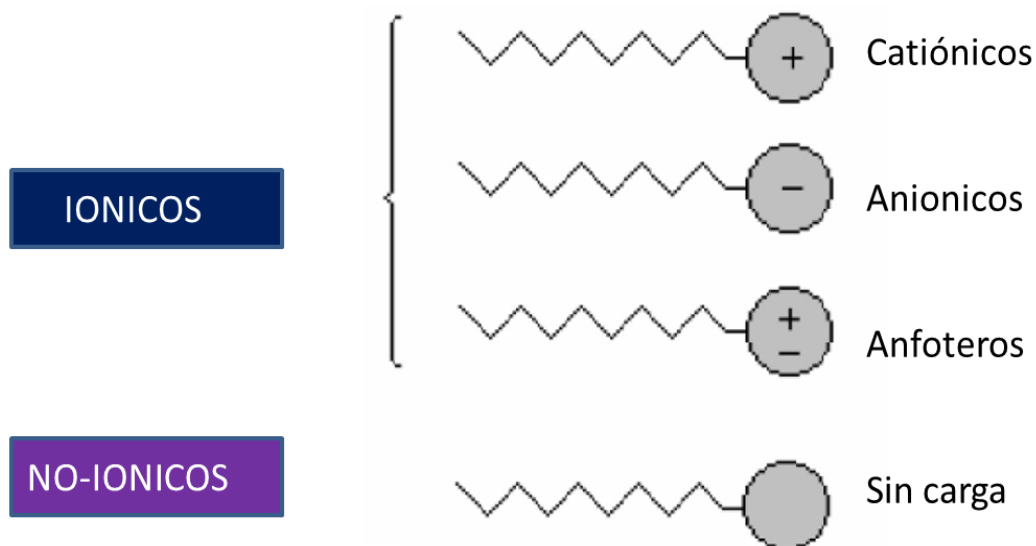


Figura 6. Representación esquemática de los surfactantes (Silva,2008)

Donde los surfactantes catiónicos presentan una carga positiva en su cabeza polar, mientras los surfactantes anionicos tienen una carga negativa en su grupo polar (Hait y Moulik, 2002). En contraste, los surfactantes zwiterionicos (anfotericos) tienen el potencial de presentar ambas cargas negativa o positiva, dependiendo del ambiente en cuales se encuentren contenidos. En el caso de los surfactantes no-ionicos, se caracterizan por no tener cargas en su grupo principal (cabeza del surfactante) (Sivaramakrishnan, 2013).

A continuación se mencionan algunas características de los diferentes tipos de surfactantes:

a) Surfactantes aniónicos: estos se caracterizan por tener un grupo hidrófilo cargado negativamente. Suelen distinguirse las siguientes familias: alquilbenceno sulfonatos, alquil sulfatos, alquil o lauril éter sulfatos, alquil sulfonatos, α -sulfonatos de ácidos grasos, mono y di-alquil sulfosuccinatos y sulfonatos derivados del petróleo. Se caracterizan por ser buenos detergentes, espumantes y su uso puede ser irritante para la piel (Badía-Vila y Garcia-Miranda, 2013). Los más comunes son el sulfonato de alquil benceno (ABS), sulfonato de alquilo lineal (LAS) y sodio tripolifosfato (TPP), que se diferencian por su configuración molecular, biodegradabilidad y toxicidad (Forero et al., 2005). El ABS posee una estructura molecular ramificada y es poco biodegradable; LAS posee estructura lineal, es mayormente biodegradable pero mucho más tóxico. El TPP, además de ser insumo para la producción de detergentes y jabones, es empleado para dulcificar

aguas dura, en metalurgia, explotación minera, producción de papel y tratamiento de agua (Carvajal-Muñoz, 2011).

b) Surfactantes catiónicos: suelen agruparse en ácidos grasos de amida, amidoaminas, imidazolinas, derivados del petróleo, nitrilos cíclicos alifáticos, aromáticos, compuestos no nitrogenados, poliméricos catiónicos y óxidos de amina. Los surfactantes catiónicos más conocidos son las sales de amonio cuaternario. Son sustancias que presentan buenas propiedades desinfectantes son eficaces contra bacterias gram-positivas (Doménech-Zaera y Calvo-Fernández, 2002). Son de poca utilidad en procesos de limpieza, porque la mayoría de las superficies tienen carga negativa y los cationes se retienen sobre ellas en lugar de solubilizar la suciedad adherida (Armada-Domínguez y Ros-Oliver, 2010). Aunque son compatibles con el cabello debido a la afinidad con la queratina por la presencia de cargas positivas, por lo que pueden actuar como emolientes o suavizantes; aunque pueden ser irritantes sobre la conjuntiva ocular y tener una capacidad espumante limitada. (Badía-Vila y Garcia-Miranda, 2013).

c) Surfactantes no iónicos: se caracterizan por ser compuestos que no se disocian en disolución acuosa. Su solubilidad se debe a la presencia de grupos funcionales (ej. grupos hidroxilo), que pueden formar puentes de hidrogeno con las moléculas de agua. En este grupo podemos mencionar a los alcoholes grasos, etoxilados, aquil poliglucosidos.

Los etoxilados de alcoholes grasos o alcoholes grasos etoxilados y los alcoholes etoxilados lineales se biodegradan rápidamente, y tienen propiedades de detergencia, especialmente para eliminar la grasa de las fibras sintéticas (Badía-Vila y Garcia-Miranda, 2013). Además los surfactantes no-iónicos, como los esteres de ácidos grasos con polioxietileno sorbitan, son la clase principal de surfactantes usados en la industria farmacéutica debido a su compatibilidad, estabilidad y toxicidad (Gennaro, 2003).

d) Surfactantes anfotericos: se distinguen por que su función varía de acuerdo al pH, a valores de 4 o menos actúan como surfactantes catiónicos, a pH entre 4 y 9 puede actuar como surfactantes no ionicos y cuando existen valores arriba de 9 y 10, asumen características de surfactantes anionicos (Silva, 2008). El principal grupo de moléculas de esta categoría está compuesto por aquellas que contienen grupos carboxilato o fosfato como anión y grupos amino o de amonio cuaternario como catión. El primer grupo está representado por varios polipéptidos, proteínas y las alquibetalinas, en tanto que el segundo consiste en fosfolípidos como las lecitinas y las cefalinas (Gennaro, 2003).

2.1.4. Nuevos tipos de surfactantes

Debido a la necesidad de formular surfactantes que cumplan con las regulaciones gubernamentales cada vez más restrictivas sobre los compuestos orgánicos volátiles (COV). Además, que permitan mejorar la seguridad del trabajador y reducir al mínimo los costes de eliminación de residuos (Sivaramakrishnan, 2013).

Se han desarrollado surfactantes con base en las siguientes composiciones químicas: 1) surfactantes basados en ésteres de ácidos grasos derivados de azúcar; 2) surfactantes basados en sacáridos; 3) surfactantes basados en aminoácidos ; 4) a partir de microorganismos; 5) surfactantes esterquats y “gemini” (diméricos); 6) surfactantes poliméricos y silicona; y 7) fluorosurfactantes.

Los surfactantes de nueva generación se caracterizan por ser biodegradables y biocompatibles, y cumplir con los principios de la química verde (Zielińska et al., 2008). En este caso los surfactantes sacáridos pueden ser total o parcialmente, derivados de recursos renovables, y estos materiales son actualmente de interés por parte de ambos puntos de vista académicos y comerciales. Estos compuestos tienen una gran importancia en el desarrollo de detergentes, materiales biológicos nanoestructurados, nuevas formas de cosméticos, o sistemas de administración de fármacos (Zhi et al., 2014). En particular, los surfactantes glucocationicos muestran propiedades únicas, tales como la toxicidad más baja, mayor biodegradabilidad y compatibilidad medioambiental con respecto a los surfactantes convencionales.

En el caso de los surfactantes basados en aminoácidos, se puede mencionar que el desarrollo de surfactantes a partir de materias primas renovables que imitan a los lipoaminoácidos naturales es una de las opciones preferidas en la industria de los alimentos, productos farmacéuticos y aplicaciones cosméticas (Infante et al., 2004). Dada su estructura natural y simple que muestran una baja toxicidad y rápida biodegradación y actividad antiviral (Brito et al., 2009).

La combinación de ácidos polares aminoácidos / péptidos (parte hidrófila) y los compuestos de cadena larga no polares (parte hidrófoba) para la construcción de la estructura anfifílica ha producido moléculas con alta actividad superficial. Donde la arquitectura de base de aminoácidos permite la construcción de estructuras múltiples para las moléculas del surfactante, ya que las cadenas de alquilo pueden ser incorporados en el amino o en el grupo carboxílico, o incluso al final de la cadena lateral de aminoácidos (Brito et al., 2011).

Los surfactantes “gemini” catiónicos son una clase importante de compuestos de superficie activa que presentan una mayor actividad superficial con respecto a sus homólogos monoméricos. Este tipo de compuesto permite que se absorba fácilmente en las interfaces e interactúe con las membranas celulares de los microorganismos (Łuczyński et al., 2013). Por su parte, los esterquats, son compuestos de amonio cuaternario que tienen dos largas (C16-C18) cadenas de ácidos grasos con 2 enlaces éster débiles (El Achouri et al., 2013). Representan una nueva generación de agentes suavizantes de tejidos, ya que han reemplazado a las sales de dialquildimetilamonio. La inclusión de enlaces éster en las cadenas alifáticas ha mejorado significativamente la cinética de biodegradación de los tensioactivos catiónicos, y la reducción de los niveles de exposición ambiental (Mishra y Tyagi, 2007). Los surfactantes poliméricos son materiales esenciales para la preparación de muchos sistemas dispersos, como: colorantes, recubrimientos de papel, tintas, productos agroquímicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, cerámica y detergentes (Tadros, 2005).

Una de las aplicaciones más importantes de surfactantes poliméricos es en la preparación de emulsiones aceite-en-agua (O/W) y agua-en-aceite (W/O), así como dispersiones líquidas / sólidas (Tadros, 2009). En este caso, la porción hidrófoba de la molécula de surfactante debe adsorber "fuertemente" en el O/W o se disuelve en la fase oleosa, dejando a los componentes hidrófilos en el medio acuoso, con lo que son fuertemente solvatados por las moléculas de agua (Tadros, 2003).

Los surfactantes de silicona son un grupo de pequeñas moléculas y surfactantes poliméricos que tienen una amplia variedad de aplicaciones debido a sus propiedades inusuales (Somasundaran et al., 2006). Se componen de un grupo hidrófobo permetilado de siloxano (polidimetilsiloxano, PDMS) acoplado a uno o más grupos polares. Muchos tipos de grupos polares se han descrito, pero los grupos no iónicos basados en polioxietileno (PEO) y polioxipropileno (PPO) son más comunes (Song et al., 2014).

Algunas de sus aplicaciones son en la fabricación de espumas de plástico, como agentes humectantes, materiales nanoestructurados y en productos de cuidado personal. La formación de espuma, humectación, emulsificación, y el comportamiento de fase son propiedades básicas relevantes para estas aplicaciones (Hill, 1999).

Por otra parte, el uso de surfactantes fluorados es relativamente nuevo que crecido de manera constante debido a características como: (i) excepcional naturaleza hidrofóbica y oleofóbica de grupos éter de perfluoroalquilo y perfluoroalquilo, (ii) eficacia de los fluorados en concentraciones extremadamente bajas, y (iii) la disponibilidad de surfactantes fluorados aniónicos, catiónicos, no iónicos, y anfóteros que pueden modificar las superficies e interfaces mejor que los surfactantes hidrocarbonados convencionales (Murphy y Hewat, 2008).

Tienen una variedad de opciones de fluorosurfactantes que son compatibles con casi cualquier formulación que incluya emulsiones agua-aceite, aceite-en-agua, detergentes, espumas, etc. La fuerza de unión del enlace carbono-flúor en los grupos éter de perfluoroalquilo y perfluoroalquilo, le proporciona una notable estabilidad a los compuestos fluorados y fluoropolímeros (Haniff et al., 2003).

Los surfactantes fluorados disponibles comercialmente proporcionar una humectación excepcional, nivelación, emulsionante, formación de espuma, o características de repelencia que tiene una amplia gama de aplicación industrial (Riess y Greiner ,2000).

2.2 Definición y clasificación de los biosurfactantes

Los biosurfactantes son grupos estructural y químicamente, parecidos a los surfactantes sintéticos (Banat et al. 2000); son compuestos anfipáticos que tienden a disminuir la tensión superficial e interfacial de soluciones, tienen como propiedad también formar emulsiones (Karanth, 1999); son derivados de una amplia variedad de bacterias, hongos y levaduras, que bien se adhieren a la superficie celular o son secretadas extracelularmente en el medio de crecimiento, (Sahoo et al., 2011). Los biosurfactantes pueden ser principalmente clasificados en dos clases: 1) agentes tensioactivos o biosurfactantes de bajo peso molecular llamados biotensioactivos (lipopeptídicos, glicolípidos) y 2) bioemulsionantes, (agentes activos con alto peso molecular superficial).

Adicionalmente, los biosurfactantes se pueden dividir en seis clases en base a su estructura química: compuestos hidroxilados y unidos a ácidos grasos (ácidos micólicos), glicolípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas-lipopéptidos, fosfolípidos y compuestos de la superficie de la célula completa en sí. Por otra parte Fakruddin (2012), propone una clasificación en donde considera la estructura química y el origen microbiano del biosurfactante. De tal forma que los clasifica en glicolípidos, fosfolípidos, biosurfactantes poliméricos y lipopéptidos (surfactina) (Figura 7). Siendo los glicolípidos como los ramnolípidos, soforolípidos y tehalípidos los más conocidos (Tabla 1).

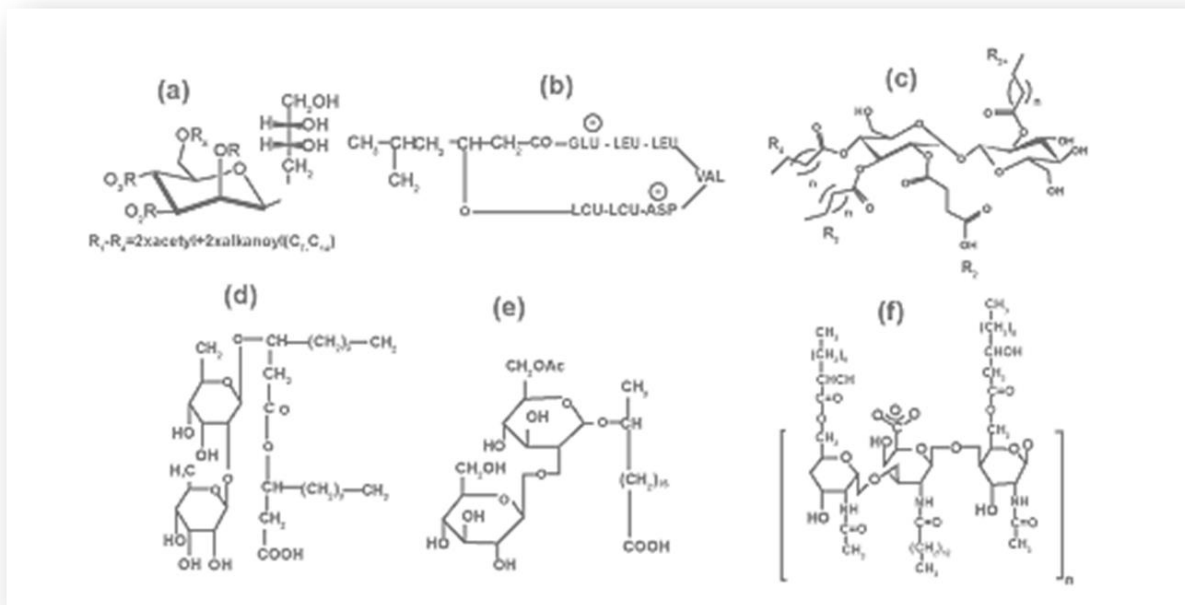


Figura 7. Estructura química de biosurfactantes más comunes: (a) lípido manosileritritol (b) surfactina (c) lípido de trealosa (d) sofrolípidos (e) ramfolípidos (f) emulsan.

Aunque Mulligan et al. (2001) y Xu et al. (2011), los agrupan en tres categorías en base a su origen: a) derivados de animales: los surfactantes de origen animal incluyen a la lecitina, gelatina, caseína, colesterol por citar algunos, los cuales presentan diversos usos debido a su composición química; b) derivados de plantas: estos incluyen a saponinas que presentan propiedades emulsificantes, anti espumantes, actividad anti microbiana e insecticida, lo cual hace que se emplee en bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos.

Tabla 1. Microorganismos productores de biosurfactantes

Microorganismo	Tipo de biosurfactante
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Lipopeptido
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	Lipopeptido
<i>Bacillus subtilis</i> strain ZW-3	Lipopeptido
<i>Bacillus velezensis</i> H3	Lipopeptido
<i>Burkholderia plantari</i> DSM 9509	Ramnolípido
<i>Calyptogena soyoae</i>	Manosileritritol lípido
<i>Candida bombicola</i>	Soforolípidos
<i>Micrococcus luteus</i> BN58	Trehalosa tetraester
<i>Nocardiopsis alba</i> MSA10	Lipopeptido
<i>Nocardiopsis lucentensis</i> MSA04	Glucolípido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS20	Ramnolípido
<i>P. alcaligenes</i>	Ramnolípido
<i>P. fluorescens</i> BD5	Lipopeptido
<i>Plibanensis</i> M9-3	Lipopeptido
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Ramnolípido
<i>Pseudozyma graminicola</i> CBS 10092	Manosileritritol lípido
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Glucolípido
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	Manosileritritol lípido
<i>Pseudozyma siamensis</i> CBS 9980	Manosileritritol lípido
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Glucolípido y trehalípido
<i>Rhodococcus</i> sp. TW53	Lipopeptido

Fuente Yañez-Ocampo y Wong-Villarreal, 2013

Otro producto con gran potencial es la lecitina y proteína de soya que es usada como antioxidante, emulsificante, y suplemento nutricional; y c) procedentes de microorganismos: el interés en los biosurfactantes de origen microbiano es debido a su amplia diversidad en estructura y funciones que aunado a su bajo costo de producción comparado con los de origen animal y vegetal, los hace económicamente viables.

No obstante, requerimiento de cepas eficientes, baja producción y pureza de los productos obtenidos que son necesarios en la industria alimentaria, cosmetológica y farmacéutica han contribuido a una baja aceptación del público consumidor, lo cual disminuye su producción a nivel comercial. Sin embargo; Nitschke y Costa (2007), indican que las propiedades de alta actividad superficial, baja toxicidad, actividad antimicrobiana, habilidad emulsificante y la tolerancia a un amplio rango de pH, hacen que los biosurfactantes de origen microbiano puedan llegar a tener un importante papel en la generación o formulación de nuevos productos en la industria de alimentos. En este sentido, Ilori et al. (2005), menciona que existen diversos factores que deben ser considerados para mantener una buena calidad del producto adicional a la cepa que se emplee.

Estos factores incluyen las condiciones del cultivo como es la fuentes de carbono y nitrógeno, relación C:N; parámetros físicos y químicos como: aireación, pH y temperatura que tendrán un efecto en la cantidad, calidad y tipo del biosurfactante producido.

2.2.1. Aplicaciones de los biosurfactantes

Entre las principales funciones de los biosurfactantes se incluye la solubilización, emulsificación, dispersión, capacidad detergente, así como antimicrobiano en ciertos casos. En cuanto a su aplicación en la industria los biosurfactantes han sido usados solos o en combinación con surfactantes sintéticos. Su amplia aplicación en la industria alimentaria se debe a sus propiedades emulsificantes, antiespumantes, estabilizadoras, antioxidantes y anti adhesivas.

No obstante, son las áreas agrícolas y ambientales en donde mayor aplicación ha tenido, esto debido a que desempeñan importantes funciones en la remediación de suelos, recuperación de aceites, y eliminación de agentes patógenos. Adicionalmente, también tiene aplicaciones en la industria de cosméticos, farmacéutica, pintura y detergente pero en menor proporción (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicación de biosurfactantes en diferentes industrias (modificado de Yañez-Ocampo y Wong-Villareal, 2013).

Tipo de Industria	Aplicación del Biosurfactante
Petrolera	Recuperación de petróleo, reducción de la viscosidad del aceite y tensión superficial.
Minera	Agente espumante, secuestrante y flotante de metales.
Agrícola	Biocontrol de hongos y bacterias
Farmacéutica	Desarrollo de agentes antimicrobianos
Alimenticia	Ingrediente funcional, emulsificante, espesante y lubricante.
Cosmética	Agentes humectantes, agente antimicrobianos y emulsificantes

2.2.2. Microorganismos productores de biosurfactante

Existe una gran diversidad de diferentes microorganismos acuáticos y terrestres con la capacidad de producción de biosurfactantes. En el caso de microorganismos acuáticos Maneerat (2005) menciona que existe una amplia

diversidad de microorganismos que pueden producir distintos tipos de biosurfactantes (Tabla 3).

En donde estos microorganismos muestran una capacidad de ser usados en procesos de biorremediación de hidrocarburos. No obstante la generación de metabolitos secundarios al usar estos microorganismos, limita su aplicación. Por lo que la búsqueda de microorganismos marinos que no produzcan efectos adversos representa una línea de investigación en pleno desarrollo, considerando que un bajo porcentaje de estos pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Harayama et al.,2004)

Tabla 3. Microorganismos marinos y biosurfactantes producidos

Microorganismo	Biosurfactante	Referencia
Myroides sp. SM1	Lipoproteínas, lípidos ornitina	Maneerat et al. (2006)
Anatartobacter	Glicoproteínas con ácido urónico	Gutierrez et al. (2007)
Streptomyces	Bioemulsificantes: proteína, azúcar y polisacárido (82:1:17)	Kokare et al. (2007)
A.calcoeticusBD4	Emulsan BD4:emulsificante	Kaplan et al.(1987)
Pseudomonas nautica	Proteínas, carbohidratos y lípidos (35:63:2)	Husain et al. (1997)
Yarrowia lipolytica	Bioemulsificante: lípido-carbohidrato y proteína	Zinjarde y Pant (2002)

Por otra parte en el caso de microorganismos del suelo, existen diversos estudios que indican su aislamiento y evaluación de su potencial de producción de biosurfactanes para diferentes aplicaciones en la industria (Bento et al., 2005).

Aun cuando existe una amplia diversidad de microorganismos del suelo con la capacidad de producción de biosurfactantes (Tabla 4). Existen ciertas especies en donde que destacan por sus propiedades o importancia en el área de salud. Entre estos microorganismos destacan, *Pseudomonas aeruginosa*, en donde la producción de ramnolipidos tiene un función en su patogénesis, lo cual tiene una importancia clínica (Singh et al., 2000). No obstante estudios recientes en este microorganismo se ha observado la producción de otros biosurfactantes que muestran propiedades biosurfactantes que pueden ser usadas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Thavasi et al., 2011).

Tabla 4. Microorganismos del suelo y uso del biosurfactante

Microorganismo	Aplicación del Biosurfactante	Referencia
<i>Bacillus sp</i> <i>Acenitobacter sp</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Bioremediación de suelos	Menezes et al. (2005)
<i>Sataphylococcus sp.</i>	Bioemediación de suelos	Eddouaouada et al. (2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Biocontrol de hongos por Iturina A, fengycina y surfactina	Kim et al. (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Estabilizadores en la producción de nanopaticulas	Farias et al. (2014)
<i>Bacillus natto TK-1</i>	Lipopeptido con propiedades antimicrobianas, tumorales y anti-	Cao et al. (2009)

Por otra parte existen otros genero de microorganismo como Bacillus, el cual ha sido ampliamente estudiado debido a las propiedades de sus biosurfactantes, los cuales pueden tener propiedades antimicrobianas, antitumorales y anti-adhesivas (Cao et al., 2009). No obstante; es la aplicación directa en procesos de bioremediación en donde más se ha aplicado. Esto debido a que en los procesos de bioremediación se requiere al organismo vivo, el cual se aplica directamente al suelo junto con una base inicial de nutrientes (Al Wahaibi et al., 2014). Diversas especies de Bacillus han sido aisladas de diversas fuentes ya sea de suelos o ambientes contaminados con hidrocarburos o bien de la rizosfera o filosfera de plantas (Khyati et al., 2014;Gudiña et al., 2015). La importancia de este género radica en la producción de biosurfactantes con una alta actividad antimicrobiana. Estudios recientes indican que los lipopetidos producidos por B. subtilis (surfactina, fengicina e iturina) pueden tener un efecto frente diferentes tipos de hongos y bacterias gram negativa, principalmente (Liu et al., 2015). Lo anterior establece las bases para poder usarlo en el área de alimentos fermentados como un agente anti fúngico, alterno al uso de compuestos químicos (Jshi et al.,2008). Adicionalmente, los biosurfactantes pueden inhibir la producción de biopelículas y reducir la adhesión en combinación con aquellos biosurfactantes que producen antibióticos; lo cual puede ser una alternativa para controlar la adherencia de microorganismos como Salmonella y *Listeria cytogenes* en los alimentos (Thaniyavarn et al.,2003;Nitschke y Csta, 2007).

2.2.3. Producción de biosurfactantes

El poder optimizar y producir biosurfactantes de estos microorganismos ha sido una línea ampliamente estudiada (Guerra-santos et al.,1986). Ya que a diferencia al área de biorremediación en la industria de los alimentos se requiere del biosurfactante en grandes cantidades para poder purificarlo y aplicarlo a los procesos industriales. Esto implica estudios sobre la interacción de nutrientes y fuentes de carbono, con la finalidad de incrementar una mayor producción del biosurfactante (Amézcu-Vega et al.,2004). Aspectos físico-químicos del proceso de fermentación como aireación, agitación, pH y temperatura son factores a considerar en la producción de biosurfactantes. En este sentido, Khopade, et al. (2012) menciona que los biosurfactantes que presentan una alta estabilidad a diferentes temperaturas, pH, concentraciones de sales, son los que presentan un mayor potencial de ser usados en la industria de alimentos, farceutica y cosmetológica. Por otra parte la evaluación de distintos sistemas de fermentación en la producción del biosurfactante, es un aspecto que también ha sido abordado. En este sentido, Das y Mukherjee (2007), estudiaron dos sistemas de fermentación sólida y sumergida, con fuentes de carbono de bajo costo, sobre la producción de lipopetidos en *B. subtilis*. Logrando optimizar un sistema de bajo costo en la producción del biosurfactante.

Por su parte Rodrigues et al. (2006), propone el uso de subproductos agrícolas, en el establecimiento de procesos fermentativos de bajo costo en bacterias probióticas como *Lactococcus lactis* 53 y *Streptococcus thermophilus*. Contribuyendo a generar alternativos procesos fermentativos para la producción de biosurfactantes económicamente viable.

2.2.4. Microorganismos productores de biosurfactantes en México

En México, el estudio de microorganismos con propiedades biosurfactantes se ha enfocado principalmente al aislamiento de bacterias de zonas mineras para su aplicación en procesos de bioremediación (Toribio-Jimenez et al.,2014). En la identificación de los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* cepa 123, como un mecanismo de patogenicidad en plantas de interés agrícola (Hernandez-Anguiano et al.,2004). Aislamiento de microorganismos marinos como cianobacterias y diatomeas para la identificación de nuevos biosurfactantes y su posible aplicación en la industria alimenticia (Paniagua-Michel et al.,2014). En el uso in situ de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas putida* CB-100, en procesos de bioaumentación y bioestimulación para remover hidrocarburos presentes en suelos (Martinez-toledo y Rodriguez-Vázquez, 2013).

No obstante estudios realizados en zonas semiáridas son recientes, en este sentido Toribio et al (2011), reporta el aislamiento de un nuevo tipo de

biosurfactante con actividad antimicrobiana de *Pseudomonas korrensis* endémica de cuatro cienegas, Coahuila.

En el caso de la región Noroeste, específicamente en la región del valle de Mexicali, Baja California, los estudios se han encaminado al aislamiento de microorganismos en donde se exploran su importancia en el control de patógenos, acuacultura y su relación benéfica con plantas (Olmos y Paniagua-Michel, 2014; Moreno-Ramírez et al., 2015). Sin embargo; el aislamiento e identificación de microorganismos productores de biosurfactantes asociados a plantas nativas en el valle de Mexicali, ha sido escasamente estudiado.

Por tal motivo en el presente estudio se aisló e identificó a partir de plantas nativas del valle de Mexicali, microorganismos con la capacidad de biosintetizar biosurfactantes. Lo cual podría contribuir en el desarrollo de herramientas biotecnológicas que apoyarían el uso de biosurfactantes de microorganismos nativos en áreas de producción de alimentos.

2.3. HIPOTESIS

Los microorganismos asociados a la rizosfera presente en plantas nativas del valle de Mexicali, tienen la capacidad metabólica de biosintetizar biosurfactantes con propiedades antimicrobianas que pueden ser aplicados en el sector alimentario.

2.3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar a nivel bioquímico y molecular la producción de biosurfactantes de microorganismos nativos presentes en la rizosfera de plantas de salicornia, cachanilla y algodón, que forman parte de la flora nativa del valle de Mexicali.

2.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Aislar e identificar los microorganismos con propiedades de biosurfactantes usando pruebas moleculares
- ✓ Evaluar la capacidad de producción de biosurfactantes y propiedades antimicrobianas de las cepas identificadas en la rizosfera de plantas de Cachanilla, Salicornia y Algodón.
- ✓ Extraer y purificar el biosurfactante de las cepas identificadas en la rizosfera de plantas de Cachanilla, Salicornia y Algodón, para identificación de su estructura usando espectroscopia infrarroja.

CAPITULO 3
METODOLOGIA

3. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Ingeniería y en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Para comprobar las hipótesis planteadas para este proyecto, se procedió a coleccionar muestras de suelos de rizosferas de plantas nativas de suelos del valle de Mexicali; cachanilla, salicornia así como un cultivo tradicional de la región, algodón.

3.1 Selección del sitio de muestreo

Para el aislamiento de microorganismos provenientes de la rizosfera, se procedió a realizar la selección de los sitios de muestreo en el valle de Mexicali, B.C., considerando diferentes tipos de agroecosistemas, mediante un geoposicionador satelital (Tabla 5). Una vez seleccionado los sitios de muestreo se procedió a coleccionar suelo rizosférico de cada una de las plantas seleccionadas, de acuerdo a la metodología propuesta por Martínez (1998).

Tabla 5. La ubicación de los sitios de muestreo se presenta en la siguiente tabla.

CULTIVO	LATITUD	LONGITUD
Salicornia (<i>Salicornia bigeloviis</i>)	32°24'30.359"N	115°11'52.759"W
Cachanilla (<i>Pluchea sericea</i>)	32°25'51.399"N	114°57'39.299"W
Algodón (<i>Gossypium herbaceum</i>)	32°26'54.399"N	114°59'12.5"W

El procedimiento de colecta consistió en realizar un muestreo de acuerdo a la metodología propuesta por Fernandez et al. (2015) con algunas modificaciones. La toma de suelo y raíces se llevó acabo a una profundidad de 10 cm cerca de la rizosfera de las plantas de cachanilla, salicornia y algodón, respectivamente, (figura 8). Se realizaron colectas de 300 g para formar una muestra compuesta. Las muestras de suelo de cada planta seleccionada se colocaron en bolsas y fueron transportadas a temperatura ambiente, hasta su procesamiento en laboratorio.

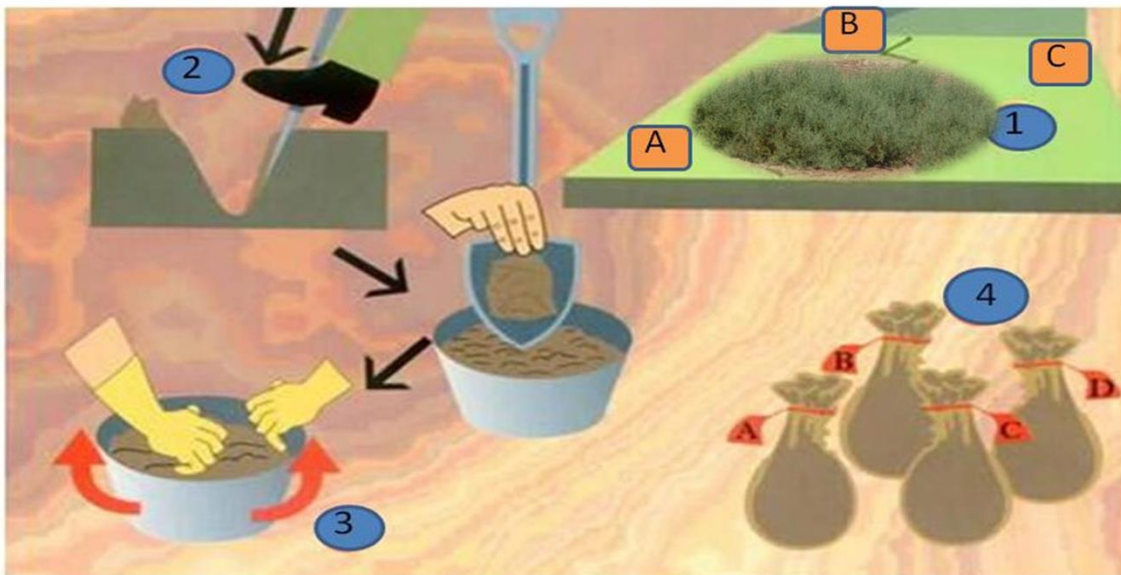


Figura 8. Proceso general de colecta del suelo para el aislamiento de microorganismos: 1) escoger el sitio de muestreo y marcar al azar los sitios de muestreo intentando abarcar a toda la planta (A,B, y C); 2 y 3) colectar muestras de 300 g aproximadamente en la capa arable del suelo (10-25 cm de profundidad); 4) etiquetar las muestras del suelo colectado en los diferentes puntos para su análisis en laboratorio.

3.2 Aislamiento y conservación de los microorganismos

Para aislar, y seleccionar, las bacterias presentes en la rizosfera de cachanilla (*Pluchea sericea*), Salicornia (*Salicornia bigeloviis*) y algodón (*Gossypium herbaceum*), se procedió a realizar una dilución seriada del suelo rizosferico procedente de cada planta. Posteriormente de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , se tomó 100 μL para su siembra por triplicado con espátula de Drigalsky en cajas petri conteniendo agar nutritivo (Figura 9). Las cajas petri inoculadas se incubaron a $33 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

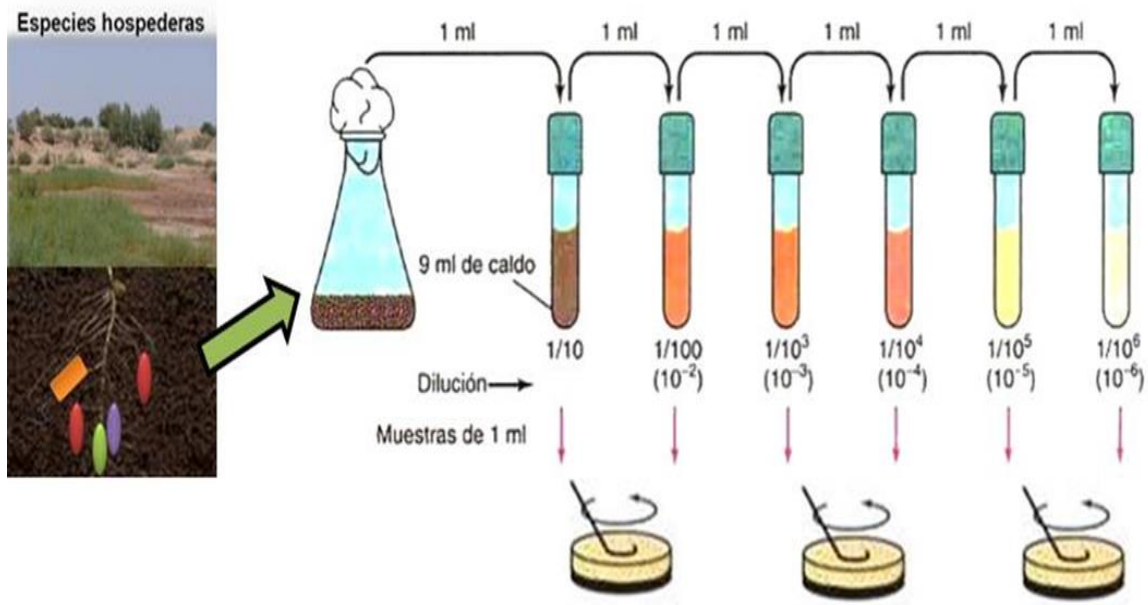


Figura 9. Técnica de dilución para el aislamiento de microorganismos del suelo

Posteriormente, se seleccionó una muestra representativa de cada colonia para realizarle la tinción de Gram (Prescott 2002) y observar al microscopio, con un aumento de 100X (Figura 10).

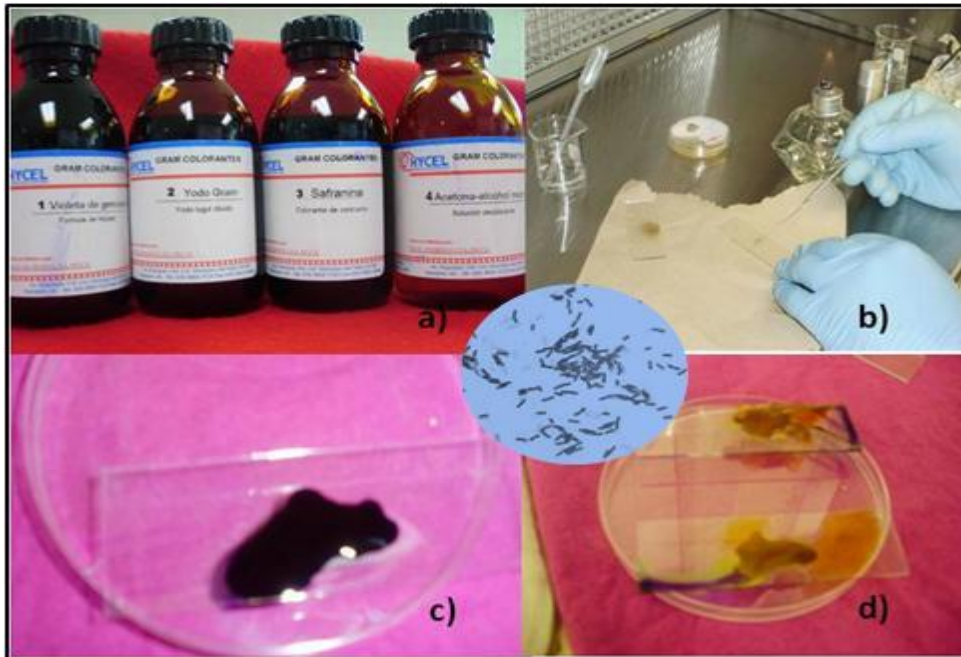


Figura 10. Proceso de tinción de Gram (a,b,c y d) y visualización al microscopio

Una vez realizado la selección de cada aislado bacteriano se procedió a realizar la selección de aquellos que tuvieran la capacidad de producir biosurfactantes para esto la prueba de hemólisis se aplicó como prueba selectiva (Figura 11).

3.3. Prueba de capacidad hemolítica

Aislados bacterianos de la rizosfera de algodón, cachanilla y salicornia, fueron crecidos en caldo de soya tripticaseína (TSB, Merck) por 24 h a 30°C. Posteriormente, se sembraron alícuotas de 10 μ L de cada aislado en medio de agar sangre para la prueba de hemólisis de acuerdo a Carrillo et al. (1996).

Las cajas Petri se incubaron a 30 ° C durante 2 días y los aislados que presentaron con un halo claro fueron seleccionados y marcados como positivos para la presencia de biosurfactantes de acuerdo con Rodrigues et al. (2006).

PATRONES DE HEMÓLISIS

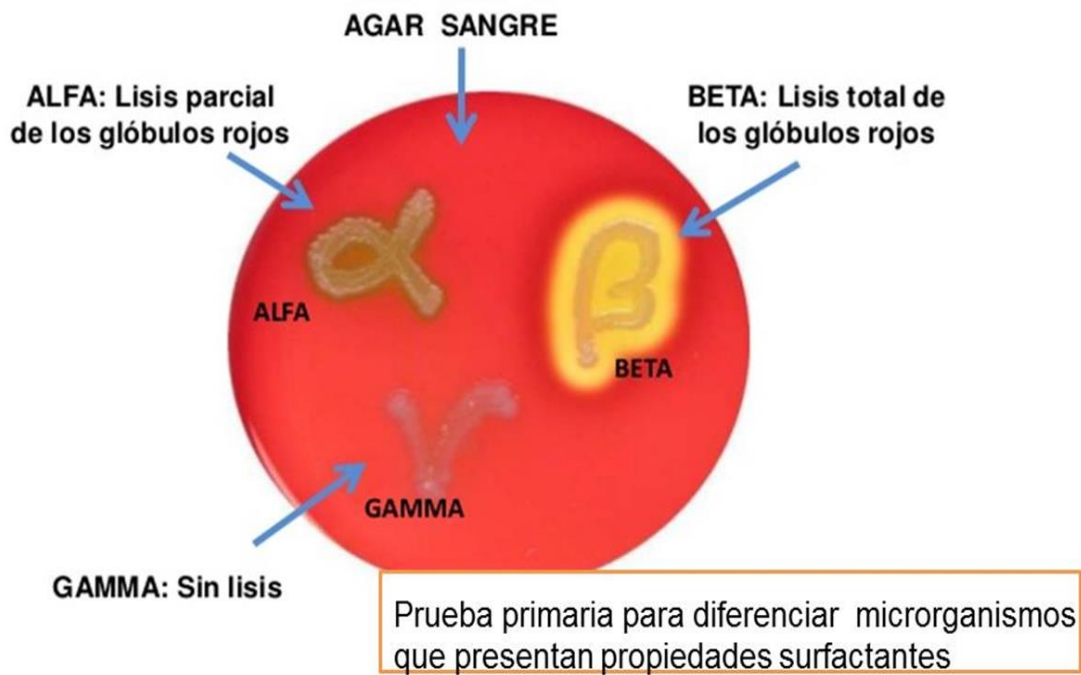


Figura 11. Prueba de hemólisis en sangre para identificar propiedades biosurfactantes en los microorganismos aislados.

Esta prueba permitió seleccionar una cepa de cada suelo rizosférico de las plantas de Cachanilla, Salicornia y Algodón.

Finalmente, se tomaron las colonias con características visibles diferentes de cada muestra y se conservaron mediante el método de crio-conservación, de acuerdo a Sambrok and Russel (2001). Cada cepa fue conservada en glicerol al 15% a -80°C , para futuros estudios (Figura 12).

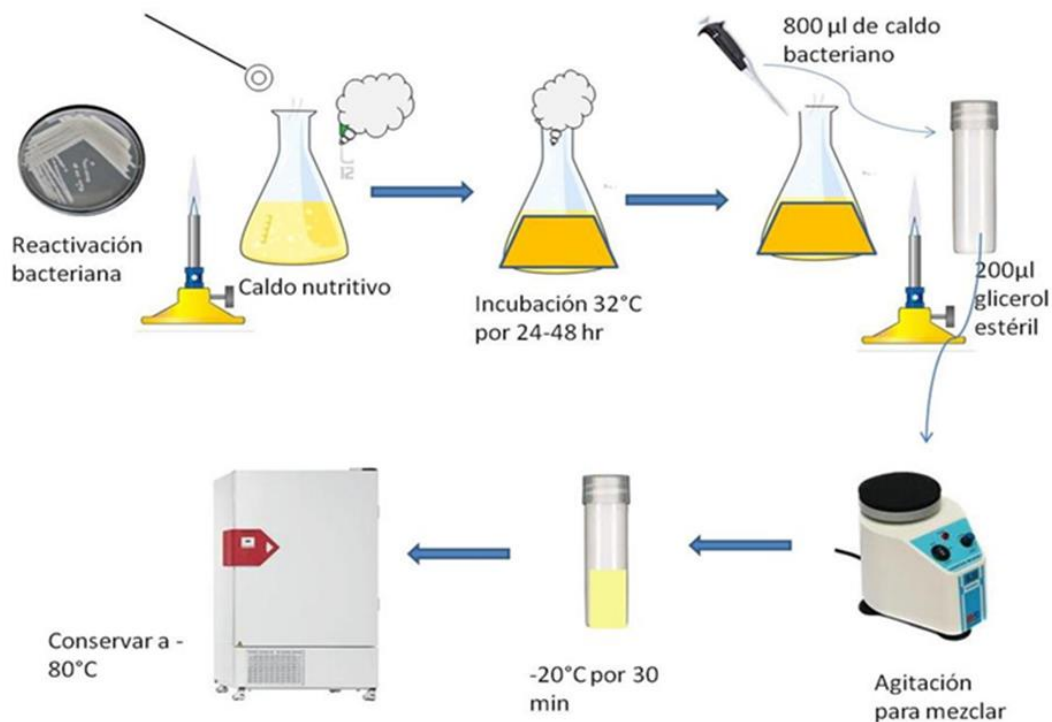


Figura 12. Proceso de conservación de las cepas seleccionadas del suelo rizosférico de cachanilla, salicornia y algodón.

3.4. Identificación molecular de las cepas aisladas

Para la identificación molecular de cada uno de las cepas previamente seleccionados de cada planta se procedió a la obtención del ADN total usando el método propuesto por González-Mendoza et al (2008) (Figura 13).

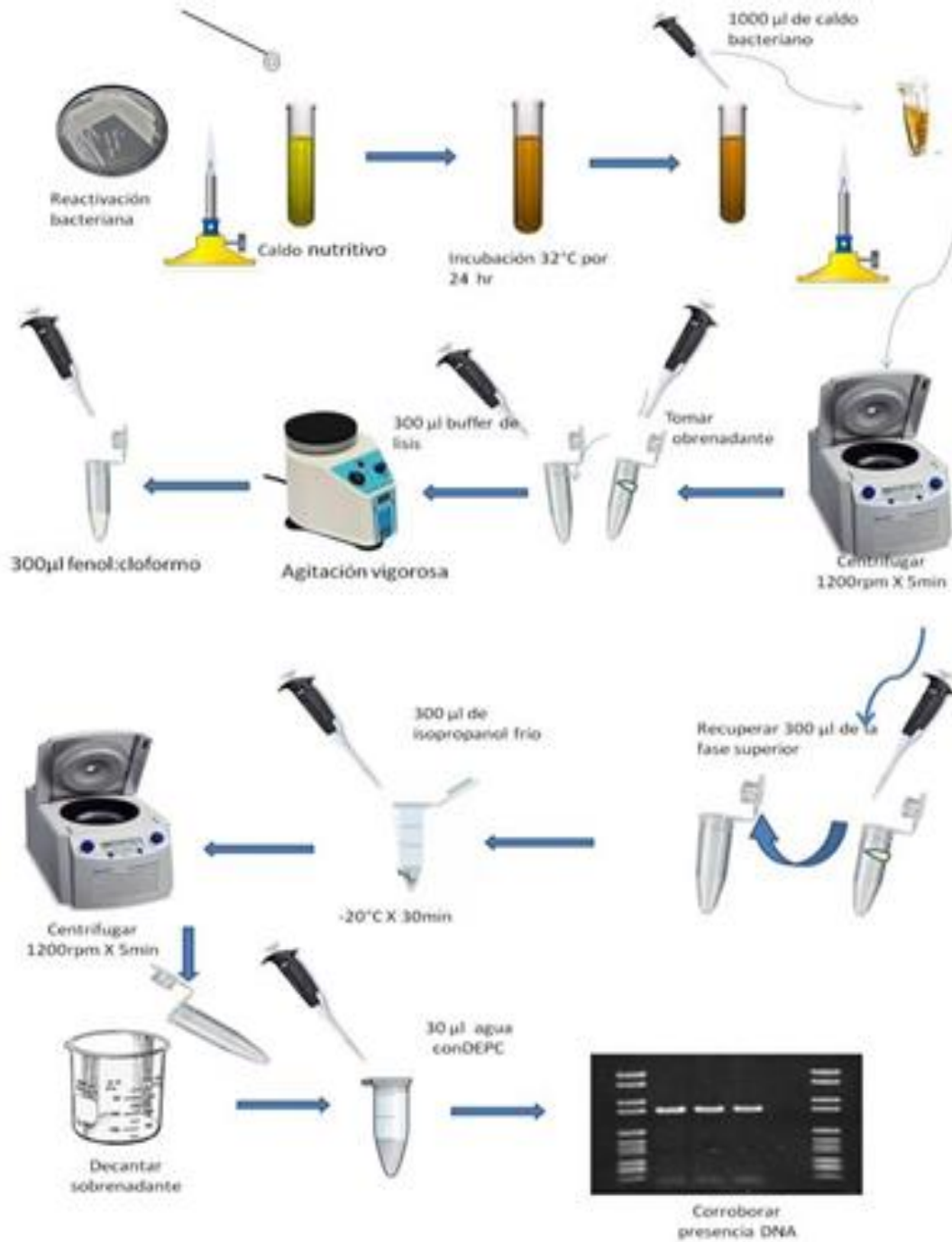


Figura 13. Proceso de extracción del ADN de las cepas seleccionadas de cada planta de Cachanilla, Salicornia y Algodón.

Obtenidos el ADN de cada aislado se realizó la amplificación del gen 16S ribosomal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), usando 2 μ l de ADN [20 ng μ L⁻¹] de cada aislado, empleando los siguientes primers FW1 (5⁰-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3⁰) y Rev1 (5⁰-AAGGAGGTGATCCAGCC-3⁰). Bajo las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min., y 72°C por 1 min. Para concluir con una extensión final a 72°C por 4 min. Una vez obtenidos los productos de PCR, éstos se separaron y se visualizaron por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos amplificados con los iniciadores de 16S fueron secuenciados utilizando un secuenciador de Applied Biosystem Genetic Analyzer 377 (CINVESTAV-Irapuato). Las secuencias nucleotídicas de 16S obtenidas se compararon con secuencias de los genes 16S de otros organismos disponibles en la base de datos del GenBank, La alineación, y comparación se realizó utilizando el algoritmo de Clustal W (MegAlign, DNASTAR software, Lasergene Versión, 1.02, Madison WI) (Sanger *et al.*, 1997). Esto permitió clasificar a las cepas aisladas de cachanilla, salicornia y algodón, dentro del género *Bacillus* y se etiquetaron como Bs-Cach01, Bs-Cach y Bs-Alg, respectivamente. Posteriormente se procedió a realizar la evaluación de la capacidad de producción de biosurfactante de cada una de ellas, previa determinación de la capacidad de formación de biopelícula y autoagregación.

3.5. Formación de biopelícula de los aislados bacterianos.

Para evaluar la capacidad de formación de biopelícula de cada una de las cepas aisladas se procedió con metodología, propuestas por Yegorenkova et. al. (2011), con algunas modificaciones. Las cepas primero se reactivaron en caldo soya tripticaseina por 24 h, a 35 °C. El inóculo de cada cepa se diluyó en caldo fresco hasta alcanzar una absorbancia de 0.3 nm, a una longitud de onda (λ) de 600 nm. Posteriormente 3 ml de cada muestra se colocó en un tubo de vidrio de 5 ml (por triplicado), se incubaron por un periodo de 8 hrs a 35°C. Finalizado el periodo de incubación se eliminó, el cultivo celular, y los tubos se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se agregó 6 mL de solución de cristal violeta al 1%, a cada muestra y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación se desechó el colorante y se lavó con agua destilada estéril para eliminar el colorante que no se hubiera fijado a las muestras. El siguiente paso fue adicionar 7.5 mL de solución acetona-etanol (20:80) a cada una de las muestras. Se tomaron 3 mL de cada muestra respectivamente, y se midió la capacidad de formación de biopelícula, mediante la lectura de la muestra a una longitud de onda (λ) 590 nm. Como control se usó caldo soya tripticaseina sin crecimiento bacteriano.

3.6. Capacidad de autoagregación de los aislados bacterianos

La capacidad de autoagregación bacteriana se relaciona con la capacidad de adhesión, es un proceso previo a la colonización mediante el cual las bacterias físicamente interactúan unas con otras y asentarán en la parte inferior en suspensión líquida estática (Collado et al., 2008). Esta capacidad la presentan la mayoría de los microorganismos, para el caso de cepas de *Bacillus subtilis* nativas. La metodología para evaluarlo se realizó de la siguiente manera de acuerdo con algunas modificaciones de Sorroce et al. (2012), una vez que las cepas fueron reactivadas en caldo soya tripticaseina por 24 h a una temperatura de 35°C, las bacterias se inocularon en 2 mL de caldo soya tripticaseina y se incubaron 24 h a 35°C. Posteriormente, se realizó una dilución del inoculo 1/100 con caldo soya tripticaseina, e incubó por un periodo de 48 h a la misma temperatura. Después, 5 mL del inoculo anterior de cada cepa se colocó en un tubo de vidrio y se dejó sedimentar por 24 h a 4°C. Transcurrido, el periodo de tiempo se tomó una alícuota (1000 mL) de la parte superior, y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, el tubo control se agitó por 30 s usando un vórtex y se realizó la lectura correspondiente. El porcentaje de autoagregación se calculó con la siguiente ecuación:

$$A\% = 100 [1 - (OD_f/OD_i)]$$

Donde:

A% : Porcentaje de autoagregación

OD_f : Densidad óptica final

OD_i : Densidad óptica inicial

3.7. Estandarización del medio de cultivo para las cepas aisladas

Como un paso necesario para la evaluación de producción de biosurfactantes en las cepas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, se procedió a la estandarización del medio del cultivo. Para tal fin se realizaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas obtenidas ya que un cuando las tres cepas obtenidas corresponden a *Bacillus subtilis*, el metabolismo de cada una de ellas puede diferir.

3.8. Curvas de crecimiento de las cepas aisladas

La curva de crecimiento consistió en reactivar las cepas bacterianas previamente crioconservadas, en caldo soya tripticaseina (CST) después de 24 h una alícuota se sembró por estriado en placa conteniendo agar soya tripticaseina (AST). Posteriormente se inoculó una asada en tubos de 50 mL conteniendo AST y se procedió a evaluar su crecimiento por 48 h. El crecimiento bacteriano se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro (Lambda 25 UV/Vis, Perkin-Elmer) y el conteo en placa cada dos horas por 48 h (Figura 14)

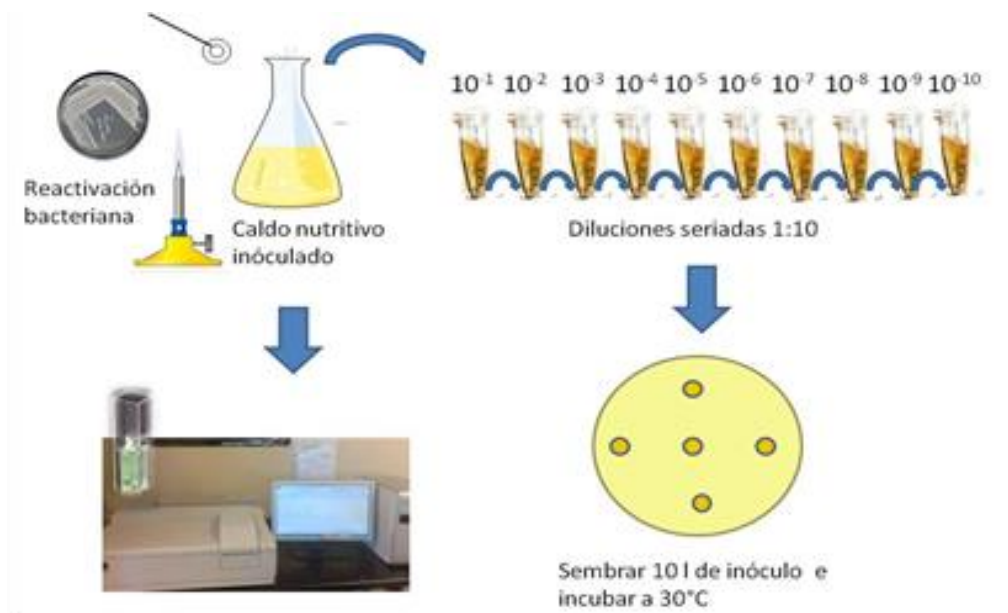


Figura 14. Representación gráfica del crecimiento y conteo bacteriano

El conteo en placa consistió en adicionar a 900 μL de solución salina estéril al 0.9%, 100 μL de inóculo bacteriano y realizar diluciones seriadas. Cada dilución realizada se sembró (10 μL) en cajas petri con medio de cultivo agar nutritivo y se incubo a 35 $^{\circ}\text{C}$. Cada lectura se realizó por triplicado; el blanco que consistió, únicamente de CST (Figura 14). A cada cepa se graficó su crecimiento en unidades formadoras de colonia (UFC/ml) y en DO (600 nm) por 48 h.

3.9. Velocidad de crecimiento de las cepas aisladas

Una vez realizada la curva de crecimiento para cada cepa seleccionada, se procedió a determinar la tasa de crecimiento, tiempo de generación y número de generaciones. Para tal fin se consideraron los valores de crecimiento al inicio y final de la fase exponencial, y se realizaron los cálculos con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{N_1 - N_0}{t_1 - t_0}$$

$$t_1 - t_0$$

En donde:

μ = tasa de crecimiento (h^{-1})

N = crecimiento en tiempo inicial (N_0) y final (N_1)

t = periodo de crecimiento exponencial (h), inicial (t_0) y final (t_1)

El tiempo de generación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$g = \frac{t_1 - t_0}{3.3 \log\left(\frac{N_1}{N_0}\right)}$$

En donde: g = tiempo de generación (h)

El número de generaciones se relaciona con el tiempo de generación mediante la siguiente ecuación:

$$n = \frac{t_1 - t_0}{g}$$

Donde n es el número de generaciones

3.10. Obtención del biosurfactante de las cepas aisladas

Como un paso necesario para la evaluación de producción de biosurfactantes en las cepas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, se procedió a la obtención del biosurfactante “crudo”. Este proceso consistió en colocar 3% de inoculo primario de cada una de las cepas en matraces conteniendo 250 mL de medio mínimo mineral (MMM) con glucosa al 1% como la única fuente de carbono a pH 7 de acuerdo a Yesurethinam et al. (2014). Los matraces inoculados con Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, fueron incubados a 30 ° C durante 24 h con agitación a 150 rpm. Después del periodo de incubación, las células se recogieron por centrifugación a 9000 rpm durante 20 min a 4 ° C y el sobrenadante libre de células se utilizó como biosurfactante crudo.

3.11. Actividad emulsificante de las cepas aisladas (EA)

La actividad de emulsificación (EA) de las tres cepas BsCach, BsAlg y BsCach01 se determinó usando tres aceites vegetales y diésel de acuerdo a la metodología descrita por Cameotra y Bollag (2003). Para esto se prepararon tubos de vidrio con 0.5 mL de sobrenadante de cada cepa (biosurfactante crudo) y se mezcló con 7.5 mL a 20 mM de una solución amortiguadora (20 mM Tris-HCl [pH 7] y 10 mM MgSO₄). Posteriormente, se le adiciono de manera independiente 0.1 mL de de los aceites vegetales y diésel. Después cada tubo se agito vigorosamente

usando un vórtex durante 1 minuto, y se mantuvieron en reposo durante 1 hr a 30° C. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm de cada muestra.

La actividad emulsificante (EA) se definió como la medida de la densidad óptica (Sifour et al.,2007). Como muestra control se usó medio de cultivo sin crecimiento celular y cada ensayo fue realizado por triplicado.

3.12. Técnica de dispersión de aceite en las cepas aisladas

La técnica de dispersión de aceite se utilizó para estudiar la actividad superficial de los extractos crudos del biosurfactante de las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, respectivamente. Esta técnica fue desarrollada por Morikawa et al. (2000) y puede ser usada cuando la actividad y calidad del biosurfactante es baja. El ensayo se llevó a cabo por triplicado y consistió en colocar 30 mL de agua destilada en una caja petri y agregar 100 µL de aceites de maíz, olivo, soya y diésel de forma independiente. Entonces 20 µL del extracto crudo de biosurfactante de cada cepa fue adicionada a la superficie de cada aceite y diésel. Las muestras se dejaron reposar por tres minutos y los diámetros de las zonas claras formadas se registraron antes que colapsaran. El control consistió en colocar 20 µL de medio de cultivo sin crecimiento celular a las muestras de aceite y diésel.

3.13. Índice de emulsificación (E_{24}) en las cepas aisladas

El índice de emulsificación se midió usando el método descrito por Cooper y Goldenberg (1990). El biosurfactante crudo de cada cepa se mezcló con diferentes fuentes de hidrocarburos (diesel) y aceites vegetales (oliva, maíz y soya), en relación (2:2) (Figura 15). Cada muestra se agito en vórtex por dos minutos, con la finalidad de mezclar las dos fases. Posteriormente, se dejó en reposo por un lapso de 24 hrs a 35°C, una vez que el tiempo transcurrió, se calculó el índice de E_{24} de acuerdo a la siguiente ecuación, (E_{24}).

$$E_{24} = (\text{Altura de emulsión} \times 100) / \text{Altura total}$$

Con esta ecuación se obtiene el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (mm) dividido por la altura total de la columna de líquido.

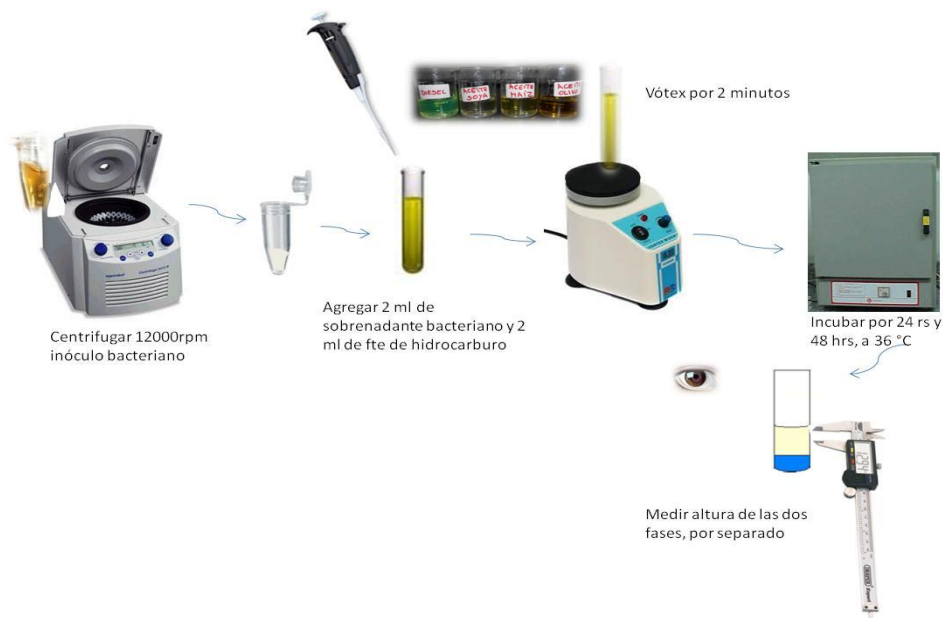


Figura 15. Diagrama del proceso de medición del índice de emulsificación (E_{24})

3.14. Identificación de genes productores de biosurfactantes

En base a los resultados de identificación molecular, se clasificó a las tres cepas dentro del género de *Bacillus subtilis*. Este tipo de microorganismos generalmente se caracterizan por producir biosurfactantes lipopeptidos. De tal forma que para identificar a nivel molecular la presencia de estos lipopeptidos en las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, se procedió a su identificación molecular.

Para esto se diseñaron secuencias de oligonucleótido de los genes con actividad biosurfactante más comunes en el género *Bacillus* en base a las secuencias publicadas en la literatura (Tabla 6).

La identificación de los genes se realizó a partir de DNA total (20 ng) de cada cepa, mediante la técnica de PCR. Bajo las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 72°C por 1 min. Para concluir con una extensión final a 72°C por 4 min. Una vez obtenidos los productos de PCR, éstos se separaron y se visualizaron por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos amplificados con los iniciadores de 16S fueron secuenciados utilizando un secuenciador de Applied Biosystem Genetic Analyzer 377 (CINVESTAV-Irapuato).

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la identificación de los genes respectivos

Genes de lipopetidos	Secuencia empleadas
Subtilisina F	CTTAAACGTCAGAGGCGGAG
Subtilisina R	ATTGTGCAGCTGCTTGTACG
Subtilosina F	TCGGTTTGTAACTTCAACTGC
Subtilosina R	GTCCACTAGACAAGCGGCTC
Bacilomicina F	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC
Bacilomicina R	AAGAGTGCGTTTTCTTCGGA
Iturina F	TGCCAGACAGTATGAGGCAG
Iturina R	CATGCCGTATCCACTGTGAC
Fegicina F	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG
Fegicina R	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC
Surfactina F	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG
Surfactina R	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG

Las secuencias nucleotídicas obtenidas de cada lipopeptido se compararon con las secuencias de los genes de otros organismos disponibles en la base de datos del GenBank. La alineación, y comparación se realizó utilizando el algoritmo de Clustal W (MegAlign, DNASTAR software, Lasergene Versión, 1.02, Madison WI) (Sanger *et al.*, 1997).

3.15. Actividad antimicrobiana de los biosurfactantes

La actividad antimicrobiana del biosurfactante crudo de Bs-Cach, BsCach01 y Bs-Alg, fue evaluada frente a *Trichoderma longibrachiatum*, un hongo de importancia ambiental. La actividad antifúngica de los biosurfactantes fue evaluada mediante el método de difusión en disco en agar con algunas modificaciones. Para esto 300 μL de una solución del patógeno a una concentración de 1×10^6 , se sembró por difusión en una caja petri con media de agar papa dextrosa (PDA). Posteriormente, se colocó en un extremo un disco de papel filtro estéril de 5 cm de diámetro, previamente humedecido con 600 μL del biosurfactante crudo de cada cepa evaluada. Adicionalmente en otras cajas inoculadas con el patógeno se realizó un estriado de cada cepa evaluada, en el centro de la caja Petri para verificar el efecto antifúngico. El crecimiento del patógeno se registró a las 72 h después de la inoculación.

El porcentaje de inhibición de crecimiento en cada caso (%IC), observado por triplicado. La fórmula que se empleó fue la siguiente:

$$\%IC = ((\text{Crecimiento del hongo en el disco Control} - \text{Crecimiento del hongo en el disco con biosurfactante}) / \text{Crecimiento del hongo en el disco Control}) \bullet 100$$

3.16. Extracción y caracterización de los biosurfactantes

Una vez que se han realizado las pruebas de biosurfactación y la identificación molecular de los posibles tipos de biosurfactantes presentes en cada cepa evaluada. Se procedió a realizar la extracción y purificación parcial del biosurfactante.

El proceso de extracción del biosurfactante, se realizó de acuerdo a Sungaya et al. (2012) y Sifourd et al.(2005); de la siguiente manera; crecer las cepas de manera independiente usando 1×10^7 (ufc/ml), en medio mínimo mineral (100 ml) por 24 h a 36° C. Transcurrido este lapso de tiempo, las muestras se centrifugaron a una velocidad de 9000 rpm, por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes de cada muestra se filtraron usando un filtro millipore de 0.22 μ m, a cada filtrado el pH se ajustó a 2, con HCl al 1 N. Los filtrados de cada muestra se mantuvieron a 4°C, por toda la noche. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C; los precipitados se re suspendieron con 2 ml agua destilada, hasta pH 7.0. Finalmente las muestras se secaron 60 °C por 24 h. El producto seco de cada muestra se sometió a una extracción con una solución de cloroformo: metanol (65:15) para eliminar impurezas.

3.17. Espectrofotometría de infrarrojo de los biosurfactantes

Una vez que se obtuvo el biosurfactante, se realizó la caracterización por espectrofotometría de infrarrojo. Para esto cada pastilla de cada muestra empleada fue analizada en un espectrómetro de IR por transformada de Fourier marca Perkin-Elmer modelo Spectro one FT-IR en un rango de 4000 y 400 cm^{-1} .

Adicionalmente a las identificación de la presencia de biosurfactante en las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, se procedió a realizar pruebas que permitieran una mejor caracterización biotecnológica de cada una de las cepas estudiadas.

4.1. Caracterización e identificación de microorganismos aislados

En el presente estudio se colectaron muestras de suelo rizosferico de tres plantas representativas del valle de Mexicali, Cachanilla, Salicornia y Algodón. En donde el conteo de microorganismo mediante la técnica de dilución mostró que las muestras de suelo rizosferico de salicornia presento una población superior a las muestras de Algodón y Cachanilla (Tabla 7 y Figura 16).

Siendo las muestras procedentes de suelo rizosferico de Cachanilla, la que menos población de microorganismos por gramo presentaron. Lo anterior nos muestra la importancia que cada especie de planta puede tener en las poblaciones microbianas resultado de la producción de exudados radiculares que afectan la dinámica poblacional de los microorganismos (Soto-Aquino et al., 2012).

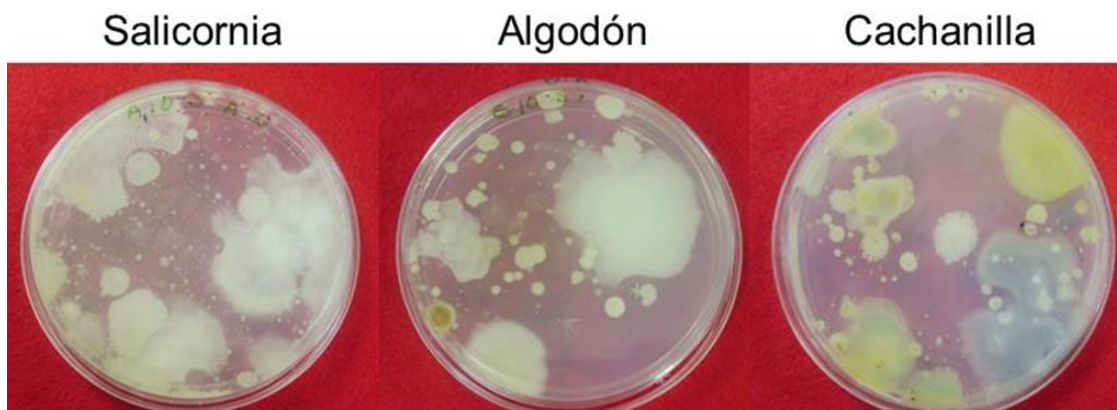


Figura 16. Poblaciones de microorganismos presentes de las muestras de la rizosfera de Salicornia, Algodón y Cachanilla.

Tabla 7. Comparación de medias de las poblaciones de bacterias rizosfericas asociadas con tres parches de vegetación en el Valle de Mexicali. Las poblaciones microbianas son expresadas en logaritmo natural.

Parches de vegetación	Ubicación	Bacterias en UFC/g suelo
Salicornia	Latitud: 32°24'30.359"N	
(<i>Salicornia bigeloviis</i>)	Longitud: 115°11'52.759"W	14.45 ^a
Cachanilla	Latitud: 32°24'30.359"N	
(<i>Pluchea sericea</i>)	Longitud: 114°57'39.299"W	11.51 ^b
Algodón	Latitud: 32°26'54.399"N	
(<i>Gossypium herbaceum</i>)	Longitud: 114°59'12.5"W	13.19 ^c

Valores con la misma letra para cada especie vegetal en cada columna no son estadísticamente diferentes, de acuerdo a con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), $n=5$.

En este sentido Aguilar (1998) y Gonzalez et al. (2009) encontraron que los nutrientes y exudados radiculares presentes en plantas de Mezquite y *Artemisia*

tridentata incrementaban una mayor población de bacterias en rizosfera comparada con otras plantas presentes en ambientes semidesérticos.

4.2. Actividad hemolítica y tinción de Gram de las cepas aisladas

Por otra parte, el crecimiento de los aislados microbianos de cada muestra de suelo rizosferico procedente de Cachanilla, Algodón y Salicornia, en agar sangre para verificar sus propiedades hemolíticas, como un primer criterio de selección de bacterias con propiedades biosurfactantes. Mostraron que un aislado procedente del suelo rizosferico de Cachanilla, Algodón y Salicornia, respectivamente presentaron moléculas con capacidad hemolítica, lo cual fue evidente por la destrucción del grupo hemo y consecuente desaparición del color rojo característico de la hemoglobina de los glóbulos rojos en el medio de cultivo (Figura 17).

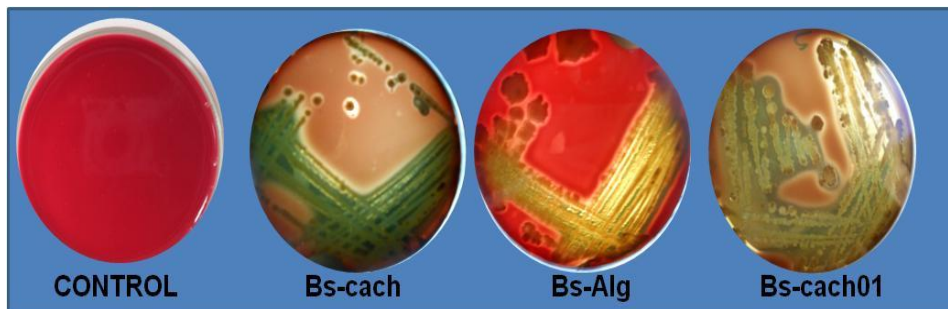


Figura 17. Hemolisis de cada aislado procedente del suelo rizosferico de Cachanilla (Bs-cach) Algodón (Bs-Alg) y Salicornia (Bs-Cach01).

Lo anterior sugiere que cada uno de los aislados podría liberar sustancias con propiedades biosurfactantes. Debido a que la presencia de actividad hemolítica

observada en cada uno de los aislados nos indica la posible producción de lipopéptidos con propiedades surfactantes.

Similares resultados han sido reportados por Sarti y Miyazaki (2013) en donde cepas de *Bacillus subtilis* mostraron una alta actividad hemolítica que acompañaron la producción de biosurfactantes. Adicionalmente, estudios en aislados de *Bacillus* procedentes de suelos agrícolas han mostrado que sus actividades hemolíticas fueron originados por la presencia de lipopéptidos específicos con actividad antimicrobiana (Monteiro et al.,2005).

Por otra parte, el análisis de la tinción Gram, mostro que cada uno de los aislados fueron bacilos Gram (+). La pureza de los aislados seleccionados se confirmó mediante su morfología colonial, en donde cada aislado se distinguió por presentar colonias de apariencia cremosa con formas irregulares (Figura 18).

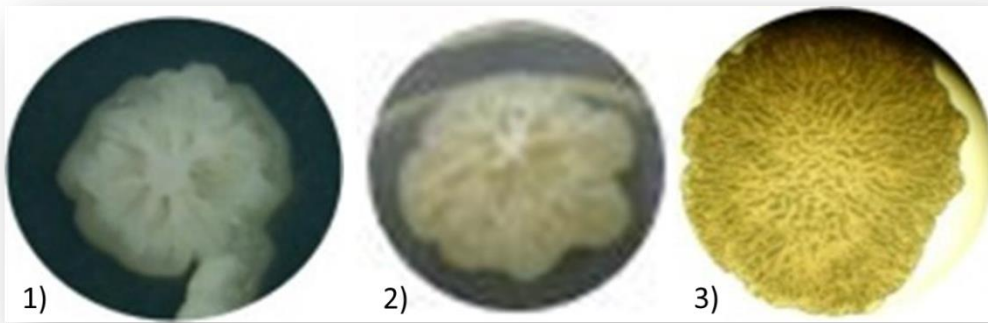


Figura 18. Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de Cachanilla (1), Salicornia (2) y Algodón (3).

En base a estos resultados los aislados fueron parcialmente clasificados como posibles bacterias del genero *Bacillus* sp., por lo que se les procedió a nombrar como Bs-Cach (Cachanilla), Bs-Cach01 (Salicornia) y Bs-Alg (Algodón) (Tabla 8).

Tabla 8. Tinción de Gram y morfología de los aislados de la rizosfera de Cachanilla, Salicornia y Algodón.

Aislado	Tinción de Gram	Morfología
Bs-Cach (Cachanilla)	(+)	Bacilos
Bs-Cach01 (Salicornia)	(+)	Bacilos
Bs-Alg (Algodón)	(+)	Bacilos

4.3. Identidad molecular de las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg

Para tener la certeza de la especie bacteriana a la que pertenecen las cepas que mostraron un actividad hemolítica se procedió a la obtención de su ADN y a la amplificación del gen 16S ribosomal. Este gen es ampliamente usado para los estudios filogenéticos ya que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias. Además contiene regiones híper variables que proveen especificidad de especie, lo que resulta muy útil para la identificación de las bacterias (Flores-Gallegos, 2009).

En este sentido los iniciadores universales empleados permitieron amplificar completamente el gen 16S con un tamaño de 1500 pb, que es un indicativo de que se abarca a las regiones conservadas en los extremos 5-9 y 3-9 del gen, en base a lo descrito por Rodicio y Mendoza (2004). Esto minimiza las fluctuaciones estadísticas en análisis posteriores de las secuencias.

Aunque en el presente estudio se logró la amplificación completa del gen 16S, diversos autores que indican que existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, que corresponde al extremo 5-9. Por lo que con la amplificación de fragmentos de 500 bases, es suficiente para la correcta identificación de bacterias (Patel et al.,2000; Patel, 2001).

Finalmente, en el gel de agarosa se observa un patrón de bandeo uniforme (Figura 19) comparado con el marcador molecular (MM) que da una escala de bandas desde 200 hasta 10000 bp.

Las secuencias de nucleótidos parcial de cada una de las cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg (Figura 20) obtenidas por secuenciación fueron depositadas en el GenBank con claves de registro que se muestran en la Tabla 9.

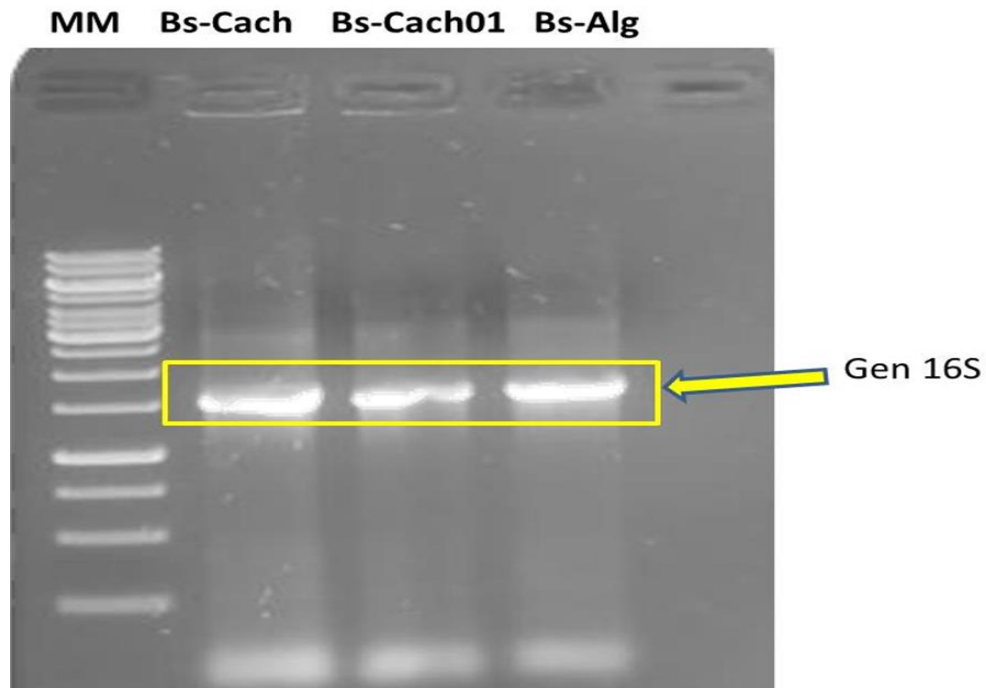


Figura 19. Gel de agarosa que contiene los amplificadores de los genes ribosomales 16S, MM: marcador molecular Ladder 1Kb, Bs-Cach: cachanilla; Bs-Cach01: salicornia y Bs-Alg: algodón.

Tabla 9. Registro de secuencias de las cepas aisladas en el GenBank

Aislado	Clave de registro en GenBank
Bs-Cach (Cachanilla)	KC256786
Bs-Cach01 (Salicornia)	KM212950
Bs-Alg	KF669896

A través del programa BLAST se verificó la homogeneidad de cada una de las cepas estudiadas con las secuencias presentes en el Genbank. Los resultados mostraron que la cepa Bs-Cach, presentó una alta identidad (98 y 97 %) con *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (GenBank:KF032696) y *B. subtilis* cepa PARZ9 (GenBank: HQ678662) . En su caso la cepa Bs-Cach01 tuvo una identidad de 98% con *B. subtilis* cepa NCIM 2063 (GenBank: KR078396) y *B. mojavensis* cepa AM-22 (GenBank:KR998233). Por su parte el análisis de identidad de la cepa Bs-Alg, indicó una identidad del 97% con *B.subtilis* F-62 (GenBank: KT027713) y *B. malacitensis* F-60 (GenBank: KT027712).

1)

partial sequence

```
CAGGGCTCGGCGTCGCGTATACATGGTAGCCGTAGAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA
TGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGC
AGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGCCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCC
TGGTAGTCCACGCCCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGGTTAGGGGGTTTTCCGTCCCTTAGTGCAGCTA
ACGCATTAAGCACTTCGGCC TGGGAGTACGGCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAACGGTGGAAGATGTGGTTATTTCCAGCAAACGCGAAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCTCTG
AGAATCC
```

2)

partial sequence

```
CGGGCGGACGGGTGAGTAACAYGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA
ATACYGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGA
CCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTYTGKTGY
TAGGGAAKAACMAGWACC GTTCGAATAKGGCGGWACCTTGACGGTACCTAAC
```

3)

partial sequence

```
TTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
CCGGGAAACCGGGGCTAATACYGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGC
TACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGA
TCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCMGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGSAAAGCGTTGTCCSGAATTAT
TGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGSGGTTTTCTTAAKTCTGATGKGAAAGCCCCGGSTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCMGAASARGAGAGTGGAATTCMCGTGTASC GGKGAATGSGTAKA
GATGKGGAGGAACACCMGGTGGKGAAKKSG
```

Figura 20. Secuencias de nucleótidos de cada una de las cepas aisladas de la rizosfera de Cachanilla: 1) Bs-Cach, Salicornia; 2) Bs-Cach01 y Algodón; 3) Bs-Alg

No obstante, para establecer con más precisión la identidad de cada uno de las secuencias de nucleótidos de las cepas identificadas, a nivel de especie. Se procedió a realizar el alineamiento de las bacterias con las secuencias de diversas especies de *Bacillus*, homólogas en un rango de 97 a 99%.

Todas secuencias se analizaron usando la herramienta de alineación de del software Clustal Omega, Mega 6 y posteriormente se agruparon mediante un análisis filogenético generando el árbol filogenético presentado en la Figura 21.

El agrupamiento de las secuencias de ARNr 16S mostrado en el árbol filogenético (Fig. 21) confirmó que los aislamientos de *Bacillus*, Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg son diferentes de otros *Bacillus* de la misma especie.

De acuerdo a Guillen-Cruz et al. (2006), menciona que el género *Bacillus* se caracteriza por ser heterogéneo y puede ser re-clasificado en varios grupos en base a la homología fenotípica y genotípica de secuencias de rDNA 16S. Esto indica que el gen 16S es una herramienta robusta para la clasificación de bacterias y análisis filogenéticos.

Sin embargo; existen autores que reportan que el análisis del 16S r RNA no es suficiente para identificar a las especies de *Bacillus* (Pontes et al.,2007; Freitas et al.,2008). Debido que la identificación de *Bacillus* tiene limitaciones en la diferenciación de especies muy cercanas.

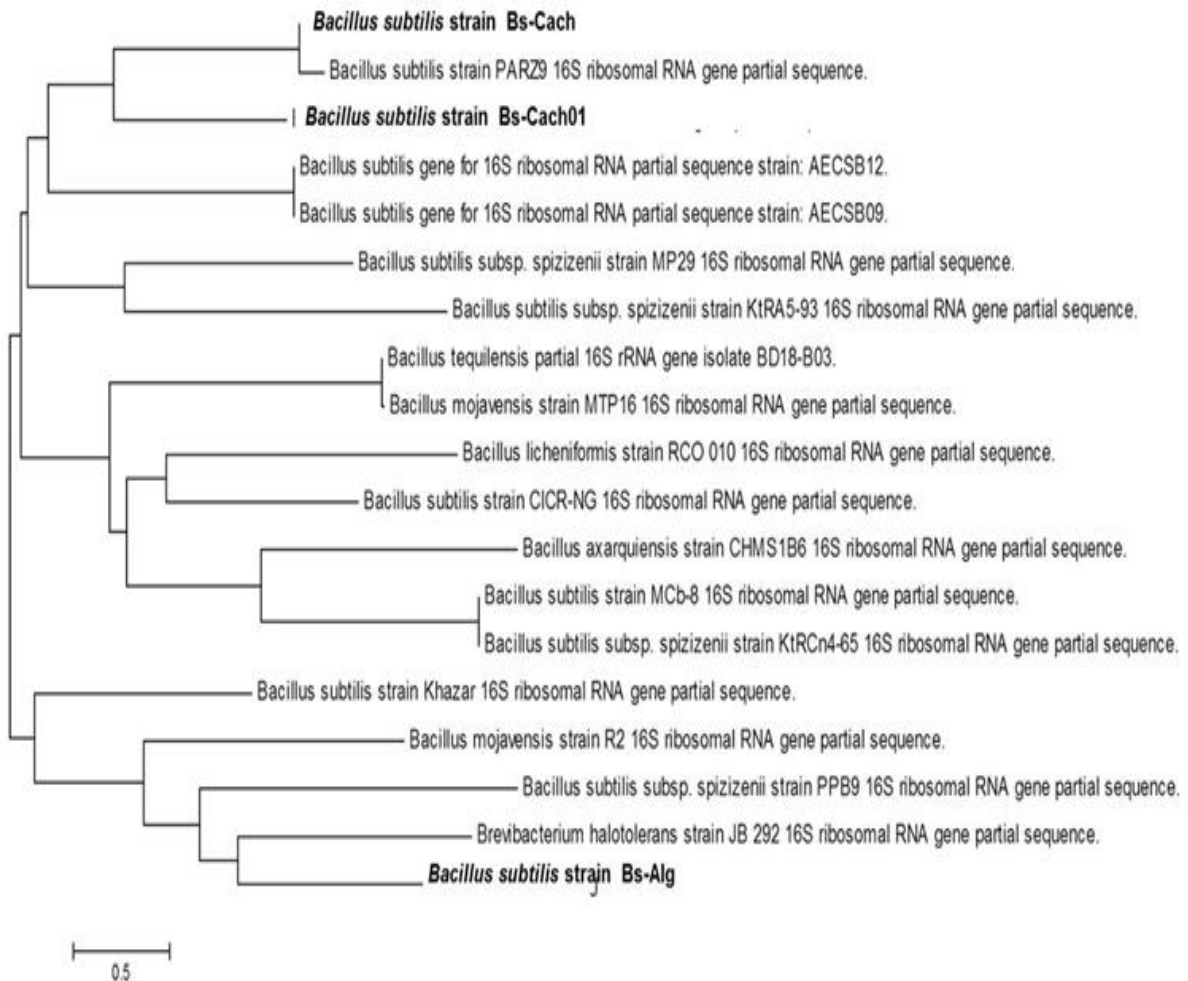


Figura 21. Árbol filogenético mostrando la relación entre los aislamientos de *Bacillus* identificados con otras secuencias basados en alineamientos del gen ribosomal 16S y fue construido usando la versión 6.0 del programa MEGA.

No obstante estas limitaciones pueden ser resueltas con el uso de secuencias de oligonucleótidos específicos como los usados en el presente estudio que facilitan la identificación y diferenciación de especies muy cercanas (Wang et al.,2007).

La identificación de la cepas de *B. subtilis* en la rizosfera de Cachanilla, Salicornia y Algodón, es de gran relevancia ya que este género muestra la formación de endosporas con resistencia a la desecación y calor. Lo cual los hace candidatos ideales para el desarrollo de agentes de biocontrol de microorganismos que afectan a los cultivos agrícolas (Swain y Ray, 2009). Además existen reportes en donde se indica que ciertas especies de *Bacillus* spp., pueden producir lipopeptidos que son clasificados en tres familias de acuerdo a su secuencia de aminoácidos: surfactinas, iturina y fengicina. Estos lipopeptidos pueden tener una función relevante como biosurfactantes y aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Wei-Chuan et al., 2015).

4.4. Identificación de genes productores de biosurfactantes

Los resultados sobre la identificación de los genes de lipopeptidos en el ADN de las cepas Bs-Cach, Bs- Cach01 y Bs-Alg. Indico la presencia de un fragmento de del gen de subtilisina de 500 pb para las cepas de Bs-Cach y Bs-Alg, pero no se observó la presencia en la cepa Bs-Cach01 (Figura 22). En el caso de la amplificación del gen de iturina los resultados mostraron que el DNA de las cepas de Bs-Cach y Bs-Alg amplificó un fragmento de 600 pb (Figura 23).

La presencia de un segundo fragmento a 300 pb se observó en las tres cepas, posiblemente resultado de la secuencia de oligonucleótidos empleadas que no son específicas ya que se formularon a base de secuencias homologas.

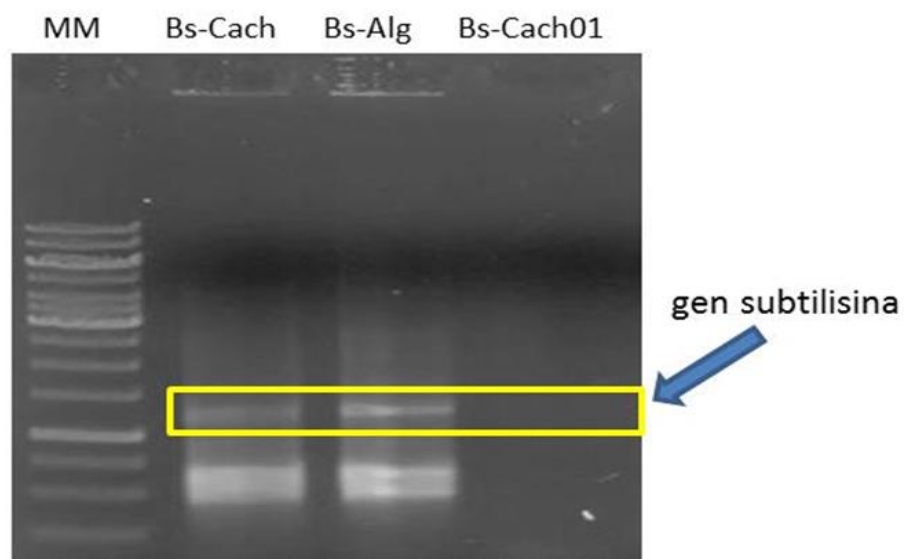


Figura 22. Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleotidos del gen de subtilisina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.

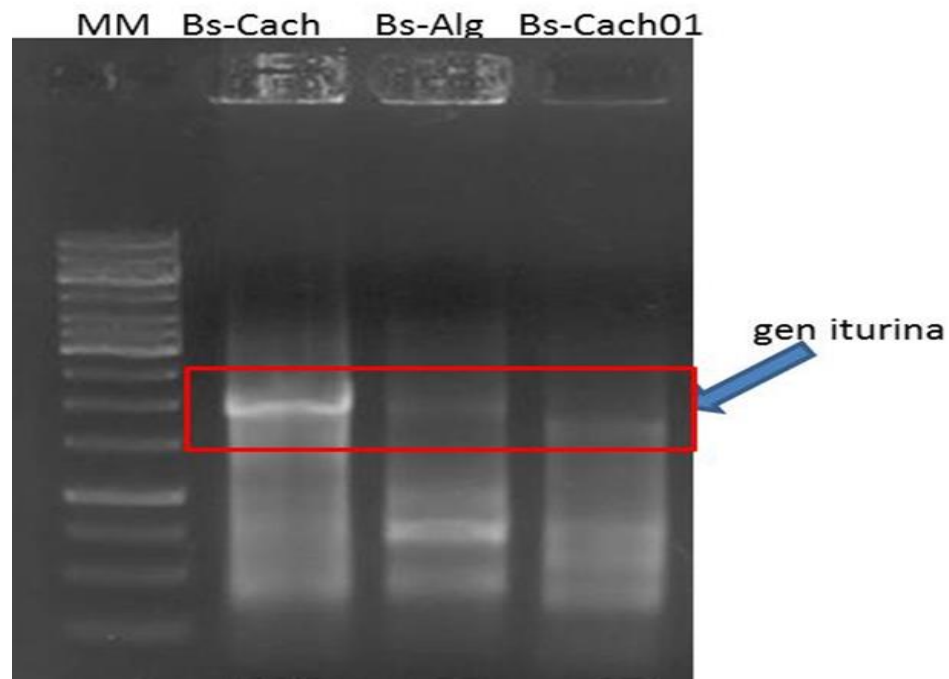


Figura 23. Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleotidos del gen de subtilisina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.

Por otra parte un fragmento de 600 pb se observó cuando se emplearon las secuencias de oligonucleótidos del gen de surfactina en las cepas Bs-Alg y Bs-Cach01, pero no en el ADN de la cepa Bs-Cach.

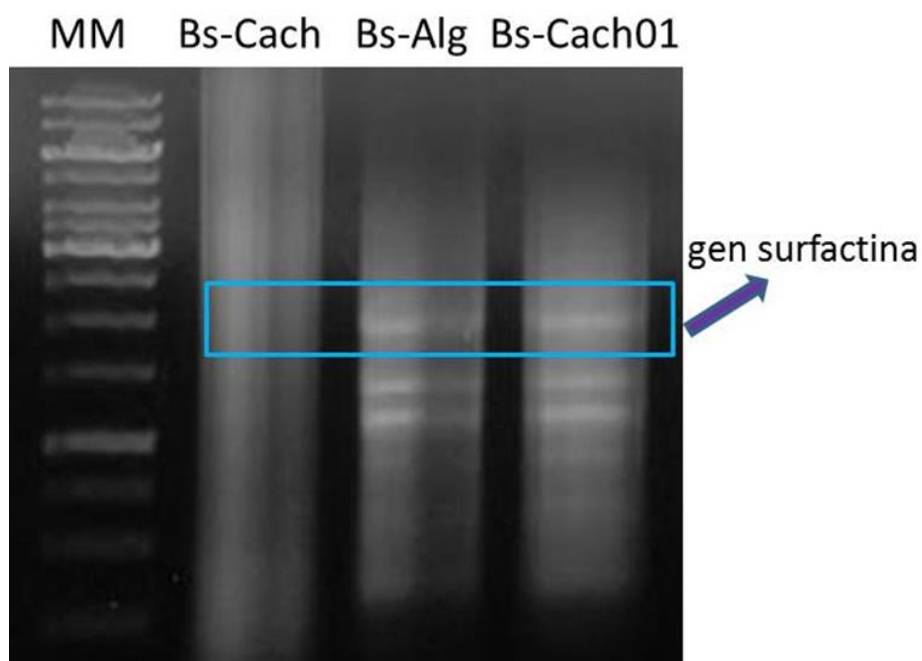


Figura 24. Fragmento amplificado con las secuencias de oligonucleotidos del gen de surfactina en las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.

Estos resultados nos indican que las cepas aisladas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, presentan como mínimo la posible presencia de al menos uno de los tres genes evaluados (iturina, subtilisina y surfactina). La presencia de genes de lipopeptidos en las cepas de *Bacillus subtilis* identificadas son de gran relevancia dado su actividad antifúngica, lo cual le confiere un alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000).

Estos lipopeptidos pueden afectar la estabilidad de la membrana de otros microorganismos creando poros en la membrana celular, lo que se refleja en una disminución o inhibición del crecimiento del mismo (Ongena y Jackes, 2008).

4.5. Formación de biopelículas de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

En la formación de biopelícula nuestros resultados mostraron que las tres cepas presentaron la capacidad de formación de biopelícula (Figura 25a). No obstante, fue Bs-cach01, la que presentó mayor capacidad de esta propiedad y en menor grado las cepas Bs-Cach y Bs-Alg (Figura 25b).

En este sentido, la participación de los lipopeptidos identificados en el presente estudio y su participación en la formación de biopelículas en las cepas evaluadas, podría verse reflejado en los resultados obtenidos. Esto debido a que la presencia de lipopeptidos desempeña un papel importante en la arquitectura de la película estabilizando su estructura tridimensional (Zohora et al., 2009). Lo anterior ha sido previamente reportado, por Rahman et al. (2007), quien observó que cepas de *B. subtilis* que presentan una biopelícula frágil, cambia cuando se le incorpora genes que sintetizan lipopeptidos con propiedades surfactantes y antibióticas. Esto nos muestra la importancia de los lipopeptidos como surfactina, iturina y subtilisina en la formación de la biopelícula por parte de las cepas de *Bacillus subtilis* encontradas.

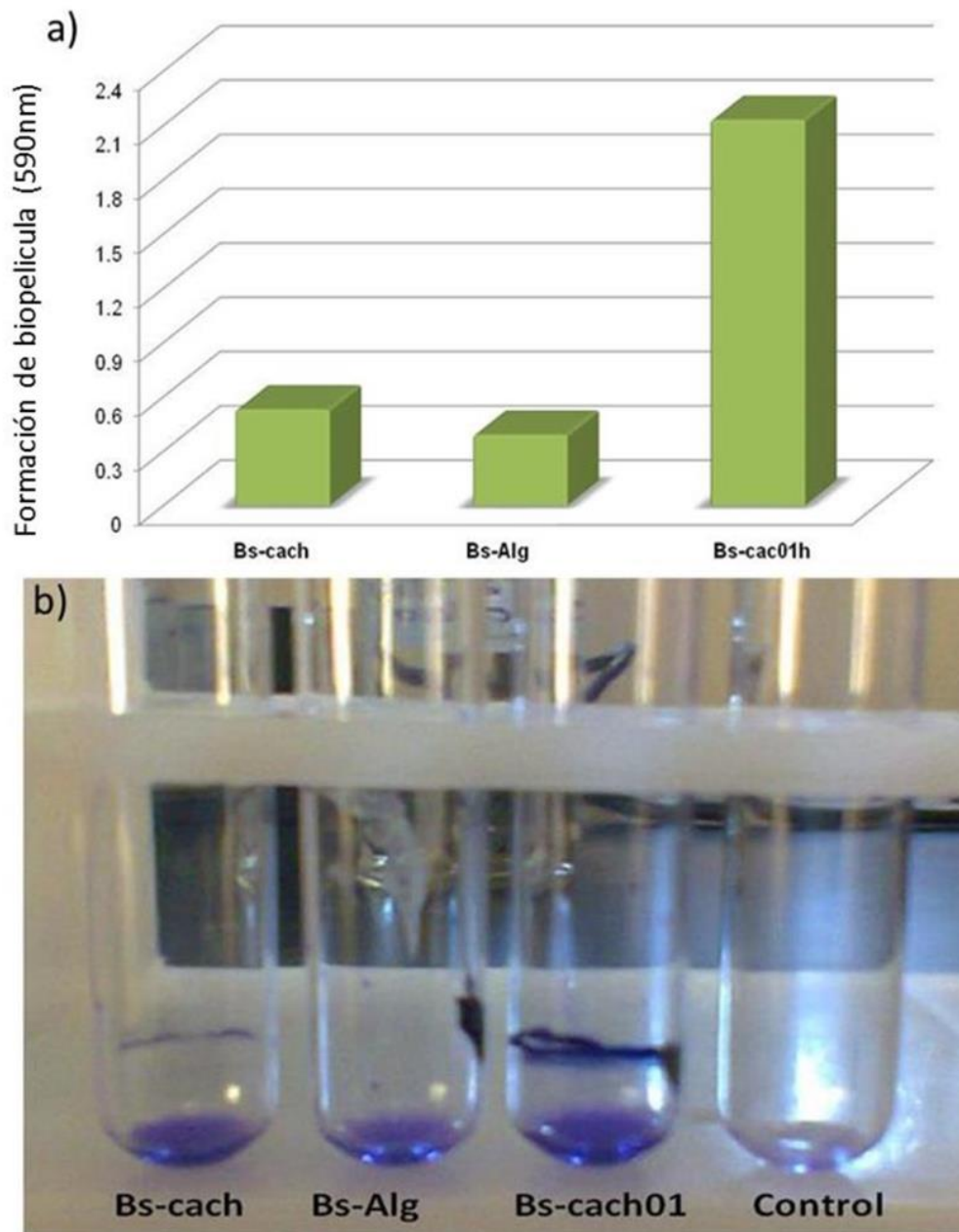
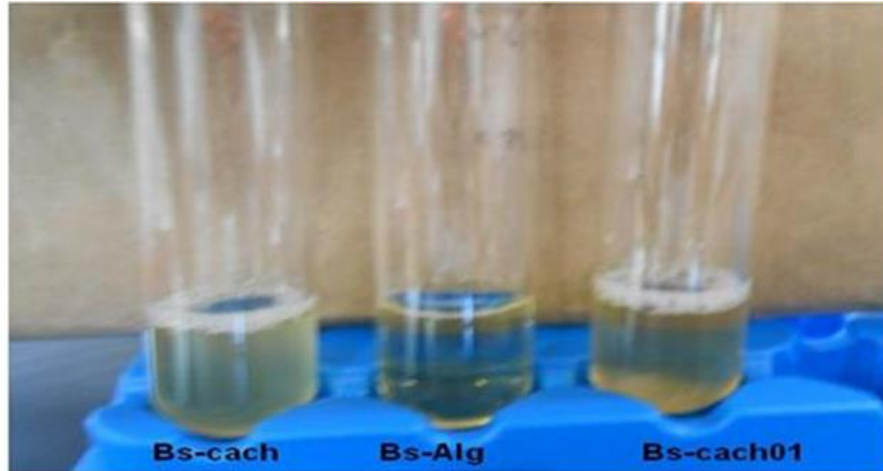


Figura 25. Formación de biopelículas por las cepas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 provenientes de la rizofera de plantas de cachanilla, algodón y salicornia a) formación de biopelícula (590 nm); b) presencia de biopelícula en tubos de vidrio.

a)



b)

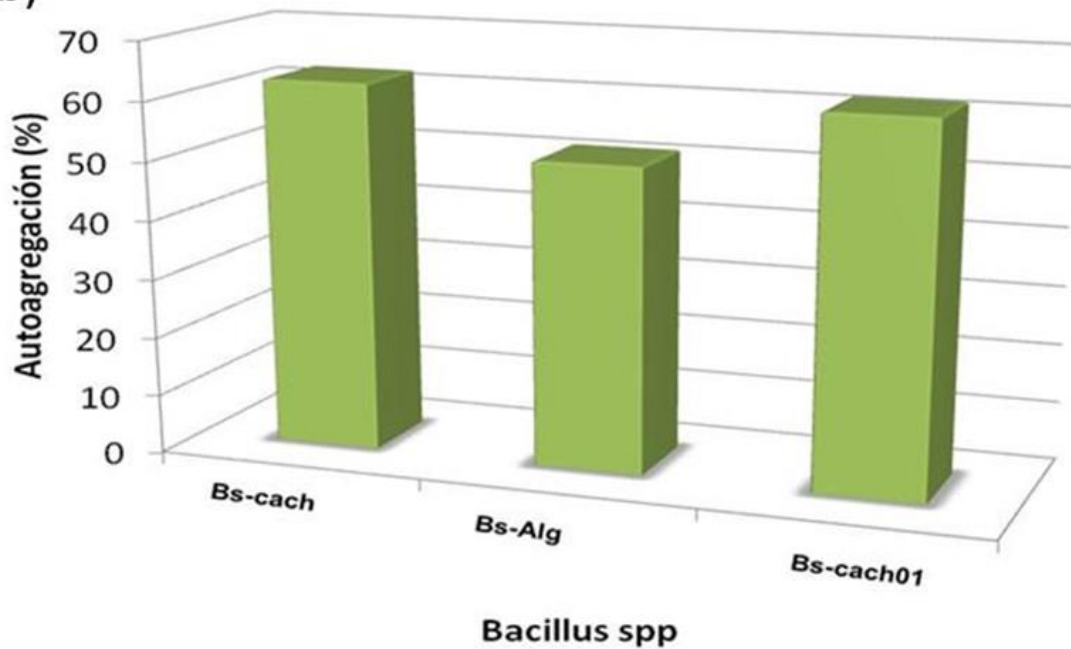


Figura 26. Capacidad de autoagregación de las cepas de *B.subtilis*. a) agregación

Por otra parte, es muy factible que estos compuestos que son lipopolisacaridos y exopolisacaridos en conjunto con moléculas de señalización específicas participen en la autoagregación de las células de las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas.

En este aspecto los resultados mostraron que las tres cepas presentaron una alta capacidad de autoagregación que vario de 60 a 50% en las cepas Bs-cach01, Bs-cach y Bs-Alg, respectivamente (Figura 26). Después de un periodo de 24 de incubación a 35°C. En donde la cepa Bs-Cach01, fue la que mostro la presencia de dos de los tres genes de lipopeptidos evaluados (surfactina e iturina), mayor capacidad de formación de biopelicula y agregación. Lo anterior resulta interesante ya que esta composición por las propiedades de los lipopeptidos encontrados puede favorecer una barrera física contra la difusión de antibióticos y protección contra factores ambientales (Bogino et al., 2013).

4.6. Crecimiento de las cepas de Bs-Cach, Bs-Alg, Bs-Cach01

Una vez que se han identificado de manera concluyente las bacterias, se realizan las curvas de crecimiento así como el conteo de colonias, para cada una de ellas (Bs.Cach, Bs- Alg y Bs-Cach01) por 48 hr de incubación con muestreos cada 2 h a una temperatura de 35°C, en medio caldo soya tripticaseina. Esta información es relevante debido a que ciertos lipopeptidos como iturina y surfactina tienen su mayor biosíntesis durante el inicio y fase intermedia de crecimiento (Ahimou et al.,2000). Como fuente de carbono se usó glucosa en base a los trabajos de Dhouha, et al. (2011), en donde se indica que este carbohidrato mejora la producción de surfactina. Lo anterior contribuirá a definir el tiempo en que se colectaran las muestras de cada cepa para evaluación de su capacidad de producir biosurfactantes.

Las curvas de crecimiento mostraron que la cepa Bs-Cach mostro una tendencia no uniforme a partir de las 8 hasta el final del experimento (Figura 27). Teniendo una tasa de generación por hora (g) de 1.25 (Tabla 10). En donde los valores de UFC/mL se mantuvieron estables a partir de las 18 h hasta las 38 h, en donde se observa la fase de decrecimiento de la bacteria (Figura 28).

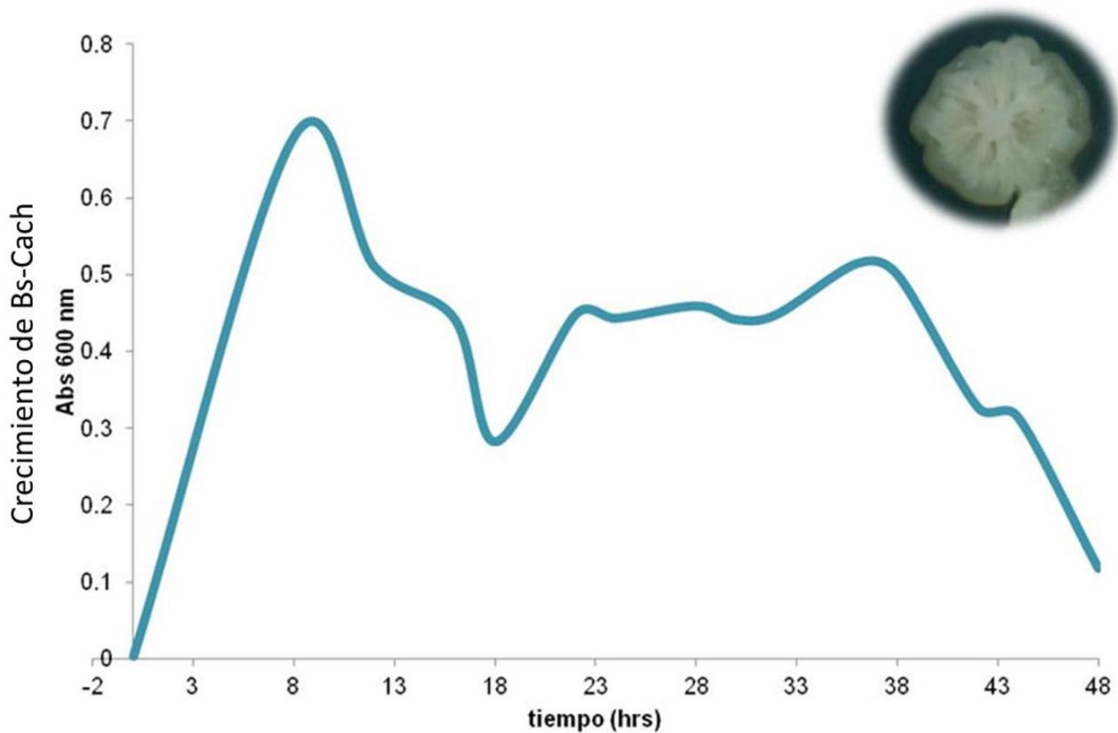


Figura 27. Curva de crecimiento de Bs-Cach a las 48 horas

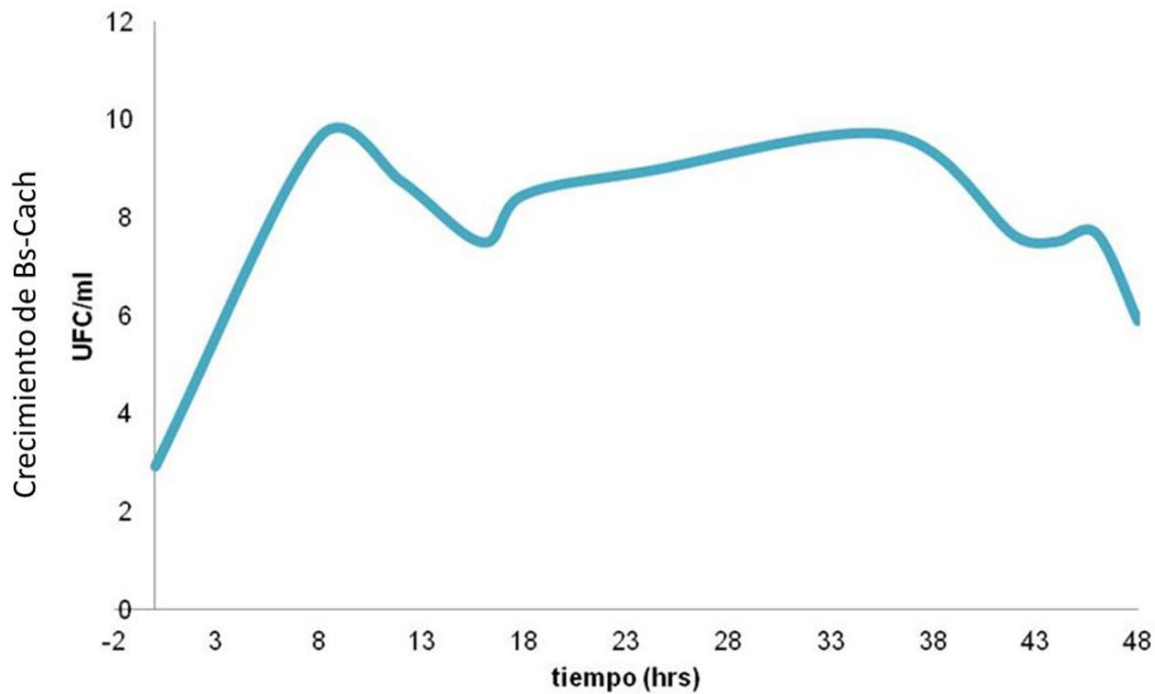


Figura 28. Curva de crecimiento de Bs-Cach a las 48 horas en UFC/mL

En contraste las curvas de crecimiento de la cepa Bs-Alg, que mostro una tendencia una fase de crecimiento exponencial a partir de las 6 hasta las 18 h en donde se aprecia un descenso (Figura 29). Lo cual concuerda con los dato de generaci3n celular que fue de 1.8 h con una tasa de crecimiento (μ) menor a la cepa Bs-Cach (Tabla 10). Los valores de UFC/mL mostraron un comportamiento similar a la curva de crecimiento medida en base a su absorbancia, con 12 UFC/mL entre el periodo de 9 a 15 h y de 8 UFC/mL a partir de las 18 h (Figura 30).

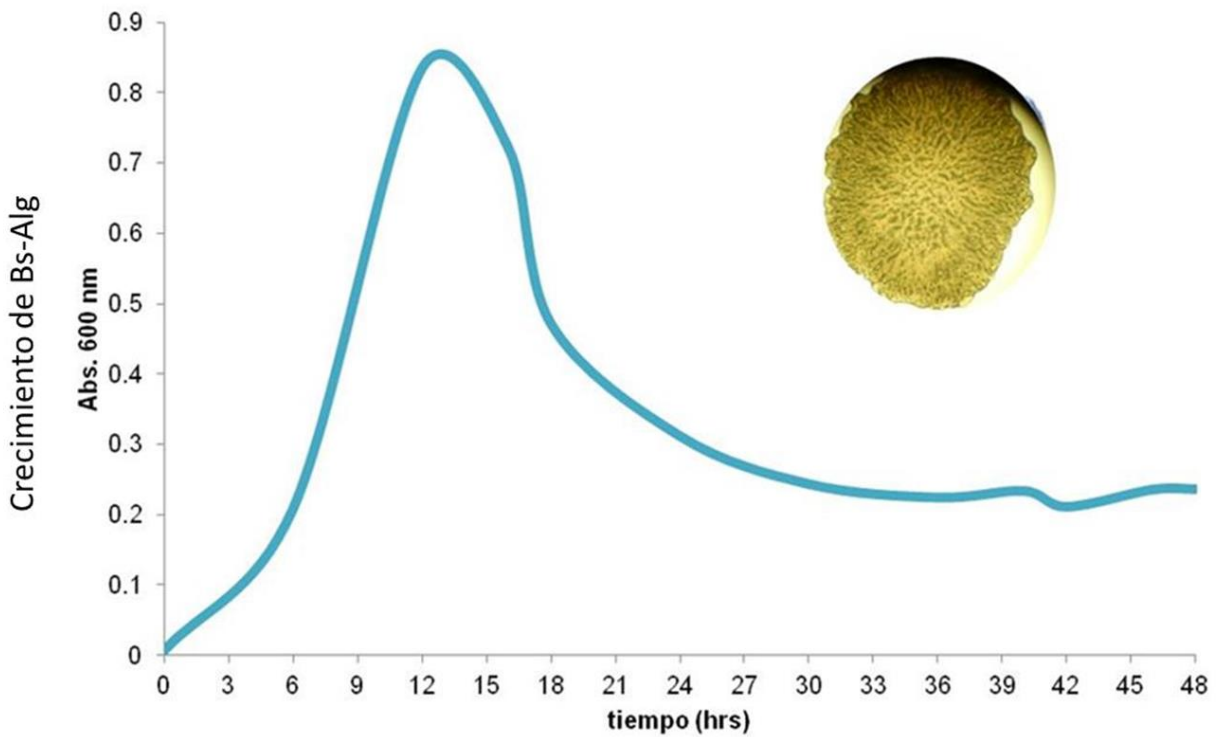


Figura 29. Curva de crecimiento de Bs-Alg a las 48 horas

Tabla 10. Valores de crecimiento calculado a partir de la fase exponencial

Microorganismo	A_{600nm}	μ (h^{-1})	g (h)	N
Bs-Cach	0.6819	0.0851	1.2563	6.36
Bs-Alg	0.7532	0.0685	1.8011	6.66
Bs-Cach01	0.7591	0.0757	1.1780	8.51

μ : tasa de crecimiento, g : tiempo de generación, n : número de generación

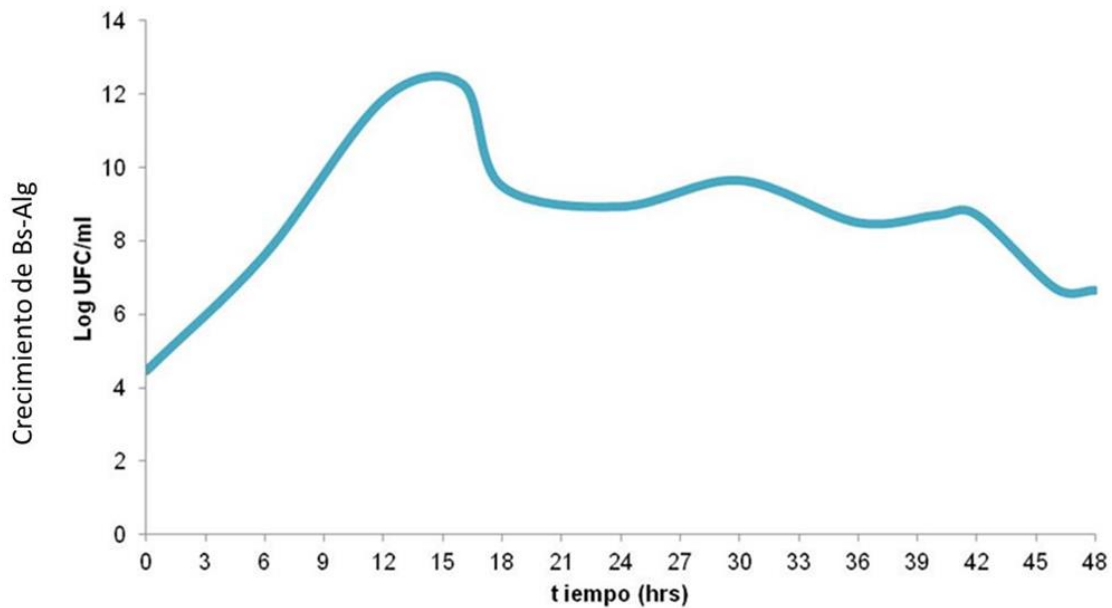


Figura 30. Curva de crecimiento de Bs-Alg a las 48 horas en UFC/mL

Con respecto al crecimiento de la cepa Bs-Cacho1 se observó un crecimiento exponencial a partir de las 3 h, finalizando a las 12 h (Figura 31). Lo cual correspondió a una población en 11 UFC/mL (Figura 32). Lo cual fue similar a la cepa Bs-Cach ya que su tasa de generación y crecimiento fueron muy similares entre estas dos cepas (Tabla 10).

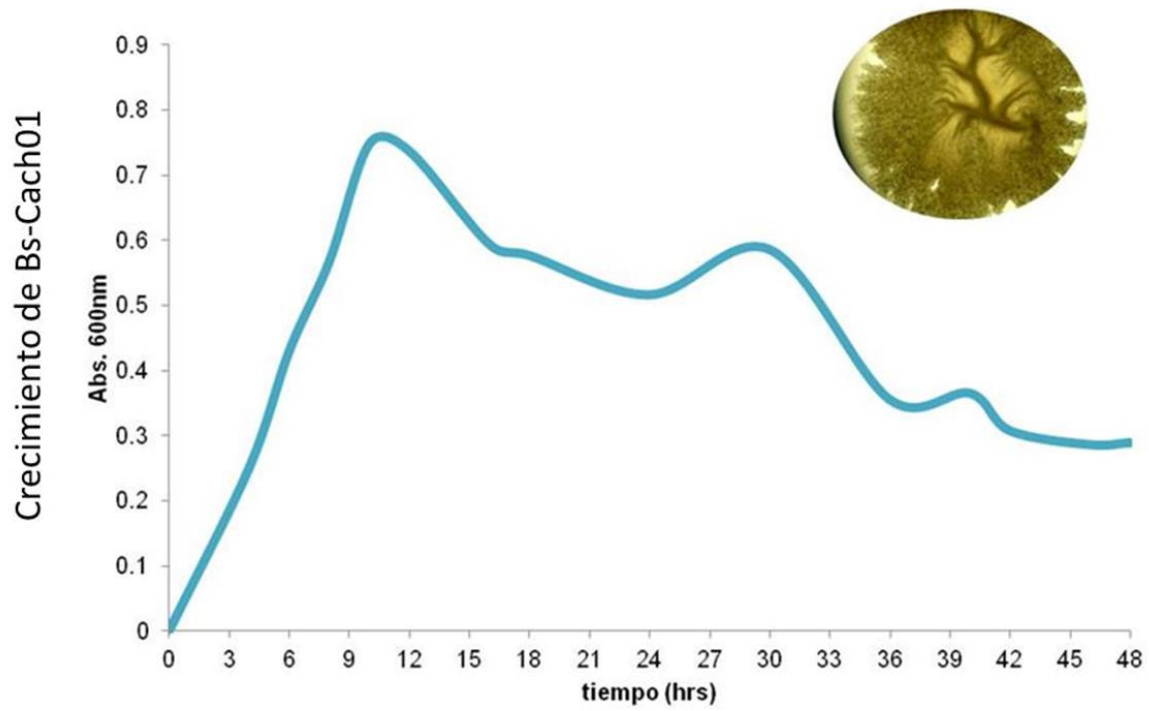


Figura 31. Curva de crecimiento de Bs-Cahc01 a las 48 horas

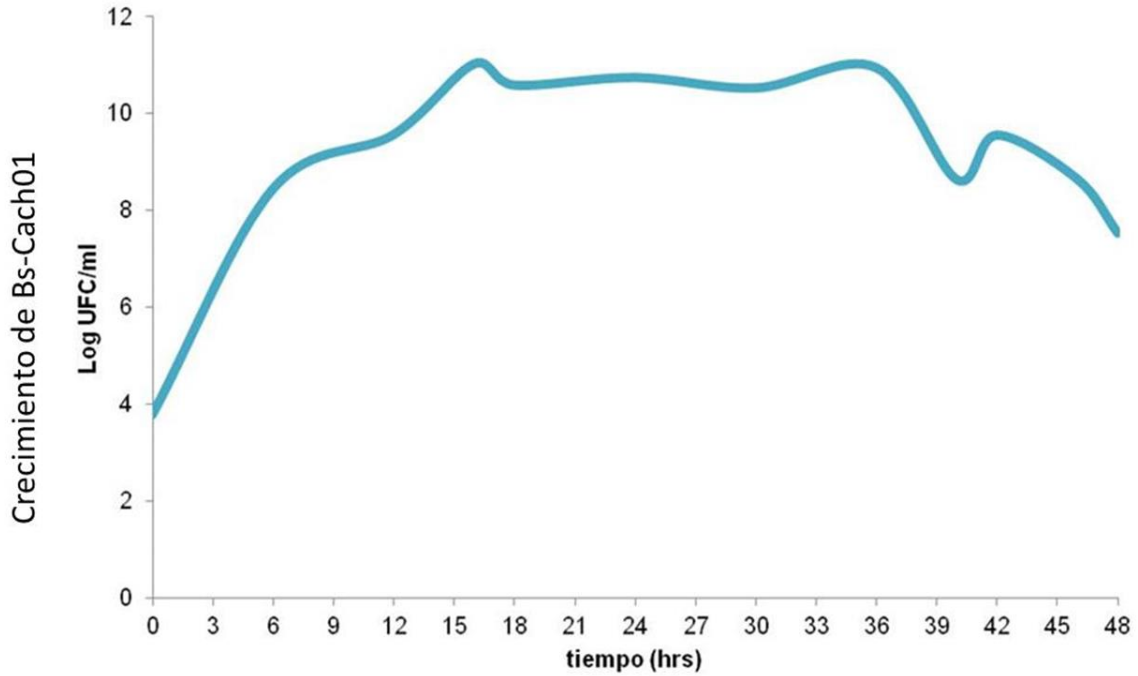


Figura 32. Curva de crecimiento de Bs-Cach01 a las 48 horas en UFC/mL

4.7. Antibiograma en las cepas de *Bs-Cach*, *Bs-Alg*, *Bs-Cach01*

En la Figura 33, que se muestra abajo, se observa que las cepas tienen características similares en cuanto a la resistencia a la penicilina (PE) para el caso de *Bs-Cach01*, ampicilina y penicilina (AM, PE), respectivamente, para el caso de *Bs-Alg*, y por último ampicilina para el caso de *Bs-Cach*.

Aunque existe variación en los patrones de resistencia frente a los antimicrobianos evaluados, estos resultados son similares a reportes por Faria-Reyes et al. (2001) en donde se indica que el género *Bacillus* son generalmente resistentes a las penicilinas y cefalosporinas. Lo anterior es importante ya que aunque estas cepas no son patógenas bajo ciertas circunstancias pueden afectar a la salud de la población como endoftalmitis crónica (Romero-Aroca, 2003).

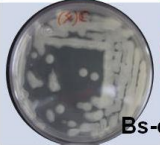

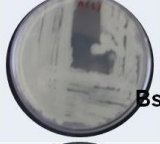

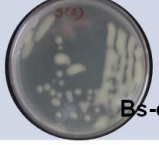

BACILLUS SUBTILIS		INHIBICION	NO INHIBICION
		CF, CL, E, SXT, AK, CRO, GE, NET, FNX, DC, AM	PE
		CF, CL, E, SXT, AK, CRO, GE, NET, FNX, DC.	AM, PE
		CF, CL, E, SXT, AK, CRO, GE, NET, FNX, DC, PE	AM

Figura 33. Prueba de antibiosis en las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas.

4.8. Efecto antagónico de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

Debido a la identificación de genes de lipopeptidos como surfactina, itaurina y subtilisina, en las cepas de *B.subtilis* aisladas, es necesario el poder evaluar las propiedades antimicrobianas de estas cepas. Los resultados mostraron que solo Bs-Cach, mostró una capacidad del inhibición de *Trichoderma longibrachiatum*, de un 100% con respecto al control (Tabla 11).

En donde se puede observar que el crecimiento micelial del hongo fue inhibida por los extractos crudos de ambas cepas usadas evitando el contacto con la superficie del papel en contraste con la muestra que no fue impregnada con los extractos crudos de las cepas (Figura 34 a -b y c-d).

Esto es de relevancia si consideramos que este es un hongo que puede causar problemas de salud, principalmente alergias y biodeterioro de materiales de importancia cultural (Tang et al., 2003; Abrusi et al., 2005). Por lo que el uso de los extractos crudos de esta cepa pueden proporcionar las bases para el desarrollo de un producto biotecnológico para el biocontrol de hongos patógenos.

Tabla 11. Inhibición de *Trichoderma longibrachiatum* por extractos crudos de las cepas de *B.subtilis* aisladas.

Microorganismo	Cm inhibición
Bs-Cach	100%
Bs-Alg	NP
Bs-Cach01	NP

NP. No presento inhibición

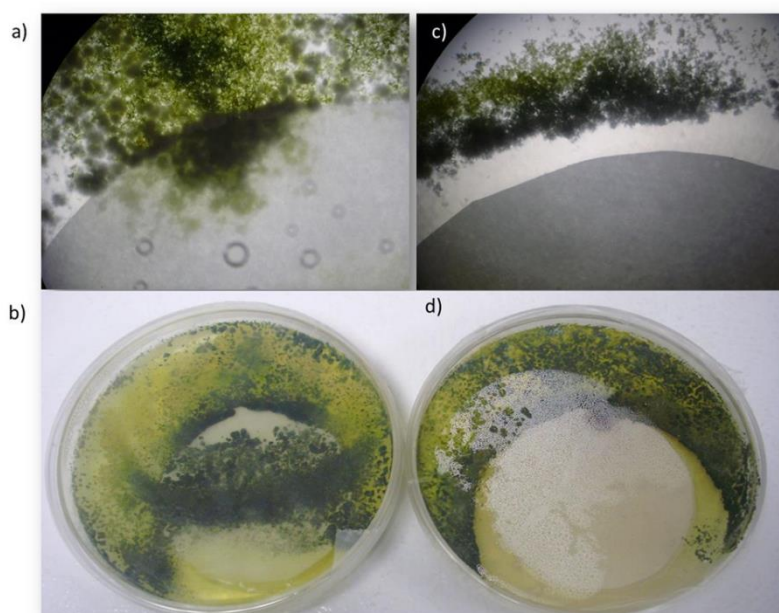


Figura 34. Efecto antagónico de *Bacillus subtilis* cepa Bs-Cach en *Trichoderma longibrachiatum* en disco de papel (40X): a) - b) sin *B.subtilis* y c) -d) con *B.subtilis*

Es importante mencionar que aunque todas las cepas mostraron la presencia de genes de lipopeptidos con actividad antimicrobiano, no necesariamente indica que expresen esos genes. Esto debido a que probablemente los genes se encuentren en el DNA pero no se expresen en las condiciones que se evaluaron.

4.9. Dispersión de aceite por Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

Los resultados de la técnica de dispersión de aceite mostraron que la cepa Bs-Cach presentó los mayores incrementos de dispersión con una zona significativamente superior a las cepas Bs-Alg y Bs-Cach01 respectivamente (Tabla 12). Esto nos indica que los sobrendantes previamente obtenidos libres de Bs-Cach01 y BsCach, muestran la presencia de biosurfactantes. Similares resultados fueron observados por Tomar et al. (2014) y Youssef et al. (2004) en donde observaron variaciones en la dispersión del aceite al probar diferentes aislados microbianos. Por otra parte, en el presente estudio no se evaluó la concentración de cada uno de los biosurfactantes obtenidos de las cepas aisladas contra la actividad de dispersión del aceite. Morikowa et al. (2000) reporta que el área de desplazamiento del aceite es directamente proporcional a la concentración del biosurfactante en la solución.

El mecanismo de acción por el cual el biosurfactante actúa sobre el desplazamiento del aceite no es del todo comprendido a nivel molecular, este ensayo puede ser considerado como un método simple y de bajo costo que permite medir la actividad superficial presente en biosurfactantes crudos (Madhu y Prapulla, 2013).

Tabla 12. Comparación de la eficiencia de dispersión de aceite usando extractos crudos de biosurfactante producidos por Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01.

Biosurfactante	Diámetro de la zona clara (mm) en diferentes aceites			
	Diesel	Maiz	Soya	Olivo
Control (MSM caldo)	0	0	0	0
Bs-Cach (Cachanilla)	17.97±0.22 ^a	20.6±0.56 ^a	9.72±0.56 ^a	26.27±1.70 ^a
Bs-Cach-Alg (Algodón)	0.76±0.67 ^b	7.03±0.50 ^b	6.25±0.42 ^b	7.80±0.54 ^b
Bs-Cach01(Salicornia)	7.15±0.54 ^c	9.24±0.55 ^c	6.58±0.38 ^b	10.80±0.70 ^c

Resultados son expresados como medias± desviación estándar de tres replicas. Valores con la misma letra en columna son iguales de acuerdo a Tukey (P≤0.05).

4.10. Actividad de emulsificación de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

En el caso del efecto de los biosurfactantes sobre la actividad de emulsificación (AE), los resultados mostraron que los tres biosurfactantes de las cepas Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, presentaron cambios en la densidad óptica de 540 nm (Tabla 13).

Tabla 13 Actividad de emulsificación de biosurfactantes crudos de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 en diferente tipos de aceites.

Biosurfactantes	Actividad emulsificante			
	Absorbancia a 540 nm de los diferentes aceites			
	Diesel	Maíz	Soya	Olivo
Contro (MSM caldo)	0	0	0	0
Bs-Cach (Cachanilla)	0.39 ± 0.009 ^a	0.71±0.001 ^a	0.38±0.004 ^a	0.50±0.008 ^a
Bs-Cach-Alg (Algodón)	0.007±0.001 ^b	0.04±0.003 ^b	0.075±0.005 ^b	0.0002±0.0004 ^b
Bs-Cach01(Salicornia)	0.044±0.003 ^c	0.16±0.002 ^c	0.19±0.003 ^c	0.037±0.003 ^c

Resultados son expresados como medias± desviación estándar de tres replicas.

Valores con la misma letra en columna son iguales de acuerdo a Tukey (P≤0.05).

No obstante fue la cepa Bs-Cach la mostro un alta actividad con respecto a los otros tratamiento cuando se expuso a los diferente sustratos usados en el experimento (aceite de maíz, olivo soya y diésel).

En contraste las cepas Bs-Cacho1 y Bs-Alg, mostraron una nula actividad cuando se evaluaron con aceite de olivo y diésel principalmente. Por otro lado, Bs-Cach fue la única cepa que mostró una actividad de emulsificación alta (EA) en maíz, oliva, soya y diesel (p≤0.05) con respecto a los otros tratamientos.

Estos resultados observados en B-Cach fueron superiores a los reportados por Olteanu et al. (2011) cepas de *Bacillus* spp., aisladas de diferentes fuentes.

Sin embargo, la AE del sobrenadante de cultivo de la cepa Bs-Cach fue inferior a los de *B. subtilis* y *B. licheniformis* B6 B5 cuando se utiliza maíz y aceite de girasol pero no con aceite de oliva (Sifour et al., 2005). Estos resultados indican que la cepa Bs-Cach posee propiedades tensoactivas y emulsionantes con respecto a las otras cepas evaluadas en el presente estudio.

Aunque es importante considerar que a pesar de que el desplazamiento de aceite, y el uso de la actividad de emulsificación son importantes en la detección de agentes tensoactivos biológicos en medios de cultivo. Estos ensayos son insuficientes para la diferenciación de bioemulsionantes y de biosurfactantes.

Esto es debido al hecho de que bioemulsionantes son mejor conocidos por su emulsificación de líquidos sin cambios significativos en la superficie o tensión interfacial de su medio de crecimiento (Satpute et al., 2008). Esto podría explicar los resultados observados en B-Cach01 y B-Alg con respecto a la actividad de emulsificante y ensayo de dispersión de aceite.

4.11. Índice de emulsificación (E_{24}) de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

Por su parte los valores del índice de emulsificación (E_{24}), mostraron que todas cepas Bs-Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg, presentaron un índice de emulsificación superior al 40% en los diferentes tipos de aceites (Tabla 14.).

Únicamente las cepas Bs-Alg y Bs-Cach01 mostraron valores menores a un 40% con diésel y aceite de soya, respectivamente.

Tabla 14. Porcentaje del Índice de emulsificación de biosurfactantes crudos de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01 en diferente tipos de aceites.

Biosurfactantes	Índice de emulsificación (E ₂₄) %			
	Diesel	Maíz	Soya	Olivo
Control (MSM caldo)	0	0	0	0
Bs-Cach (Cachanilla)	46 ^a	48 ^a	39.2 ^a	47.3 ^a
Bs-Cach-Alg (Algón)	32 ^b	43.7 ^b	40 ^a	41.2 ^b
Bs-Cach01(Salicornia)	48 ^c	49.4 ^c	33 ^b	47.3 ^c

*Resultados son expresados como medias de tres replicas.

Por otra parte en la presente investigación se detectó que la actividad biosurfactante y bioemulsionantes de *Bacillus subtilis* (B-Cach) aisladas de raíces de las plantas Cachanilla puede formar una emulsión estable con aceites utilizados en la industria alimentaria.

Esto es interesante porque el aislamiento de bacterias productoras de biosurfactantes de plantas nativas del valle Mexicali puede tener un potencial en la producción de biosurfactantes y bioemulsionantes que se puede aplicar a la industria alimentaria.

4.12. Análisis por IR de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01

En el presente estudio el análisis de espectrometría de infrarrojo de cada uno de los biosurfactantes extraídos de Bs-Cach, Bs-Alg y Bs-Cach01, se realizó en un rango de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Los resultados mostraron que el extracto crudo de biosurfactante procedente de Bs-Alg (Figura 35). Presento dos bandas a 1634 y 1554 cm^{-1} , que corresponde a enlaces C-N que forma parte del enlace peptídico posiblemente de amida procedente de restos celulares. La presencia de una banda a 3277.46 cm^{-1} , corresponde a un enlace O-H y la amplitud mostrada son debidas a la alta presencia de estos. Por otra parte la banda de 2159.7 nos indica presencia de grupos alifáticos. En su caso la banda 1975.13 cm^{-1} indica la presencia de triples ligaduras o un grupo nitrilo, las señales 1534.54 cm^{-1} , 1366.69 cm^{-1} nos indica un núcleo bencénico y grupos O-CO-CH₃, 1050.84 cm^{-1} y 925.1 cm^{-1} , indican posibles de estiramiento de C-C, C-N y C-O. Así como 824.32 cm^{-1} , nos muestra la posible presencia de flexiones que depende de la presencia de hidrógenos libres. .

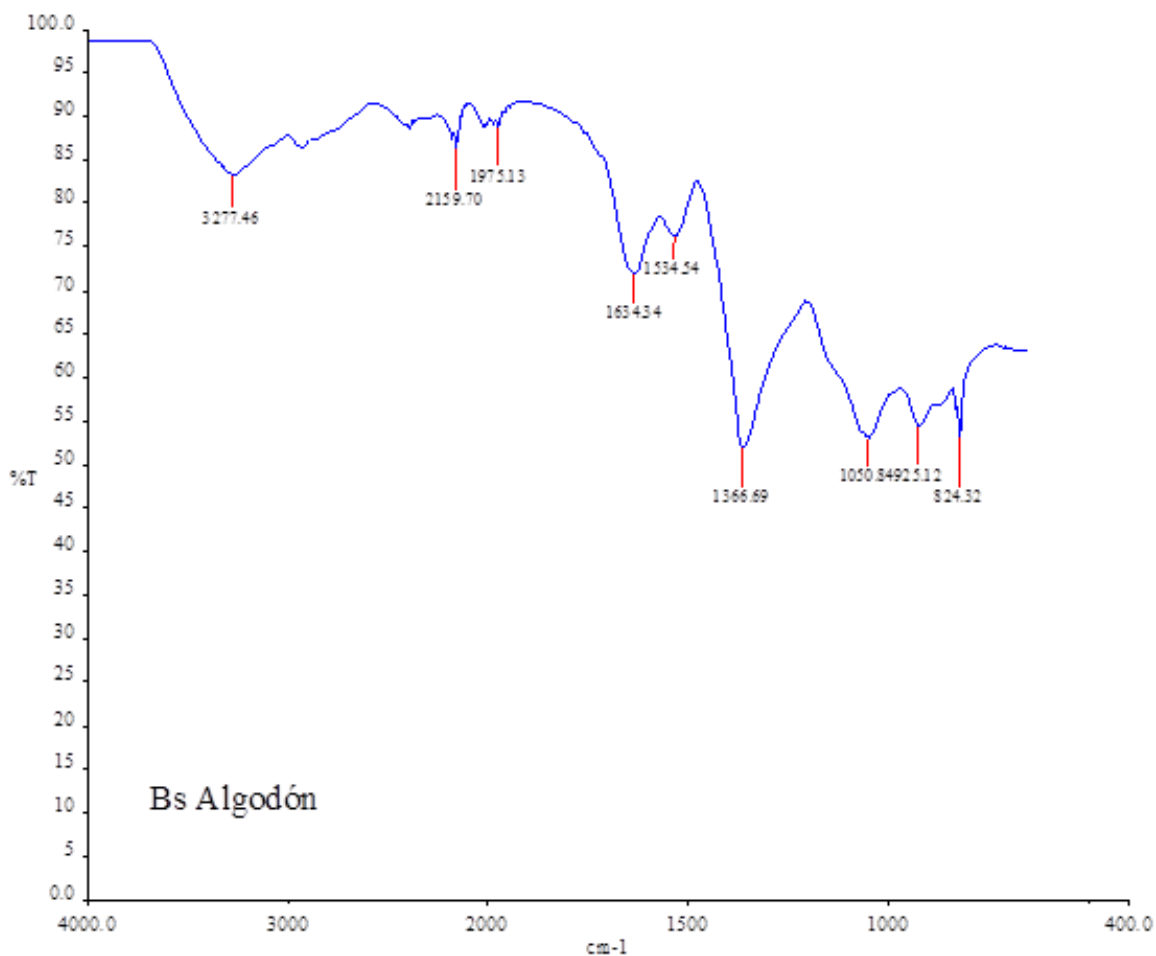


Figura 35. Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Alg (algodón).

Por su parte el presente estudio el análisis de espectrometría de infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante Bs-Cach (Figura 36). Indicaron la presencia de uniones de O-H (3118.91 cm^{-1}), y un estiramiento de grupos -C=C-H (2160.32 cm^{-1}). La presencia de bandas de 1644.52 cm^{-1} nos sugiere la presencia de anillos aromáticos y bandas de baja intensidad en grupos de cadenas alifáticas, CH_3 , CH_2 ($1372, 1253.35, 1120.8\text{ cm}^{-1}$).

Las bandas nos muestra algunos proceso de estiramiento 1061.97, 951.72, 824.22, cm^{-1} , nos indican posibles de estiramiento de C-C, C-N y C-O. Así como 863.54 cm^{-1} , nos muestra la posible presencia de flexiones que depende de la presencia de hidrógenos libres. Así mismos estos resultados son comparables a biosurfactantes producidos por otras cepas de *Bacillus* sp (Thanuyavaran et al., 2006).

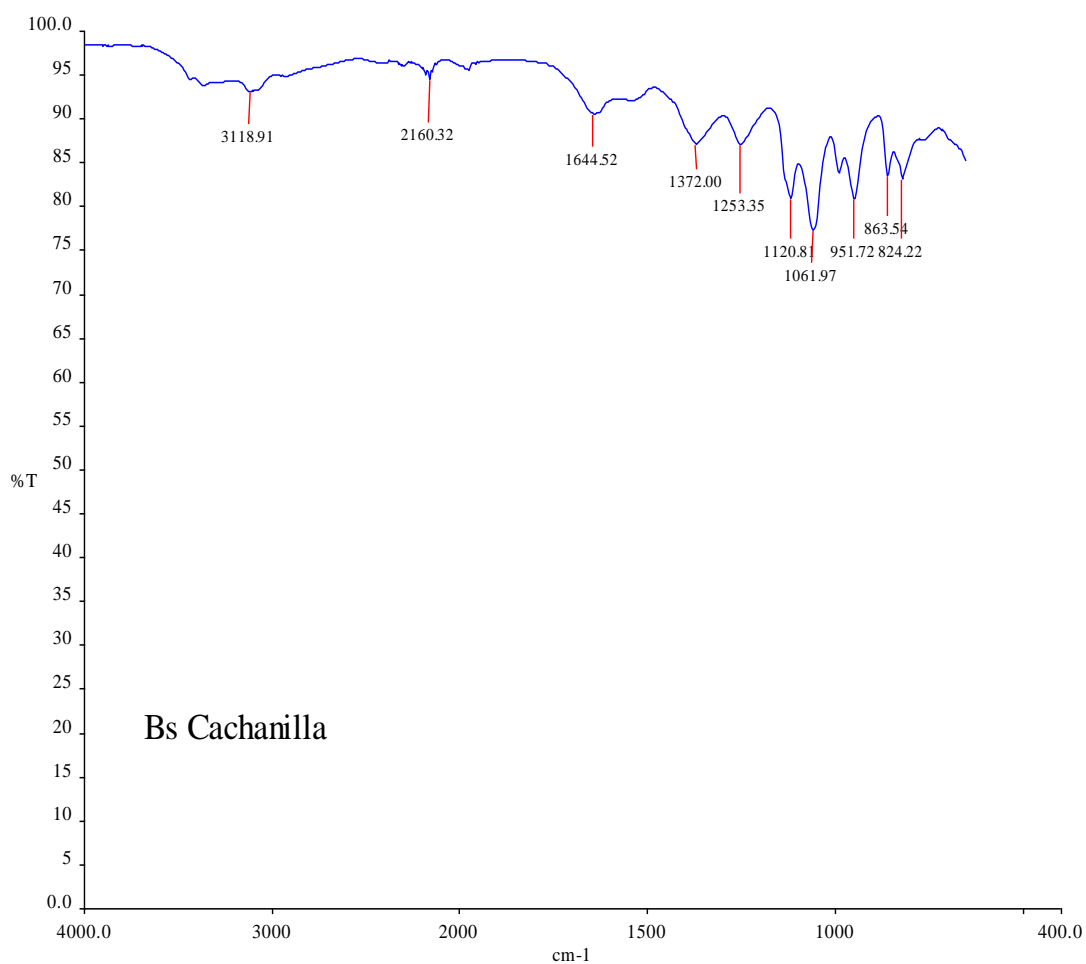


Figura 36. Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Cach (cachanilla).

Por su parte el presente estudio el análisis de espectrometría de infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante Bs-Cach01 (Figura 37).Mostraron la presencia de estiramiento de grupo C=C-H (3267.3 cm^{-1}), y un estiramiento de CO-N en los grupos amida (1626.23 cm^{-1}). Finalmente, la presencia de bandas de 1377.08 cm^{-1} nos sugiere la presencia de cadenas alifaticas.

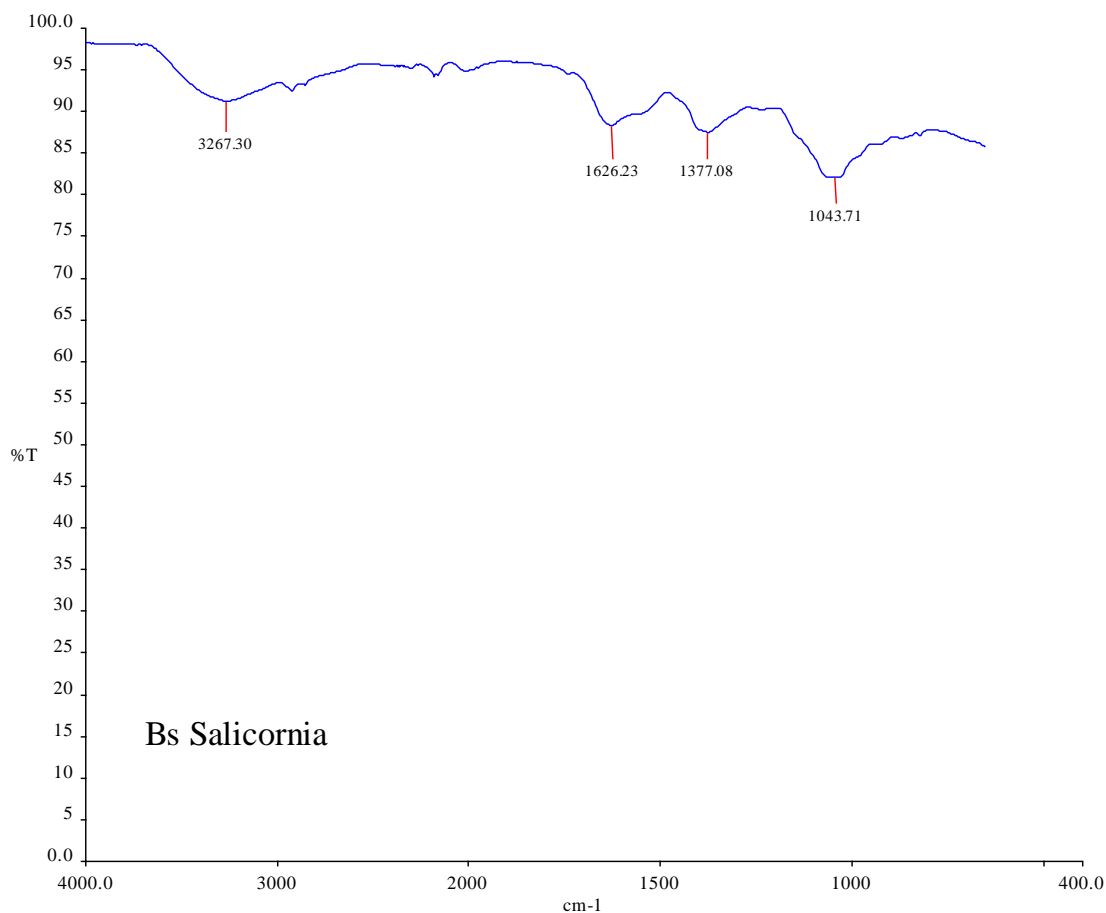


Figura 37. Espectro infrarrojo de los extractos crudos de biosurfactante de Bs-Cach01 (salicornia).

Los resultados de los espectros infrarrojos nos muestran que Bs-Cach01 y Bs-Alg, produce un biosurfactante que posiblemente presenta una estructura similar a surfactina de acuerdo a Sousa et al. (2014) que reportan espectros similares en biosurfactantes producidos por *B.subtilis* LA1005, en condiciones controladas. Adicionalmente, en el presente estudio se observaron bandas características de péptidos y cadenas alifáticas. Lo cual nos indica que los extractos evaluados tienen características estructurales similares a lipopeptidos. Similares resultados han sido previamente reportados en *B. subtilis* y *B. licheniformis*, en donde los autores no encuentran diferencias significativas en el espectro IR de los biosurfactantes producidos por las cepas bacterianas y los estándares usados (El-Sheshtawy et al., 2015). No obstante, estudios como resonancia magnética protón nuclear (^1H NMR) y técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas (MALDI-TOF) son necesarios, para identificar de forma completa la estructura molecular de lipopeptidos presentes en las cepas evaluadas.

CAPITULO 5
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró establecer que las plantas nativas o presentes en el valle de Mexicali como cachanilla, salicornia y algodón, presenta en su rizosfera la presencia de microorganismos productores de biosurfactantes. Los cuales con el uso de herramientas moleculares como el uso del 16S ribosomal, permito clasificarlos como *Bacillus subtilis*. La aplicación de técnicas de aislamiento son críticas para lograr un eficiente aislamiento de los microorganismos productores de biosurfactantes.

En este sentido, la técnica de hemolisis resulto ser una técnica preliminar rápida que permitió, la identificación de microorganismos productores de biosurfactantes. No obstante, debido a que no todos los biosurfactantes presentan actividad hemolítica, el uso de los ensayos como la dispersión de la gota de aceite, actividad emulsificante e índice de emulsificación, complementaron y ayudaron a reconocer la capacidad de las tres cepas de *B. subtilis* de producir biosurfactantes. Estos resultados fueron complementados a nivel molecular basados en la amplificación de secuencias de genes de lipopeptidos, permitió establecer la presencia de forma constitutiva de tres posibles genes de importancia como biosurfactantes, iturina, surfactina y subtilisina.

Lo anterior nos muestra que todas las cepas a un siendo del genero *Bacillus* presentan en menor o mayor grado la capacidad de producir biosurfactantes y que

la capacidad de producción podría ser influenciada por la procedencia de las planta de donde se obtiene.

Por otra parte las cepas Bs- Cach, Bs-Cach01 y Bs-Alg mostraron la presencia de lipopectidos en base a la presencia de grupos funcionales de extracto crudo analizado por IR, lo cual nos da indicio de que las tres cepas producen un lipopectido. No obstante futuros estudios son requeridos para confirmar y deducir la composición y estructura molecular exacta.

En base a las respuestas presentadas por las tres cepas aisladas del valle de Mexicali, es posible sugerir que las cepas Bs-Cach 01 y Bs-Cach, podrían tener una posible aplicación en el área de alimentos debido a la presencia de lipopectidos con propiedades anti fúngicas. Sin embargo, estudios encaminados a evaluar su incorporación en el proceso de formulación de alimentos tienen que ser realizados.

El estudio sobre la diversidad microbiana en el valle de Mexicali presenta un potencial biotecnológico en el área alimentaria que podría abrir nuevas líneas de investigación en el desarrollo de nuevos productos derivados del contenido de metabolitos secundarios de microorganismos nativos. En este aspecto la diversidad de microorganismos productores de biosurfactantes en el valle de Mexicali es poco conocida y estudios encaminados a su identificación son necesarios.

CAPITULO 6

LITERATURA CITADA

Khopade A., R. Biao b , X. Liu b , K. Mahadik a , L. Zhang b , C. Kokare. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis* sp. B4. *Desalination* 285 198–204.

A. M. Hernandez-Anguiano, T. V. Suslow, L. Leloup and C. I. Kado. 2004. Biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* and soft-rotting of harvested florets of broccoli and cauliflower. *Plant Pathology*. Volume 53, Issue 5, pages 596–601, .

Aguilar, L. A. 1998. Caracterización microbiológica y fisicoquímica de suelos de islas de fertilidad de mezquite en un ecosistema semiárido. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad del Estado de Guanajuato, Irapuato, Guanajuato, México, D. F. 152 p

Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A, Shibulal B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Feb 1;114:324-33. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.022. Epub 2013 Oct 1.

Amézcuca-Vega C, Ferrera-Cerrato R, Esparza-García F, Ríos-Leal E, Rodríguez-Vázquez R. 2004. Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *Pseudomonas putida*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. ;39(11-12):2983-91.

Andrea Franzetti, Patrizia Di Gennaro, Alessandro Bevilacqua, Maddalena Papacchini, Giuseppina Bestetti.(2003). Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere* Volume 62, Issue 9, March 2006, Pages 1474–1480.

ANGELES, Martínez-Toledo and REFUGIO. 2013, Rodríguez-Vázquez. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* [online]., vol.44, n.2 [cited 2015-07-15], pp. 595-605.

Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS ,(2000). *Potential Appl Microbiol Biotechnol.*; 53: 495-508.

C. O. Rangel-Yagui, A.-Jr, and L. Costa Tavares. Micellar solubilization of drugs. (2005). *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspscanada.org) 8(2):147-163.

C.R. Kokare, S.S. Kadam, K.R. Mahadik, B.A. Chopade. on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S. *Indian J. Biotechnol*, 6 (2007), pp 78-84.

Cameotra, S.S. & J.M. Bollag (2003) Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycycli aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Environment Science and Technology*. 30: 111-126.

Caroline, M.M., Christian, P., Hannes, C.S., Boris, K., and Ilhan A.A. (2008) Inhibition and Promotion of Copper Corrosion by CTAB in a Micro reactor System. *Langmuir*, 24, p. 14269.

Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SI, Giuliatti AM. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.1996;12(1):82–84.

Carvajal Muñoz, Juan Sebastián. (2011). Fotocatálisis heterogénea para el abatimiento de tensoactivos aniónicos en aguas residuales. *Producción + Limpia*. Vol.6, No.2 - 92•107.

Cauvain SP, editor. *Bread making improving quality*, Cambridge: Woodhead, Publishing Limited; 2003.

Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin.

Charles B.B. Farias, Aline Ferreira Silva, Raquel Diniz Rufino, Juliana Moura Luna, José Edson Gomes Souza, Leonie Asfora Sarubbo Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent .Open Access. *Electronic Journal of Biotechnology* Volume 17, Issue 3, May 2014, Pages 122–125.

Chokshi U, Selvam P, Porcar L, da Rocha SR. *Int J Pharm.* 2009 Mar 18;369 (1-2):176-84.

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 226:1065–1073.

Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology.* 1987;53(2):224–229.

Crowley MM. Solutions, emulsions, suspensions, and extracts. In: Troy DB, editor. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 21st ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2006. pp. 745–775.

Csáki K.F. Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. *Medical Hypotheses.* Volumen 76, Issue 5, Mayo 2011, Pages 676-681.

D. Jiménez Islas, S. A. Medina Moreno Y J. N. Gracida Rodríguez. (2010). Revisión/Review Propiedades, Aplicaciones Y Producción De Biotensoactivos *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26 (1) 65-84, 2010.

D.R. Husain, M. Goutx, M. Acquaviva, M. Gilewicz, J.C. Bertrand. The effect of temperature on eicosane substrate uptake modes by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617: relationship with the biochemical

content of cells and supernatants. *World J Microbiol Biotechnol*, 13 (1997), pp. 587–590.

DAVID G. COOPER* AND BEENA G. GOLDENBERG. (1990). Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Feb. 1987. p. 224-229.

Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, Younes SB, Cherif S, Ferhat S, Mhiri N, Chamkha M, Sayadi S. *J Basic Microbiol*. 2012 Aug;52(4):408-18. doi: 10.1002/jobm.201100268. Epub 2011 Nov 4. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation.

Elena Blanco, Juan M. Ruso *, Gerardo Prieto, Felix Sarmiento. Electrophoretic and spectroscopic characterization of the protein patterns formed in different surfactant solutions (2007). *International Journal of Biological Macromolecules* 42 (2008) 22–26.

Fakruddin Md (2012) Biosurfactant: Production and Application. *J Pet Environ Biotechnol* 3:124. doi:10.4172/2157-7463.1000124.

FERNANDEZ, Leticia Andrea; ZALBA, Pablo; GOMEZ, Marisa Anahí y SAGARDOY, Marcelo Antonio. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. suelo* [online]. 2005, vol.23, n.1 [citado 2015-07-16], pp. 31-37

Fernando G. Sorroche, Mariana B. Spesia, Ángeles Zorreguieta & Walter Giordano. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.07826-11.

Fiechter A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol*. 1992 Jun; 10(6):208-17.

Flores-Gallegos A. C., 2009. Tesis Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del genero *Azotobacter*, Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Investigación en Alimentos.

FORERO, J.; et al. Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. En: CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro. 2005. Vol. 3, no.1.

Freitas, D.B., Mariana P Reis, M.P., LimaBittencourt, C.I.L., Costa, P.S., Assis, P.S., Chartone Souza, E., and Nascimento, AMA. (2008) Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes. 1:92-103.

González, F. A.; Robles, H. L.; Núñez, B. A.; Strap, J. L. and Crawford, D. L. 2009. Molecular and cultural analysis of seasonal actinomycetes in soils from *Artemisia tridentata* habitat. Phytom. Buenos Aires. 78:83-90.

Gonzalez-Mendoza, D., Quiroz-Moreno, A., Zapata-Perez, O. An improved method for the isolation of total RNA from *Avicennia germinans* leaves., Z. Naturforsch. C 2008; 63: 124-126.

Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA and Rodrigues LR (2015) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.* 6:59. doi: 10.3389/fmicb.2015.00059. 3 Biotech. February 2014, Volume 4, Issue 1, pp 41-48,

Guerra-santos, L. H, Käppeli, O, & Fiechter, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol.* (1986). , 24(6), 443-8.

Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E, Reyes-Valdés MH. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y

Phytophthora capsici Leonina y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) Rev Mex Fitopatol. 2006;24:105–114.

Gustavo Yañez-Ocampo , Arnaldo Wong-Villarreal. Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas BioTecnología, Año 2013, Vol. 17 No. 3 12-28.

Hait, S.K. and Moulik, S.P. (2002) Gemini Surfactants: A Distinct Class of Self-Assembling Molecules. Current Science, 82, 1101-1111.

Hany M. Abd El-Lateef, I. T. Ismayilov, V. M. Abbasov, E. N. Efremenko, L. I. Aliyeva, E. E. Qasimov. Green Surfactants From the Type of Fatty Acids As Effective Corrosion Inhibitors for Mild Steel in CO₂ - Saturated NaCl Solution, American Journal of Physical Chemistry. Vol. 2, No. 1, 2013, pp. 16-23. doi. 10.11648/j.ajpc.20130201.13.

Harayama, Y. Kasai, A. Hara. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Curr Opin Biotechnol, 15 (2004), pp. 205–214.

HASENHUETTL, G. (2008); Synthesis and Commercial Preparation of Food Emulsifiers, en: Food emulsifiers and their applications; G.HASENHUETTL & R. HARTEL (eds.); New York; Springer 11-37 p.

Hasmik Hayrapetyan a,b , Lisette Muller a, Marcel Tempelaars a,b , Tjakko Abee a,b , Masja Nierop Groot. (2015), Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. International Journal of Food Microbiology 200 (2015) 72–79.

Hasmik Hayrapetyan, Lisette Muller, Marcel Tempelaars, Tjakko Abee, Masja Nierop Groot. (2015) Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. International Journal of Food Microbiology 2015, Pages 72–79.

<http://goliath.ecnext.com>, 2003.

Ilori MO, Amobi CJ, Odocha AC. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment *Chemosphere*. 2005 Nov;61(7):985-92.

Janshekar. H. Chang. R. J., Yokose K. and Ma. X. (2007) Surfactant, SCUP Report, SRI. Consulting.

Jin-Feng Liu, Serge Maurice Mbadinga, Shi-Zhong Yang, Ji-Dong Gu² and Bo-Zhong Mu. Review Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 4814-4837; doi:10.3390/ijms16034814 *International Journal of Molecular Sciences* ISSN 1422-0067 www.mdpi.com/journal/ijms.

Jorge Olmos and J Paniagua-Michel os and Paniagua-Michel. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture, *J Microb Biochem Technol* 2014, 6:7.

Joshi S, Bharucha C, Desai AJ. **Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B.** *Bioresour Technol.* 2008 Jul;99(11):4603-8. Epub 2007 Sep 12.

Journal of Environmental Sciences Supplement (2009) S24–S27 Biofilm formation and lipopeptide antibiotic iturin A production in different peptone media ZOHORA Umme Salma* , RAHMAN Mohammad Shahedur, ANO Takashi.

K.Zielnska, K.A Wilk, A. Jezierski, T. Jesionowski. Microstructure and structural transition in microemulsions stabilized by aldonamine-type surfactants, *J. Colloid interfase Sci.*, 321 (2008), pp. 408-417.

Karanth NGK, Deo PG, Veenanadig NK. *Curr Sci*, 1999; 77: 116-126.

Kevin E. Eboigbodin and Catherine A. Biggs, (2008). Characterization of the Extracellular Polymeric Substances Produced by *Escherichia coli* Using Infrared

Spectroscopic, Proteomic, and Aggregation Studies. *Biomacromolecules* 2008, 9, 686–695

Khyati V. Pathak, Hareshkumar Keharia. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR) Open Access. Date: 12 Feb 2013.

Kim PI, Ryu J, Kim YH, Chi YT (2010) Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol* 20:138–145.

Kishore Das, Ashis K. Mukherjee. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry* Volume 42, Issue 8, August 2007, Pages 1191–1199.

Kumar N, Tyagi R (2014) Industrial applications of dimeric surfactants: a review. *J Dispers Sci Technol* 35:1–10

Kumar, A. (2008) Corrosion Inhibition of Mild Steel in Hydrochloric Acid by Sodium Lauryl Sulfate (SLS). *EJournal of Chemistry*, 5, pp.275-280.

L. Zhi, Q. Li, Y. Li, Y. Sun. Self-aggregation and antimicrobial activity of saccharide-cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. Volume 456, 20 August 2014, Pages 231-237.

L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai, H. Kasai. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (2007), pp. 1846–1850.

Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. Microbiology. 5ta. edicion. Ed. McGraw-Hill, 2002, 1025 pp.

Li H, Zhao X, Ma Y, Zhai G, Li L, Lou H.J Control Release. 2009 Feb 10;133(3):238-44.

Li, X., Washenberger, R. M., Scriven, L. E., Davis, H. T., & Hill, R. M. (1999). Phase behavior and microstructure of water/trisiloxane E12 polyoxyethylene surfactant/silicone oil systems. Langmuir, 15(7), 2267-2277.

Logan JW, Moya FR. Ther Clin Risk Manag. 2009 Feb;5(1):251-60.

Łuczyński, J., Frąckowiak, R., Włoch, A., Kleszczyńska, H. and Witek S. (2013). Gemini ester quat surfactants and their biological activity. Cell Mol Biol Lett, Vol.18(1), pp 89-101.

M. Nitschkea, * and S.G.V.A.O. Costa. Biosurfactants in food industry Trends in Food Science & Technology 18 (2007) 252e259.

M. Ongena, P. Jacques (2008), *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol Trends in Microbiology, 16 pp. 115–125.

M. R. Infante, L. Pérez, A. Pinazo, P. Clapés, M. C. Morán, M. Angelet, M. T. García, M. P. Vinardell. Amino acid-based surfactants. Comptes Rendus Chimie, Volume 7, Issues 6–7, June–July 2004, Pages 583–592.

M.R. Swain, R.C. Ray Microbiological Research Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Volume 164, Issue 2, 2009, Pages 121–130

Maneerat S, Bamba T, Harada K, Kobayashi A, Yamada H, Kawai F.. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. Appl Microbiol Biotechnol. 2006 Mar;70(2):254-9. Epub 2005 Jul 30.

Maneerat, S. Biosurfactants from marine microorganisms Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(6) : 1263-1272.

Martínez M. 1998. Manual de Microbiología Ambiental Pontificia Universidad Javeriana. Primera edición.

Masaaki Morikawa. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 101, Issue 1, Pages 1–8.

Menezes Bento F, de Oliveira Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT Jr *Microbiol Res.* Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. 2005;160(3):249-55.

Mishra, A. & Jha, B. (2009). Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*, 100, 3382–3386.

Mohamed Sifour, Majid H. Al-Jilawi and Ghazi M. Aziz, 2007. Emulsification Properties of Biosurfactant Produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1331-1335.

Monteiro, Leila, Mariano, Rosa de Lima Ramos, & Souto-Maior, Ana Maria. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 23-29

Morikawa, M., Y. Hirata, & T. Imanaka (2000) A Study on the structure-function relationship of lipopeptides biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1488: 211-218.

Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*2006;11:509–515.

Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*2006;11:509–515.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.* 2001;60:371–380.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.* 2001;60:371–380.

Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P, 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*, 94: 736-774

N. Kaplan, Z. Zosim, E. Rosenberg. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Environ Microbiol*, 53 (1987). pp 440-446.

Nitschke M, Costa SGVAO. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Tech.* 2007;18:252–259.

Nitschke M, Costa SGVAO. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Tech.* 2007;18:252–259.

Paniagua-Michel Jde J, Olmos-Soto J, Morales-Guerrero ER. Algal and microbial exopolysaccharides: new insights as biosurfactants and bioemulsifiers. *Adv Food Nutr Res.* 2014;73:221-57. doi: 10.1016/B978-0-12-800268-1.00011-1.

Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 2000;38: 246-51.

Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001;6:313-21.

PATINO TORRES, CARLOS and SANCHEZ DE PRAGER, MARINA. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS, HABITANTES DE LA RIZÓSFERA DE CHONTADURO (*B. gassipaes* Kunth). *Rev.Bio.Agro* [online]. 2012, vol.10, n.2 [cited 2015-07-16], pp. 177-187.

Peter M. Murphy* and Tracy Hewat. (1999), Fluorosurfactants in Enhanced Oil Recovery. The Open Petroleum Engineering Journal, 1999 1, 58-61.

Pontes, DS., Lima-Bittencourt, Cl., ChartoneSouza, E., and Nascimento, AMA. (2007) Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34:463-473.

Qingyi Xu,,* Mitsutoshi, Nakajima, Zengshe Liu, and Takeo Shiina. Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application. Int J Mol Sci. 2011; 12(1): 462–475.

R. Atkin, V. S. J. Craig, E. J. Walness, S. Biggs, J. Colloid Interface Sci. 266, 236, 2003.

Rodriguez O. Brito, E. F. Marques, S. G. Silva, M. L. do Vale, P. G., M. J. Araújo, J. E. Rodriguez-Borges, M. R. Infante, M. T. Garcia, I. Ribosa, M. P. Vinardell, M. Mitjans. Physicochemical and toxicological properties of novel amino acid-based amphiphiles and their spontaneously formed cationic vesicles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 72, Issue 1, 1 August 2009, Pages 80–87.

Rodriguez. O. Brito, S. G. Silva, Ricardo M.F. Fernandes, E. F. Marques, J. Enrique-Borges, M. L. C. do Vale. Enhanced interfacial properties of novel amino acid-derived surfactants: Effects of headgroup chemistry and of alkyl chain length and unsaturation. Coloids and Surfaces B; Biointerfaces. Volume 86, Issue 1, 1 August 2011, Pages 65-70.

R. Thavasi, V. R. M. Subramanyam Nambaru, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian and Ibrahim M. Bannat, Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources .Indian J Microbiol. 2011 Jan; 51(1): 30–36. Published online 2011 Jan 25. doi: 10.1007/s12088-011-0076-7 .PMCID: PMC3209860.

R.S. SUGANYA. SCREENING OPTIMIZATION AND PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS FROM BACILLUS AND PSEUDOMONAS SPECIES. (2012). International Journal of Current Pharmaceutical Research. ISSN- 0975-7066 Vol 5, Issue 1.

Rangan, C., & Barceloux, D. G. (2009). Food additives and sensitivities. Disease-a-Month, 55(5), 292–311.

REYHANEH AZARMI AND ALI ASHJARAN. ANTIMICROBIAL EFFECT AND SOME COLOR PROPERTIES OF ANNATTO AS NATURAL DYE ON TREATED SILK FABRIC. *IJBPAS*, May, 2015, 4(5): 2661-2668.

Rodicio M, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 238-45.

Rodicio M, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 238-45.

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chem.* 2006;57:609–618.

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chem.* 2006;57:609–618.

Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, Oliveira R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*. 2006;28(2):109–116.

Rosen M.J. *Surfactants and Interfacial Phenomena* (2004) (3ed., Wiley,2004)(ISBN 0471478180)(455s) (1).

Rosen, M.J. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena*, 3^a ed., John Wiley and Sons, Incorporated, pp, 1-33. ISBN 0471478180, Hoboken, NJ, USA.

S. Zinjarde, A. Pant. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol*, 42 (2002), pp. 67–73.

Sambrook, J., Russel, D.W.2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

Sambrook, J., Russel, D.W.2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York .

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec; 74(12): 5463–5467.

Sarti, Gabriela C., & Miyazaki, Silvia S.. (2013). Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia*, 47(4), 373-383

Sarubbo LA, De Luna JM, De Campos-Takaki GM. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006;9(4):400–406.

Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407:762-764.

Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM, 2010a. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: Timmis KN (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin.

Sonali Sahoo, Sriparna Datta*, Dipa Biswas. Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Advanced Scientific Research*. Sriparna Datta et al, *J Adv Sci Res*, 2011, 2(3): 32-36.

Soto Aquino, Hilda Ventura, Zavala Hurtado, José Alejandro, Pérez Moreno, Jesús, & Camargo Ricalde, Sara Lucía. (2012). Estacionalidad de bacterias y hongos en la rizósfera de dos especies de plantas en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1231-1245.

Stoyanov S.D., Rehage H. y Paunov V.N. (2003). Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Phys. Rev. Lett.* 91, 086102.1-086102.4.

Swaranjit Singh Cameotra, Randhir S Makkar. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 7, Issue 3, June 2004, Pages 262–266.

Syst Appl Microbiol. 2011 Nov;34(7):531-5. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.007. Epub 2011 May 17.

T. Gutiérrez, B. Mulloy, C. Bavington, K. Black, D.H. Green. Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium *Antarctobacter*. Appl Microbiol Biotechnol, 76 (2007), pp. 1017–1026.

Toribio J, Escalante AE, Caballero-Mellado J, González-González A, Zavala S, Souza V, Soberón-Chávez G. Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin. Syst Appl Microbiol. 2011 Nov;34(7):531-5. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.007. Epub 2011 May 17.

Toribio-Jiménez, J., Rodríguez-Barrera, M. Á., Lucena, M. V., Flores, A. B., Segura, D., Wilson-Corral, V., Alfaro, E. F., & Romero, Y. (2014). Production of biosurfactants by bacteria isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. African Journal of Bacteriology Research, 6(4), 23-31.

V. Branzoi, F. Branzoi, M. Baibarac, Mater. Chem. Phys. 65, 288, 2000.

V. Saravanan and S. Vijayakumar (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. J. Acad. Indus. Res. Vol. 1(5).

Vieira, Otilia V. et al. "Surfactants as Microbicides and Contraceptive Agents: A Systematic In Vitro Study." Ed. Yong-Sun Bahn. PLoS ONE 3.8 (2008): e2913.

Vijayakuma, V. S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms. JAIR , 264-268.

Vijayakuma, V. S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms. JAIR , 264-268.

Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007 Feb; 68(3):275-97.

VOLPON, L.; BESSON, F.; LANCELIN, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A₂. *FEBS Letters* 485: 76–80

Wei-Chuan Chen^a, Ruey-Shin Juang^b, Yu-Hong Wei^c Review Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*

Whitehurst RJ, editor. *Emulsifiers in food technology*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2004.

Xiao-Hong Cao,^{1,*} Zhen-Yu Liao,¹ Chun-Ling Wang,¹ Wen-Yan Yang,² and Mei-Fang Lu. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Braz J Microbiol*. 2009 Apr-Jun; 40(2): 373–379. Published online 2009 Jun 1. doi: 10.1590/S1517-838220090002000030 PMID: PMC3769733.

Yañez-Ocampo, Arnoldo Wong-Villarreal. *BioTecnología Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas* Gustavo, Año 2013, Vol. 17 No. 3 12-28.

Yegorenkova IV, Tregubova KV, Matpra L Yu et al (2010) Use of ELISA with antiexopolysaccharide antibodies to evaluate wheat-root colonization by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Curr Microbiol* 61:376-380.

Yegorenkova IV, Tregubova KV, Matpra L Yu et al (2010) Use of ELISA with antiexopolysaccharide antibodies to evaluate wheat-root colonization by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Curr Microbiol* 61:376-380

Yesurethinam , S., B.S.D. Mariathan, V. Subramanian, M. Mariavincent & C. Thavasimuthu (2014) *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic

bacteria isolated from solar salt works in India. Saudi Journal of Biological Sciences. 21: 511-519.

Yesurethinam S, Mariathanan B.S.D, Subramanian V., Mariavincet M., Thavasimuthu C.2014. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. Saudi Journal of Biological Sciences, 21: (6) 511-519.

Yin H, Qiang Y, Jia Y, Ye J, Peng H, et al. (2009) Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil containing wastewater. Process Biochem 44: 302-308.

CAPITULO 7

ANEXOS

Fast Protocol for DNA Isolation of DNA from Bacterial Isolated from a Hyper-arid Environment

Vianey Mendez-Trujillo¹, Lizbeth Moreno-Ramírez²,
Monica Carrillo-Beltran¹ and Daniel González-Mendoza²

¹Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería,
Blvd. B. Juárez s/n, Col. Insurgentes Este, 21280 Mexicali, Baja California, Mexico.

²Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC),
Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León, 21705, Baja California, Mexico.

(Received: 18 January 2013; accepted: 26 February 2013)

The extraction of high quality genomic DNA for PCR amplification from phosphate solubilising microbes (gram positive) is complicated due to the presence of a high percentage of secondary metabolites or PCR inhibitors which bind to or co-precipitate with nucleic acids during DNA extraction. In the present study we report a modified sodium dodecyl sulfate/phenol protocol that includes elimination of lysis solution to the bacteria cell wall and the washing of pellet with ethanol. The present study the relation A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} were of 1.84 ± 0.17 and 1.92 ± 0.62 , respectively. These results showed that the DNA fraction is pure and may be used for PCR analysis future. To confirm this, the DNA's purity was evaluated across a PCR amplification of fragment of the 16S gene using cell's biomass from native phosphate solubilising bacteria (gram positive). Finally, the advantages of this procedure is that in the DNA extraction is not necessary the use of Proteinase K, and sonication to lyse samples prior to or in conjunction with lysis solutions.

Φ Y T O N

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY
REVISTA INTERNACIONAL DE BOTANICA EXPERIMENTAL

ISSN 0031 9457

Founded 1951 by *Fundada en 1951 por*

Miguel Mario Raggio & Nora Moro de Raggio

Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Busso

Publicada por/ *Published by*: FUNDACIÓN RÓMULO RAGGIO

Director General: Dr. Mario Miguel Raggio

Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA) ARGENTINA

TEL: 54-11-4796-1456 / TELFAX: 54-11-4791-0868

www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar / fund_r_raggio@hotmail.com

FECHA: 8 de julio de 2015

Daniel Gonzalez-Mendoza daniasaf@gmail.com

Instituto de Ciencias Agrícolas

Universidad Autónoma de Baja California

Carretera a Delta s/n Ejido Nuevo León

21705, Baja California

México

De nuestra mayor consideración:

Tenemos el agrado de informarle que el manuscrito “**Bacteria with capacities of production of biosurfactants isolated from natives plants of Baja California, México**”

por los autores: **Vianey Méndez-Trujillo, Mónica Carrillo-Beltrán, Benjamin Valdez-Salas y Daniel Gonzalez-Mendoza** ha sido aceptado para publicación en el **Vol. 85 (2016)** de ΦYTON INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY.

Saludamos a Ud. muy atentamente,

Alejandra Krüsemann de Raggio

Por los Editores de ΦYTON



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
A través de la Coordinación de Formación Profesional y Vinculación Universitaria



Otorga el presente

Reconocimiento

Al proyecto:

Bacillus subtilis

Por haber obtenido

Tercer lugar

En *1er. Concurso de Creatividad e Innovación* de la Universidad Autónoma de Baja California,
Categoría de Invención, nivel Posgrado

Mexicali, Baja California, a 22 de noviembre de 2013

Saúl Méndez Hernández
Coordinador de Formación Profesional
y Vinculación Universitaria