

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA

BIOINGENIERÍA



“SUSTANCIAS BIOACTIVAS (BIOSURFACTANTES Y SIDERÓFOROS)  
PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS DE SUELO ÁRIDO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOINGENIERO PRESENTA:

JOSE ALBERTO VALENZUELA AVILES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ASENETH HERRERA MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO AMÍLCAR SOLÍS DOMÍNGUEZ

## ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN.....	4
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo General.....	5
2.2. Objetivos Específicos. ....	5
3. HIPÓTESIS.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	6
4.1. Suelos Desértico Salinos.....	6
4.1.1. Laguna Salada.....	6
4.2. Microorganismos de Ambientes Extremos.....	8
4.2.1. Microorganismos Halófilos.....	10
4.2.2. Microorganismos Alcalófilos .....	12
4.3. Metabolismo Microbiano.....	15
4.3.1. Metabolismo Secundario .....	17
4.4. Surfactantes.....	19
4.4.1. Aplicaciones .....	25
4.5. Sideróforos.....	29
4.6. Bacillus .....	30
4.6.1. Ciclo de vida, esporulación y germinación de los <i>Bacillus</i> .....	30
4.6.2. Estructuras superficiales de <i>Bacillus</i> .....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1. Propagación de aislados microbianos .....	34
5.2. Conservación de aislados microbianos en Glicerol 15% .....	34
5.3. Tinción de Gram .....	35
5.4. Pruebas Bioquímicas.....	36
5.4.1. Motilidad, producción de indol y actividad ornitina descarboxilasa.....	36
5.4.2. Producción de lisina descarboxilasa y sulfuro de hidrógeno.....	36
5.4.3. Fermentación de dextrosa, lactosa y producción de sulfuro de hidrógeno.....	37
5.4.4. Degradación de ADN por actividad desoxirribonucleasa .....	38
5.4.5. Prueba de la Catalasa.....	38

5.5.	Evaluación de tolerancia de los aislados microbianos a valores distintos de pH .	38
5.6.	Evaluación de halotolerancia .....	39
5.7.	Evaluación de capacidad hemolítica.....	39
5.8.	Evaluación de capacidad microbiana para producir sideróforos .....	39
5.9.	Cinética de Crecimiento y producción de biosurfactantes microbianos .....	40
5.10.	Cuantificación de Actividad Tensoactiva .....	41
5.11.	Índice de Emulsificación E24 .....	42
5.12.	Extracción y secuenciación de ADN de los distintos aislados microbianos .....	43
5.13.	Pretratamiento para bacterias Gram Positivas.....	43
5.14.	Protocolo para extracción de ADN .....	44
5.15.	Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) .....	45
5.16.	Electroforesis en gel de agarosa .....	46
5.17.	Purificación de ADN.....	47
5.18.	Comprobación de amplificación por electroforesis y cuantificación de productos de PCR .....	48
5.19.	Secuenciación.....	48
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
6.1.	Identificación microbiológica de los aislados microbianos .....	49
6.2.	Pruebas Bioquímicas.....	52
6.3.	Evaluación de tolerancia de los aislados microbianos a diferentes pH .....	56
6.4.	Evaluación de halotolerancia de los aislados microbianos .....	58
6.5.	Prueba de índice de emulsificación 24 (IE-24).....	59
6.6.	Prueba de hemólisis con agar sangre .....	60
6.7.	Evaluación de producción de sideróforos por los aislados microbianos .....	62
6.8.	Obtención del ADN microbiano .....	65
6.9.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ADN microbianos .....	66
6.10.	Secuenciación y análisis de secuencias de ADN .....	67
6.11.	Cinéticas de Crecimiento .....	68
6.12.	Resultados de Medición de tensión superficial .....	72
6.13.	Secuenciación.....	73
7.	CONCLUSIONES .....	77

## 1. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos de ambientes extremos han generado mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones inhóspitas, dichos mecanismos pueden ser la síntesis de enzimas extracelulares funcionales en condiciones extremas; la secreción de compuestos que incrementen la disponibilidad del carbono o el  $\text{Fe}^{3+}$  como los surfactantes y sideróforos, respectivamente. Modificaciones en la membrana para resistir elevadas presiones osmóticas, acidez o alcalinidad; metabolitos que funcionen como antibióticos, entre otros. Estos microorganismos despertaron el interés en las últimas décadas por la posibilidad de utilizar biomoléculas funcionales en condiciones industriales que actualmente están siendo comercializadas en la industria de alimentos, detergentes, y para remediación de suelos contaminados. Recientemente se han encontrado nuevas biomoléculas y nuevos usos para las ya existentes en aplicaciones médicas, farmacéutica, nanotecnología y en industria de alimentos, principalmente.

La Laguna Salada es un ecosistema poco estudiado desde el punto de vista biotecnológico. Debido a que un mismo microorganismo puede producir diferentes biomoléculas, dependiendo de las condiciones del medio y la fuente de carbono, existe la posibilidad de que en este ecosistema se encuentren microorganismos productores de biomoléculas no conocidas y/o descritas anteriormente. Por lo que es necesario conocer el tipo de microorganismos que habitan este ecosistema y sus adaptaciones fisiológicas que les permiten prevalecer en ese medio, poseen, así como las biomoléculas que producen, las diferencias estructurales de dichas moléculas y las ya reportadas además de las posibles aplicaciones de estas sustancias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Determinar la capacidad productora de biosurfactantes y sideróforos en aislados microbianos obtenidos de suelo de la Laguna Salada, así como identificar el género microbiano al que pertenecen los microorganismos que produzcan alguna o los dos tipos de sustancias bioactivas de interés del presente trabajo.

### 2.2. Objetivos Específicos

Caracterizar morfológica y bioquímicamente los aislados microbianos de suelo árido productores de biosurfactantes y sideróforos.

Evaluar la producción de sideróforos y biosurfactantes de los aislados mediante el establecimiento y seguimiento de cultivos in vitro.

Identificar molecularmente el género microbiano de los aislados capaces de producir biosurfactantes y sideróforos.

## 3. HIPÓTESIS

Los microorganismos que habitan ambientes extremos como la Laguna Salada se han adaptado a las condiciones adversas del ambiente produciendo metabolitos secundarios con potencial interés biotecnológico.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Suelos Desértico Salinos

Los desiertos son zonas áridas con temperaturas extremas donde la precipitación es escasa. Los desiertos salinos son aquellos con elevada concentración de sales y con pH estable cercano a 11.5 (Jones, Grant, Collins, & Mwatha, 1994). Éstos son creados por una combinación de factores geológicos, geográficos y climáticos. Presentan grandes cantidades de carbonato de sodio y otras sales como cloruro de sodio (NaCl) (concentrado por evaporación), generando un ambiente alcalino y salino, algunos de ellos se encuentran en Egipto, el oeste de Estados Unidos, México, China e India (Joshi, et al., 2008; Ninfa, Serrano R., & Sandoval, 2006).

#### 4.1.1. Laguna Salada

La cuenca de la Laguna Salada es una fosa tectónica ubicada en el municipio de Mexicali, Baja California, México, yace en la unión entre la Placa Tectónica Norteamericana y la Placa Tectónica del Pacífico, se localiza entre la Sierra de Juárez y la Sierra de Cucapá, al noreste colinda con el cerro Centinela y al norte con el Salton Trough en California, Estados Unidos. (Contreras, Martín-Barajas, & Herguera, 2005). Es de forma romboide abierta hacia el sur y posee una extensión aproximada de 5,440 km<sup>2</sup> entre los paralelos 32°00'00'' y 32°33'55'' latitud norte y 115°22'00'' y 155°47'00'' latitud oeste del meridiano de Greenwich y tiene una elevación aproximada de 2000 m sobre el nivel del mar (Figura 1) (Compean, et. al., 2016; Cohen & Henges-Jeck, 2001). De acuerdo a su precipitación anual ( $P_{ma}$ , por sus siglas en inglés) con respecto a la precipitación anual

global terrestre ( $P_{agt}$ , por sus siglas en inglés) ( $P_{ma}/P_{agt} < 0.125$ ), esta cuenca está clasificada como una región super-árida (Ponce et al., 2000).



Figura 1 Localización geográfica de la cuenca de la Laguna Salada indicado en rojo.

En el 2015, López Arreguin reportó, en su trabajo de tesis de licenciatura, las características del suelo salino no rizosférico de la Laguna Salada como franco arcilloso y arcilloso, con un pH entre 8.3 y 9.4, conductividad eléctrica entre 71 dS/m y 185

dS/m, contenido de materia orgánica de 0.18 a 1.82%, nitrógeno de 18 a 33 kg ha<sup>-1</sup>, fósforo de 179 a 184 kg ha<sup>-1</sup> y potasio 2.628 kg ha<sup>-1</sup>. Adicionalmente, trabajos de tesis de licenciatura de Ana Cecilia Flores Rendón en el 2015, Irving Padilla Cárdenas y Rafael Saldaña Robles en el 2016, reportan el aislamiento de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) presentes en suelo de la Laguna Salada capaces de producir diversas sustancias bioactivas. Adicional a estos, existe evidencia de sólo un trabajo científico referente a la flora microbiana de suelo proveniente de la región de Baja California; éste describe el impacto de los cambios de estación sobre la diversidad fúngica de Valle de las Palmas (Vargas-Gasteélum et al., 2015).

#### 4.2. Microorganismos de Ambientes Extremos.

Existen organismos, principalmente procariotes (arquea y bacteria) capaces de vivir en ambientes con condiciones fisicoquímicas que la mayoría de los microorganismos encuentra hostiles o letales, a estos microorganismos se les denomina extremófilos. Las condiciones que estos microorganismos soportan varían según el entorno en el que habitan; se ha encontrado vida microscópica en fuentes hidrotermales (112 °C), glaciares (-20 °C), en las profundidades del océano soportando presiones de hasta 110MPa, en ambientes extremadamente ácidos (pH 0) y alcalinos (pH 12.8). Estos ambientes pueden ser naturales o antropogénicos con microorganismos capaces de crecer en ambientes contaminados con desechos tóxicos, solventes orgánicos o metales pesados. (Brito, Piñón-Castillo, & Guyoneaud, 2013).

Los microorganismos extremófilos son clasificados de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas en las que habitan: aquellos que resisten temperaturas elevadas se denominan termófilos, microorganismos cuyo crecimiento óptimo se da a los 40 °C;

hipertermófilos, con temperaturas de crecimiento óptimo a 80 °C o mayores; y psicrófilos, capaces de crecer a temperaturas iguales o menores a 15 °C. Aquellos que requieren concentraciones elevadas de sal para crecer o son capaces de soportarlas se denominan halófilos, los que habitan bajo una presión hidrostática elevada se les llama barófilos y los organismos adaptados a valores de pH extremos son conocidos como acidófilos o alcalófilos por presentar un crecimiento óptimo a valores de pH ácido (pH 1 a pH 5) o básico (> pH 8), respectivamente. Se consideran oligotróficos, los organismos capaces de crecer en ambientes con nutrientes limitados; endolíticos, los que habitan entre rocas o entre los poros de minerales; y xerolíticos a aquellos que crecen en condiciones con poca disponibilidad de agua.

La gran mayoría de estos microorganismos son poliextremófilos, ya que el ambiente que habitan presenta más de una de las condiciones fisicoquímicas extremas antes mencionadas. Los microorganismos extremófilos son de gran interés desde el punto de vista biotecnológico, ya que las biomoléculas extracelulares que producen son resistentes a las condiciones hostiles del entorno, esto ha despertado el interés de estudiar los procesos fisiológicos que dan origen a tal resistencia y las posibles aplicaciones industriales de las biomoléculas.

Los productos celulares más utilizados en la industria son las enzimas, la mayor parte de éstas provienen de organismos mesófilos, lo que restringe su uso debido a que su estabilidad se encuentra limitada a un pequeño rango de temperatura, pH y fuerza iónica. Por el contrario, las enzimas de microorganismos extremófilos se mantienen estables bajo las condiciones fisicoquímicas extremas en las que son llevados a cabo los procesos industriales para obtener edulcorantes, alimentos, en los tratamientos de residuos,

extracción de petróleo y diagnóstico de enfermedades. (Science Education Resource Center at Carleton College, 2016; Rampelotto, 2013; Gupta, et.al. , 2014; Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006).

Los microorganismos presentes en La Laguna Salada, deben presentar adaptaciones fisiológicas que les permitan habitar este ecosistema desértico con salinidad elevada y pH alcalino.

#### 4.2.1. Microorganismos Halófilos.

Como previamente se mencionó, los microorganismos halófilos requieren cierta concentración de NaCl para su crecimiento y pueden ser subclasificados según la concentración de sal que requieran para alcanzar un crecimiento óptimo como: halófilos extremos (>20%), halófilos moderados (10-20%), halófilos débiles (0.5-10%) y halotolerantes (organismos capaces de vivir en condiciones de salinidad, pero no vital para su crecimiento).

Los ambientes extremadamente salinos son inusuales, la mayoría se encuentra en zonas calientes y secas, como los lagos y suelos salinos (sitio de estudio del que deriva el presente trabajo de tesis), así como en alimentos salados: salmueras, salsa de soya y pescado principalmente.

La sal presenta efectos significativos en la solubilidad, salinidad, estabilidad y conformación de las proteínas afectando su funcionamiento. Los organismos halófilos han adaptado su membrana citoplasmática, modificando el tipo de fosfolípidos y ácidos grasos que forman la composición lipídica, acumulan en citoplasma grandes cantidades de compuestos (pueden o no ser iónicos, dando origen a dos mecanismos generales de

acumulación “*salt-in*” y “*salt-out*”) que les ayudan a enfrentar el estrés osmótico característico de ambientes salinos.

El mecanismo *salt-in*, típico de arqueas y haloanaerobiales, ocurre por una acumulación de iones inorgánicos (principalmente  $K^+$  y  $Cl^-$ ) en el citoplasma; el aumento de KCl en el citoplasma genera que los componentes intracelulares se adapten a las altas concentraciones salinas. Las enzimas de estos organismos poseen grandes cantidades de residuos de aminoácidos cargados negativamente para evitar su precipitación (Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006; Gupta, Srivastaba, Khare, & Prakash, 2014; Reed, et. al., 2013).

En el mecanismo *salt-out*, utilizado por bacterias halófilas, no halófilas y algunas arqueas, los microorganismos acumulan en el citoplasma grandes concentraciones de compuestos orgánicos de bajo peso molecular manteniendo un equilibrio osmótico con el exterior de la célula. Estos compuestos orgánicos, al no interferir con el metabolismo celular son denominados solutos compatibles y generan un mecanismo flexible que permite la adaptación a variaciones en la presión osmótica. Algunos de estos solutos compatibles son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ecotína e hidroxiecotína (Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006; Gupta, Srivastaba, Khare, & Prakash, 2014).

Las bacterias halófilas son por lo general miembros de los géneros *Halomonas*, *Delega*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* y *Chromobacterium*. Las arqueas alcalólicas perteneces principalmente a los géneros: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronobacterium* y *Natronococcus* (Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006).

Las aplicaciones biotecnológicas para los microorganismos halófilos son menores comparadas con los organismo termófilos ó alcalófilos. La aplicación industrial más importante de microorganismos halofilós es la producción de  $\beta$ -caroteno por cepas del alga *Dunaliella* como agente estabilizador para enzimas sensibles en cosméticos. Otras de las aplicaciones, que tiene siglos de antigüedad, es la producción de sal solar proveniente de agua de mar; comida fermentada tradicional principalmente en China; para remover carbón y compuestos tóxicos de aguas de desecho industriales hipersalinas; y remover contaminación por metales pesados (DasSarma, Coker, Huse, & DasSarma, 2010; Orhen, 2010).

#### 4.2.2. Microorganismos Alcalófilos

Los microorganismos alcalófilos se caracterizan por tener un crecimiento óptimo a pH alcalino ( $> 8$ ) y presentar un crecimiento lento o nulo a pH de 7 o menos. Dentro de esta clasificación se encuentran los alcalófilos obligados: microorganismos cuyo crecimiento óptimo se presenta a valores de pH entre 9 y 10 y son incapaces de crecer a pH neutro. Los microorganismos alcalinotolerantes son capaces de crecer en pH alcalinos, pero presentan crecimiento óptimo a pH neutro o ácido, y los haloalcalófilos que necesitan un pH básico y condiciones alta salinidad para sobrevivir. Estos microorganismos se encuentran por lo general en hábitats muy básicos como lagos sódicos y suelos muy carbonatados (como el presente en la Laguna Salada), en ambientes marinos a  $\sim$  pH 8.2, en el cuerpo humano (pH  $\geq 10$ ); en el conducto pancreático debajo del píloro, y en el intestino de insectos (Jones, et.al., 1994; Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006; Horikoshi, 1999; Padan, et.at. , 2005).

De acuerdo con Horikoshi (1999) algunos microorganismos pueden presentar más de un pH óptimo para crecimiento, dependiendo de las condiciones de crecimiento, especialmente nutrientes, iones metálicos y temperatura.

Estos microorganismos son capaces de habitar ambientes alcalinos debido a adaptaciones fisiológicas que les permiten mantener su pH interno cercano al neutro (7.4-7.8), ya que algunas moléculas, especialmente conformadas por RNA, se degradan a pH superior a 8. Por comparación de membranas celulares bacterianas alcalófilas y neutrófilas del género *Bacillus* se sabe que los *Bacillus spp.* alcalófilos contienen compuestos como el ácido galacturónico, ácido glucónico, ácido aspártico, y ácido fosfórico, los cuales con su componente ácido no-péptidoglicano pueden darle a la célula la capacidad de adsorber iones hidronio y sales así como repeler iones de hidróxido, esto puede contribuir al crecimiento de los organismos en ambientes alcalinos (Horikoshi, 1999). Otro de los factores que contribuyen al crecimiento de bacterias en ambientes alcalinos es el sodio ( $\text{Na}^+$ ), ya que es un gradiente de sodio el que suministra la energía para la movilidad y el transporte de solutos a través de las membranas de *Bacillus spp.* alcalinos utilizando la bomba de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006; Horikoshi, 1999; Dhakar & Pandey, 2016; Padan, et.al. , 2005). Debido a esto, las enzimas intracelulares de estos organismos no necesitan adaptarse a las condiciones extremas de crecimiento exteriores; sin embargo, las enzimas extracelulares sí están obligadas a adaptarse a las condiciones de pH alcalino exteriores. Algunas de estas enzimas de interés son celulasas, xilasas, amilasas, proteasas, lipasas, pectinasas, catalasas, peroxidasas y oxidoreductasas (Kumar, Awasthi, & Singh, 2011; Gupta, et. al. , 2014; Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006)

El estrés causado por condiciones alcalinas se relaciona con diferentes tipos de estrés, existe una relación directa entre el estrés causado por salinidad y el alcalino ya que la citotoxicidad del Na<sup>+</sup> incrementa con el pH. El estrés por incremento de temperatura interactúa con el alcalino al alterar la permeabilidad de la membrana a iones como H<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, y esto altera la adaptación osmótica de la célula por el rol que tienen en los canales de transporte activo (Padan, et al., 2005).

La industria que ha mostrado mayor interés en estas enzimas es la industria de los detergentes, ésta abarca entre el 25-30% del total de producción total de enzimas. Aunque no todas las enzimas utilizadas en la industria de detergentes proviene de organismos alcalófilos las proteasas producidas por cepas de alcalófilas de *Bacillus* se encuentran comercialmente disponibles como detergentes. La tabla 1 muestra algunas de las enzimas producidas por microorganismos alcalófilos y sus aplicaciones industriales (Ramírez D, Serrano R., & Sandoval, 2006; Horikoshi, 1999).

Los microorganismos presentes en suelos alcalinos y salinos también son un componente central en la remineralización de materia orgánica dentro del ecosistema. Son grandes contribuyentes a la transformación de carbón orgánico, sulfuro, compuestos nitrogenados y metales con un rol importante en redes alimenticias y ciclo de nutrientes (Joshi, et al., 2008).

*Tabla 1 Principales enzimas provenientes de organismos alcalófilos y sus aplicaciones en la industria. (Aygan, et al. 2008; Naidu & Saranraj, 2013; Mobini-Dehkordi, 2012; Haki & Rakshit, 2003)*

Microorganismos alcalófilos	
Enzima	Aplicaciones
Amilasas	Industria alimentaria, Química analítica, de detergentes, textil, medicina, del papel e Industria del Biocombustible.

---

Lipasas	Industria de detergentes, alimentos, cosmética y farmacéutica.
Proteasas	Industria de detergentes, alimentos, y cuero.
Celulasas	Industria alimentaria, de detergentes.
Xilasas	Industria del Papel.
Quitinasas	Industria de desechos de aguas residuales, cosmética, de papel, médica.
Ciclodextrinas	Estabilización de sustancias volátiles.

---

### 4.3. Metabolismo Microbiano

Otro de los aspectos importantes para explicar la importancia de la presente investigación es el metabolismo microbiano. Los microorganismos se encuentran compuestos principalmente de estructuras complejas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Estas moléculas, a su vez están formadas por aminoácidos, nucleótidos, azúcares y ácidos grasos respectivamente gracias a procesos energéticos necesarios para el crecimiento celular y considerados parte del metabolismo microbiano (Tortora, Funke, & Case, 2010; Madigan, et. al., 2015).

El metabolismo, se refiere a todas las reacciones bioquímicas que ocurren en un organismo y éste puede considerarse como un acto de balance de energía debido a que las reacciones químicas liberan o requieren energía. Las reacciones que liberan más energía que la requerida para llevar a cabo la misma, son denominadas reacciones catabólicas; las que consumen más energía que la liberada se conocen como reacciones anabólicas (Tortora, Funke, & Case, 2010; Jurtschuk, 1996).

El metabolismo microbiano también estudia el consumo y utilización de los compuestos orgánicos e inorgánicos requeridos para el crecimiento bacteriano. El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes

químicos de la célula que tiene como finalidad la reproducción bacteriana (Tortora, Funke, & Case, 2010; Jurtshuk, 1996).

Los microorganismos pueden clasificarse desde un punto de vista metabólico, dependiendo del origen de su fuente principal de energía como fotótrofos o quimiótrofos; los organismos fotótrofos contienen pigmentos que les permiten transformar energía luminosa en energía química y utilizarla como su principal fuente de energía; los quimiótrofos dependen de las reacciones de oxido-reducción de compuestos orgánicos e inorgánicos, los que oxidan compuestos orgánicos son llamados quimiorganotróficos y los que oxidan compuestos inorgánicos son denominados quimiolitótrofos. (Tortora, Funke, & Case, 2010; Jurtshuk, 1996; Madigan, et. al., 2015).

De acuerdo a su principal fuente de carbón los microorganismos también pueden clasificarse en autótrofos, donde la fuente de carbono es  $\text{CO}_2$  y es utilizada para oxidar compuestos inorgánicos como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{S}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}$  para producir energía, y heterótrofos que obtienen su energía de la oxidación de compuestos orgánicos como carbohidratos (ej. Glucosa), lípidos y proteínas principalmente. Por lo tanto, por definición los organismos quimiorganotróficos son también heterótrofos (Tortora, Funke, & Case, 2010; Jurtshuk, 1996; Madigan, et. al., 2015).

Durante el metabolismo se llevan a cabo reacciones en cadena denominadas rutas metabólicas que generan subproductos conocidos como metabolitos. Los metabolitos tienden a ser estructuras de bajo peso molecular y se encuentran en pequeñas cantidades cuya composición química depende crucialmente de la macromolécula que le dio origen y la enzima que actuó en ésta. Un metabolito puede ser sintetizado por diversas razones, con el propósito de generar una función biológica como tal, para realizar una función

bioquímica después de una modificación estructural o para ser excretado como producto de desecho al no cumplir con ninguna función biológica.

Los metabolitos producidos durante la tropofase, o fase exponencial del crecimiento microbiano cuando todos nutrientes se encuentran en exceso en el medio, se denominan metabolitos primarios y su síntesis es una parte integral del proceso normal de crecimiento. Estos metabolitos incluyen intermediarios y productos finales del metabolismo anabólico que son utilizados para la síntesis de macromoléculas esenciales como aminoácidos y nucleótidos o convertidos a coenzimas como las vitaminas. El ácido cítrico, el ácido acético y el etanol son ejemplos de metabolitos primarios producidos por el metabolismo catabólico (Sanchez & Demain, 2008; Ratledge & Kristiansen, 2001; Tortora, Funke, & Case, 2010).

#### 4.3.1. Metabolismo Secundario

La necesidad de la célula de mantener el flujo de carbono a través de ella cuando la multiplicación exponencial ha cesado, etapa conocida como idiofase, requiere que la célula cambie de sus metabolitos principales a productos diferentes. Procesos indispensables como el reemplazo de proteínas vitales, reparación de ADN y el mantenimiento de ARN deben continuar, pero la célula entra a una etapa conocida como metabolismo secundario.

Los metabolitos secundarios son productos de bajo peso molecular innecesarios para el crecimiento celular. Éstos se acumulan en la célula, generalmente en menor concentración que los metabolitos primarios, con algunas excepciones como los ácidos orgánicos. Pueden ser alteraciones de un metabolito primario, productos que no se producían durante la fase exponencial o productos metabólicos del medio de cultivo

sintetizados hasta que se ha alcanzado una concentración considerable de células o metabolitos primarios.

La mayoría de los metabolitos secundarios son generados a partir de monómeros innecesarios resultado del catabolismo de glucosa y ácidos grasos, estos pueden ser tan variados como la especie del organismo del que provienen y su síntesis puede ser influenciada en gran medida manipulando el tipo y la concentración de los nutrientes en el medio de crecimiento, por lo tanto, el metabolismo secundario puede ser impulsado por la escasez de nutrientes o un decremento en la tasa de crecimiento celular. Debido a que los metabolitos secundarios no son producidos durante la fase de crecimiento su función es incierta ya que no son necesarios para el crecimiento o multiplicación; como el tipo y ocurrencia de los mismos varía enormemente es probable que posean más de una función. Existen opiniones encontradas sobre el rol de los metabolitos secundarios, se cree que proveen a la célula de alguna ventaja para sobrevivir en su ambiente natural, produce una respuesta celular difícil de imitar a nivel laboratorio o por el contrario, que no tienen valor alguno, siendo su formación el proceso beneficioso para la célula. Sin importar su rol en la vida celular, los metabolitos secundarios son algunos de los productos biotecnológicos más explotados por la industria (Sanchez & Demain, 2008; Ratledge & Kristiansen, 2001; Tortora, Funke, & Case, 2010; Ruiz, et al., 2010).

Los metabolitos secundarios son utilizados como tintes, fragancias, inhibidores enzimáticos, herbicidas, insecticidas, agentes psicotrópicos y medicamentos (Bentley, 1997; Barrios-González, Fernández & Tomasini, 2003). Probablemente su uso más importante es como medicamentos antiinfecciosos (valorados en 2007 en 66 millones de dólares), agentes antitumorales, medicamentos reductores de colesterol,

inmunosupresores, agentes antimicóticos, antihelminéticos, estimuladores motores gastrointestinales entre otros (Ruiz, et al., 2010).

#### 4.4. Surfactantes

Los surfactantes o tensoactivos son agentes químicos que disminuyen la tensión superficial entre dos fases, ya sea entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Son por lo general compuestos orgánicos anfifílicos ya que contienen una parte hidrofóbica (cola), generalmente cadenas largas de hidrocarburos y una parte hidrofílica (cabeza). Pueden ser clasificados de acuerdo a su carga como surfactantes no iónicos (sin carga), aniónicos (carga negativa), catiónicos (carga positiva) y anfóteros (con carga tanto positiva como negativa).

Los surfactantes pueden ser sintéticos, teniendo como materia prima derivados del petróleo, triglicéridos o aceites de madera (Salager & Ferandez, 2004), o biológicos también llamados biosurfactantes provenientes de organismos vivos. Los surfactantes de origen natural son sintetizados por plantas, animales y microorganismos que producen saponinas, surfactantes pulmonares y biosurfactantes respectivamente. Éstos se generan como metabolitos secundarios por diferentes microorganismos, principalmente aerobios (bacterias, levaduras y hongos filamentosos), utilizando sustratos como carbohidratos,

hidrocarburos, aceites y grasas (Souza, et al., 2014; Luna, et al., 2011).

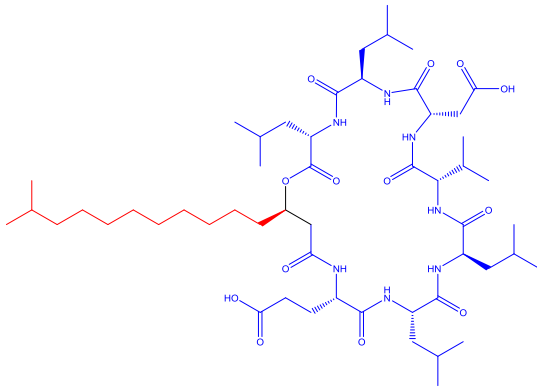


Figura 2 Representación Esquemática del bio surfactante "surfactina" producido por *B. subtilis*. En rojo se indica su fracción hidrofóbica y en azul la región hidrofílica.

Los biosurfactantes son polímeros total o parcialmente extracelulares, con una configuración anfifílica que al igual que su contraparte sintética contienen fracciones hidrofílicas, compuestas por un ácido, cationes o aniones peptídicos, mono-, di- o polisacáridos y una fracción hidrofóbica generalmente compuesta por cadenas de hidrocarburos o ácidos grasos (Figura 2) que les permiten formar micelas que se acumulan en la interfase entre fluidos con diferentes grados de polaridad como agua/aceite o aire/agua (Desai & Ibrahim, 1997; Banat, et al., 2010; Aparna, Srinikethan, & Hegde, 2011).

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los microorganismos es tener acceso a las fuentes de carbono insolubles en agua. Para lograrlo, los microorganismos han desarrollado alteraciones metabólicas y estructurales en su célula,

como la síntesis de compuestos surfactantes unidos a la membrana celular que facilitan las interacciones iniciales de los hidrocarburos con la célula o que son excretados en el medio de cultivo actuando en emulsiones agua-aceite para aumentar la superficie de contacto y así tener mayor disponibilidad de la fuente de carbón. La producción de estos compuestos está relacionada con la limitación del crecimiento logarítmico en la fase estacionaria y el crecimiento logarítmico tardío, en el cual enzimas específicas son inducidas o suprimidas (Hommel, 1990).

En 1997, Desai e Ibrahim describen cuatro posibilidades para la síntesis de la fracción hidrofóbica e hidrofílica del biosurfactante y su unión. En la primera las dos fracciones son sintetizadas por rutas metabólicas independientes; en la segunda la fracción hidrofílica es sintetizada mientras que la hidrofóbica es inducida por el sustrato; en la tercera posibilidad, la fracción hidrofóbica sintetizada y la hidrofílica es dependiente del sustrato; y por último, ambas fracciones hidrofóbicas e hidrofílicas son dependientes del sustrato.

Existen diversos factores que afectan la producción de biosurfactantes, dichos factores pueden inducir o reprimir la síntesis, con la adición de ácidos grasos y carbohidratos al medio de crecimiento se ha demostrado inducir la producción de soporolípidos y trehalolípidos en diferentes microorganismos. Por el contrario, la adición de D-glucosa reprime la producción de biosurfactantes en *P. aeruginosa* y *C. lipolytica*. Se ha reportado que tanto el nitrógeno como los iones metálicos tienen efecto en la regulación de la producción de estas biomoléculas. La escasez de nitrógeno y de iones multivalentes (magnesio, calcio, potasio, sodio y elementos traza) inducen o aumentan la producción de biosurfactante (Desai e Ibrahim, 1997; Reddy et al., 2009).

Los biosurfactantes reducen la tensión superficial e interfacial de los líquidos formando micelas y microemulsiones entre dos fases (Figura 3), ésto lo logran bloqueando la formación de puentes de hidrógeno permitiendo así interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas lo que ocasiona un reacomodo molecular. Las micelas formadas por las moléculas del biosurfactante se organizan colocando la fracción hidrofóbica orientada hacia el interior y la fracción hidrofílica hacia el exterior de la micela lo cual reduce la tensión superficial del líquido y forma las microemulsiones (Souza, Vessoni-Penna, & de Souza Oliveira, 2014; Aparna, Srinikethan, & Hegde, 2011).

Los biosurfactantes pueden clasificarse de acuerdo a su peso molecular. Los de bajo peso molecular son más efectivos al reducir la tensión superficial entre las fases aire/agua y

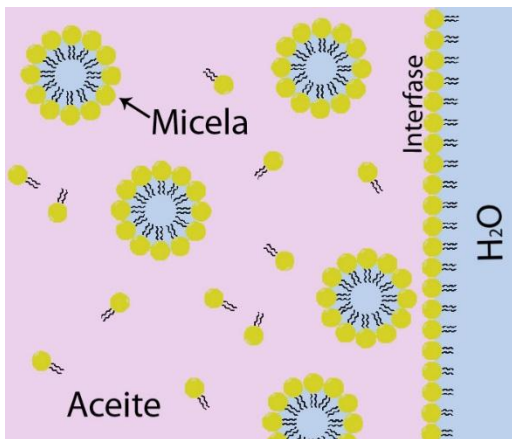


Figura 3 Esquema de mecanismo de acción de los biosurfactantes.

agua/aceite que los de mayor peso. Los biosurfactantes de alto peso molecular son también conocidos como bioemulsificadores debido a que son más efectivos al estabilizar emulsiones agua/aceite pero no reducen la tensión superficial tanto como su contraparte de menor peso. (Banat, et al., 2010).

Los biosurfactantes se pueden clasificar según sus propiedades y especie de origen como:

**Glicolípidos.** Estos biosurfactantes se caracterizan por su bajo peso molecular y son de los más estudiados. Su estructura está conformada por la fracción hidrofílica compuesta por un mono, di o tetra sacáridos como la glucosa, manosa, galactosa, ácido glucurónico, ramnosa y sulfato de galactosa unidos a una fracción lipofílica que consiste de ácidos alifáticos o hidroalifáticos de cadena larga. Los glicolípidos se dividen a su vez en:

- **Ramnolípidos.** Principalmente producidos por cepas patogénicas de *Pseudomonas*, poseen una o dos moléculas de ramnosa (porción hidrofílica) en conformación L unidas a una o dos moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (porción hidrofóbica). Los ramnolípidos son considerados de los surfactantes más potentes por su capacidad de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 21 mN/m (Paulino, et al., 2016).
- **Trehalolípidos.** Compuestos por el disacárido trehalosa (porción hidrofílica) unido a ácidos grasos como ácidos micólicos, octanóicos, decanóicos o succínico (porción hidrofóbica). Este glicolípido al igual que el ácido micólico es producido por la mayoría de las especies de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y otras especies de bacterias pertenecientes al orden de los actinomicetos. Tiene la capacidad de reducir la tensión superficial del agua a 43-24.1 nN/m (Paulino, et al., 2016).
- **Soporolípidos.** Sintetizados principalmente por varias cepas de levaduras del género *candida*, y su síntesis está relacionada con la ausencia de nitrógeno. (Van Bogaert, et al., 2007). Estructuralmente están formados por una soroposa (porción

hidrofílica) cada una unida a un hidroxí-ácido graso de cadena larga por un enlace  $\beta$ -glicosídico (porción hidrofóbica). Pueden subdividirse en dos subcategorías: soporolípidos acídicos y lactónicos. Los soporolípidos acídicos presentan mejor solubilidad y formación de espuma, mientras que los lactónicos poseen mejor actividad antimicrobiana y tensoactiva. Estos compuestos son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 40-24 nN/m (Paulino, et al., 2016).

**Lipopéptidos y lipoproteínas.** Son compuestos de bajo peso molecular que reducen la tensión superficial e interfacial más eficientemente que los glicolípidos. Se clasifican principalmente en Iturinas, Surfactinas y Fengicina (Walia & Cameotra, 2015).

- Iturinas: Son heptapeptidos unidos a una cadena de ácidos grasos  $\beta$ -amino de 14 a 17 carbonos y son producidos por cepas de *B.subtilis*. Tienen fuerte actividad antifúngica y poca actividad antibacterial y antiviral (Walia & Cameotra, 2015).
- Surfactinas: Son heptapéptidos cíclicos unidos a un  $\beta$ -hidroxí ácido graso. Poseen diversas isoformas A, B, C, D variando la cadena de ácidos grasos. Este tipo de biosurfactantes son potentes hemolíticos, antivirales, antimicrobianos y son los más estudiado y con mayores aplicaciones terapéuticas. La surfactina es un ejemplo de lipopéptido producido por *B. subtilis* y está considerada como uno de los biosurfactantes más poderosos (Walia & Cameotra, 2015).
- Fengicinas: Estos son decapeptidos con un anillo de lactona en su interior y un  $\beta$ -hidroxí ácido graso de 14 a 18 carbonos. Son potentes antifúngicos (Walia & Cameotra, 2015).

**Biosurfactantes poliméricos.** Dentro de esta clasificación encontramos complejos proteína-polisacárido que tienen función emulsificante, los más estudiados son: emulsan, liposan, alasan, lipomanan y manoproteína (Vijaykumar, 2015).

**Biosurfactantes particulados.** Estos biosurfactantes forman la membrana de vesículas extracelulares y están compuestas por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Su función principal es la ingesta de alcanos en los microorganismos productores.

#### 4.4.1. Aplicaciones

##### *Ramrólpidos*

Los ramrólpidos presentan biodegradabilidad y baja toxicidad por lo que son útiles en diversos procesos industriales como: biorremediación, formulación de detergentes y producción de cosméticos, mejoramiento de la recuperación de crudo, en la agricultura, y administración de fármacos (Paulino, et al., 2016). Mansureh en el 2012, documentó el efecto de sustituir el surfactante sintético por un ramrólvido en un detergente comercial obteniendo un desempeño similar con mejor biodegradación. Los ramrólpidos también se han estudiado para remover metales pesados como cromo (Abyaneh & Fazaelipoor, 2015), y se ha visto mejoran la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua de desechos industriales y pesticidas del ambiente (Sponza & Gok, 2010). En estos casos los ramrólpidos aumentan la biodisponibilidad de los compuestos tóxicos facilitando su degradación. La recuperación de petróleo mejorada por microorganismos utiliza principalmente microorganismos que producen ramrólpidos. En agricultura los biosurfactantes pueden ser utilizados para mejorar la solubilidad de pesticidas, mejorar la calidad del suelo a través de biorremediación, incrementar la biodisponibilidad de nutrientes y la eliminación de patógenos vegetales (Paulino, et al., 2016). Un reporte del

2011 de do Valle Gomes y Nitschke, referente a la industria alimentaria sugiere que un pretratamiento con biosurfactante a una superficie como el poliestireno puede reducir la capacidad de un microorganismo de adherirse a una superficie y proliferar, reduciendo su capacidad para formar biofilms, que pueden llevar al deterioro de alimentos y transmisión de enfermedades. El tratamiento con ramnolípidos también ha demostrado ser eficaz en remover biofilms preexistentes lo que implica aplicaciones importantes en el control de patógenos en la industria médica. Se ha estudiado la capacidad de los surfactantes para disrumpir la membrana celular retrasando la proliferación de células cancerígenas (Akiyode, et al, 2016). Sin embargo Jiang en el 2014, reportó que los ramnolípidos no presentan ninguna especificidad por células cancerígenas, causando el mismo nivel de citotoxicidad en células sanas, dicha citotoxicidad esta basada en la reducción de la tensión superficial del medio a valores menores de 41nN/m.

#### *Soporolípidos*

Los soporolípidos son los biosurfactantes mas utilizados en la industria, alrededor del 50% de los productos en el mercado global de biosurfactantes los contienen (Zion, 2015). Esto es debido a que junto con los lipidos de manosileritriol son producidos en grandes cantidades por las levaduras, al ser moleculas no ionicas mantienen sus propiedades a altas concentraciones de sales y son activas en un rango de temperatura amplio (Van Bogaert, et al., 2007). Se emplean en detergentes ecológicos, agentes limpiadores, detergentes para platos y en cosméticos. En la industria petrolera se ha reportado el uso de soporolípidos para incrementar la extracción de petróleo de los pozos mediante la inyección de estas biomoléculas (Paulino, et al., 2016). Los soporolípidos junto con lipidos de manosileritritol, se han utilizado como recubrimiento de aleaciones para inhibir la corrosión por ácidos las tuberías de pozos petroleros. (US Patent No.

US20150299556 A1, 2015). Análogos de sopololpidos han mostrado tener capacidad antimicrobiana contra bacterias Grampositivas, y como posibles vectores para transfección de genes (Delbeke, et al., 2013). Los sopololpidos modificados poseen actividad espermicida con eficacia similar a los comerciales, actividad virucida contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), así como la inducción de citoquinas proinflamatorias (Sahah et al., 2005). Al igual que los ramnolpidos, los sopololpidos disrumpen biopelículas e inhiben el crecimiento bacteriano, además de funcionar como fungicidas (Paulino, et al., 2016). La administración de sopololpidos lactónicos inhibe el desarrollo tumoral en ratones (Callaghan, et al., 2016). A diferencia de los ramnolpidos, los sopololpidos presentan buena selectividad en la citotoxicidad para células cancerígenas (mayor citotoxicidad en moléculas con cadenas de ácidos grasos largas, por lo que se cree que el incremento de la lipofilidad de la molécula incrementa la velocidad de absorción). Además, ciertos sopololpidos pueden inhibir células cancerígenas induciendo la apoptosis (Li et al, 2016).

#### *Lipidos de Trehalosa*

La trehalosa es utilizada como agente crioprotector y estabilizador de proteínas (Bosch, et al., 2016), al igual que el resto de los glicolpidos, los lipidos de trehalosa solubilizan y promueven la remoción de hidrocarburos de suelos contraminados. Esta molécula presenta menor toxicidad que los ramnolpidos y puede aplicarse en el área médica pues se ha comprobado que induce diferenciación celular en líneas celulares de leucemia (Franzetti, et al., 2010; Isoda et al., 1997). Sin embargo, la producción de lipidos de trehalosa tiene un alto costo, principalmente por que las moléculas de interés se encuentran unidas a la membrana celular en vez de ser secretadas al medio (Franzetti, et al., 2010).

### *Lipopéptidos y lipoproteínas*

Se ha demostrado que la surfactina presenta propiedades antitumorales, antimicrobianas, antifúngicas y antivirales (Perez, et al., 2017). La viscosinamida, un lipopéptido producido por *Pseudomonas fluorescens*, presenta actividad antifúngica contra el oomiceto *Pythium ultimum* (Thrane, et al, 2000). La Fengicina, producida por cepas halófilas de *B. Subtilis* y *B. Licheniformis*, inhibe la formación de biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* en poliestireno (Rivardo, et al, 2009). Lipopéptidos producidos por una cepa de *B. tequilensis* también inhiben la formación de biopelículas de *E. coli* y *S.mutans* (Pradham, et al., 2013). Surfactinas, iturinas y fengicinas provenientes de *B.subtilis* actúan de manera sinérgica para la recuperación de crudo según reportan en el 2014 Pathak y Keharia. Los lipopéptidos se han utilizado también como ligandos para inmunoglobulinas durante la transfección de genes, destruir biopelículas que causan enfermedades nosocomiales, como aditivo a preparaciones probióticas contra infecciones urogenitales y en inmunoterapia pulmonar, y pueden ser utilizados para mejorar la producción de biocombustibles (Walia & Cameotra, 2015). Una cepa de *Pseudomonas putida*, reconocida por promover el crecimiento en plantas, produce un lipopéptido capaz de destruir las zoosporas del oomiceto *Phytophthora capsici* (Kruijt, Ha, & Raaijmakers, 2008). Lipopéptidos generados por *B. burgdorferi* inducen la producción de interleucina 17 en linfocitos Th. (Infante-Duarte, et al 2000).

La surfactina es capaz de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 27 mN/m; se ha demostrado que tiene la capacidad de retrasar la formación de coágulos inhibiendo la conversión de la fibrina; es capaz de destruir micoplasmas; posee acción antiviral y antiinflamatoria; reduce el nivel de endotoxina plasmática, factor de necrosis tumoral alfa y óxido nítrico en ratas bajo choque séptico, inhibe la formación de biopelículas y es útil en

la recuperación de crudo (Chen, Juang, & Wei, 2015). La adición de surfactina a la producción de nanopartículas de plata mejora el isotropismo de las nanopartículas y reduce la formación de agregados (Reddy, et al., 2009).

#### 4.5. Sideróforos

Otro tipo de moléculas producidas por algunos microorganismos son los sideróforos, que son metabolitos de bajo peso molecular que se unen específicamente a ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El rol de estos compuestos es recolectar y quelar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a  $\text{Fe}^{2+}$ . Dichos agentes son excretados y al formarse los compuestos ferri-sideróforos, éstos se unen a receptores protéicos de la membrana bacteriana externa, para ser transportados contra gradientes de concentración al citoplasma. Se sabe que la producción de sideroforos en todos los organismos que los generan es inhibida a altas concentraciones de hierro (Neilands, 1995; Drago-Serrano, 2009; Aguado-Santacruz, et al, 2012). Es importante mencionar que el hierro, en forma de ion férrico  $\text{Fe}^{3+}$  o ferroso  $\text{Fe}^{2+}$ , tiene un papel esencial como cofactor de enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción vitales en algunos microorganismos ya sea en la reducción de oxígeno para síntesis de ATP, reducción de precursores de ADN, formación de grupo protésico heme de la hemoglobina y otras funciones esenciales. En la naturaleza (pH neutro y presencia de oxígeno) la solubilidad del hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es baja y tiende a formar sales insolubles e hidróxidos ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), las cuales son formas químicas que reducen la disponibilidad para algunos seres vivos sin sistemas de transporte activo; sin embargo, en condiciones anaerobias y pH ácido el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es altamente soluble (Neilands, 1995; Drago-Serrano, 2009).

La biosíntesis de sideróforos en bacterias y hongos, la secreción por células productoras, el consumo del complejo soluble ligando-hierro con la participación de receptores específicos y sistema de transporte, son procesos inducidos por el crecimiento de ciertos microorganismos en medios con bajas concentraciones de hierro. Estos metabolitos quelantes o sideróforos, proporcionan al microorganismo capaz de sintetizarlos ventajas para su sobrevivencia y desarrollo, algunos sideróforos producidos por el género *Pseudomonas* tienen propiedades antibióticas contra otras especies bacterianas (Temirov, et al., 2003)

#### 4.6. Bacillus

Uno de los géneros bacterianos que han sido ampliamente estudiados por su capacidad productora de sustancias bioactivas como los biosurfactantes es el género *Bacillus* que, como parte de la familia *bacillaceae* se distingue por la formación de endoesporas, que son estructuras redondas, ovaladas o cilíndricas que se forman dentro de las células bacterianas, por su naturaleza aerobia, facultativa u obligada, su forma de bacilo y producción de catalasa, los microorganismos pertenecientes a este género son capaces de degradar casi todos los sustratos provenientes de animales o plantas incluyendo celulosa, almidón, proteínas, agar, hidrocarburos entre otros. Además de que producen antibióticos; nitrificadores heterotrópicos; denitrificadores; fijadores de nitrógeno; precipitadores de hierro; oxidantes de selenio entre otros (Slepecky & Hemphill, 2006).

##### 4.6.1. Ciclo de vida, esporulación y germinación de los *Bacillus*

Muchos miembros del género *Bacillus* forman endoesporas cuando el ambiente no es propicio para su crecimiento; las endoesporas, son estructuras metabólicamente inertes, capaces de resistir temperaturas extremas, radiación y desecación. Pueden permanecer en su

estado vegetativo por años hasta ser activadas para germinar. La activación es un proceso que condiciona la espora para germinar e incrementa el número de esporas germinantes así como la velocidad de germinación. Las esporas pueden ser activadas por diversos factores específicos para la especie, principalmente calor y nutrientes como aminoácidos. Durante la activación se elimina una proteína de la cubierta de la espora, ácido dipicolínico y  $Zn^{2+}$  lo que incrementa la fluidez de la membrana. (Slepecky & Hemphill, 2006; Setlow, 2014)

La germinación o rompimiento del estado latente de la espora. Una serie de reacciones degradativas se desencadenan por compuestos simples como los aminoácidos. Al germinar las esporas, las células ahora en estado vegetativo, pierden su resistencia al calor, radiación y químicos dañinos. Junto a este proceso las esporas se hinchan, rompen su cobertura y exudan hasta el 30% de su peso seco. A continuación comienza la síntesis de ARN, ya que las células esporuladas no sintetizan aminoácidos, 20% de las proteínas se degradan para proporcionar aminoácidos para la síntesis (Slepecky & Hemphill, 2006).

#### *Esporulación.*

La esporulación está dividida en siete etapas. Las células vegetativas se consideran la etapa 0. La etapa I se considera antes de la inducción cuando el material nucleico se encuentra dispuesto en un filamento axial. La etapa II consiste en la segregación de la cromatina hacia los polos junto a la invaginación de la membrana plasmática de manera asimétrica que se fusiona para formar el septum de la espora. En la etapa III la parte más pequeña de la célula resultado de la división en la fase II es envuelta por la porción más grande liberando la pre-espora con doble membrana en el interior de la célula. La etapa IV se caracteriza por la acumulación de calcio y ácido dipicolínico en el centro de la espora así como la colocación de material similar a peptidoglicanos entre las dos membranas de la

pre-espora. Durante la etapa V son sintetizadas las cubiertas proteicas de la pre-espora por la espora madre. En algunas especies una etapa adicional como exosporio es sintetizada. Las diferencias en las capas de las diferentes especies son responsables de variaciones en la germinación, y resistencia a luz UV y calor. La maduración de la espora consiste en la etapa VI en ésta la espora se vuelve resistente al calor y una variedad de solventes orgánicos. Finalmente la célula madre es lisada y la espora liberada concluyendo la etapa VII. La esporulación es inhibida cuando hay crecimiento acelerado y exceso de nutrientes (Slepecky & Hemphill, 2006; Higgins & Jonathan, 2012).

#### 4.6.2. Estructuras superficiales de *Bacillus*

##### *Capa S*

La mayoría de las bacterias poseen una barrera exterior compuesta por cristales de subunidades de glicoproteínas, o proteínas llamadas capas-S son encontradas en membranas del género *Bacillus*, la composición de estas capas difiere entre las especies del género y algunas incluso carecen de la misma. En bacterias Gram-positiva las capas-S están unidas a la pared rígida de péptidoglicano. Se sabe que cumplen diversas funciones, pueden servir como capas protectoras, filtros moleculares, para atrapar moléculas o iones, promotores de la adhesión celular, inmunomoduladores, reconocimiento de superficie, y son factor de virulencia en organismos patogénicos (Sleytr, et al, 2014).

##### *Cápsulas*

Las cápsulas son estructuras protectoras localizadas en el exterior de la pared celular del organismo que la secreta. La composición de la cápsula es única para cada cepa de bacteria que la produce, típicamente consisten en polisacáridos complejos organizados en un gel adheridos firmemente a la pared celular. Organismos de género *Bacillus* poseen

cápsulas compuestas por carbohidratos. No todas las especies son capaces de formar cápsulas y miembros de la misma especie pueden o no formarlas dependiendo de las condiciones en las que se encuentren. Un ejemplo de esto es *B. anthracis* que no produce cápsula cuando se encuentra fuera de un organismo, cuando se encuentra con un organismo produce una cápsula compuesta de homopolipeptidos de ácido D-glutámico el cual es un factor de virulencia. Una bacteria es menos infecciosa al perder su cápsula ya que ésta la protege de fagocitosis (Tortora, et al, 2010; Slepecky & Hemphill, 2006; Madigan, et. al. 2015; Black & Black, 2015).

### *Flagelos*

La mayoría de las especies del género *Bacillus* poseen flagelos peritricosos, éstos son apéndices helicoidales delgados de entre 15 y 20 nm de diámetro y con una longitud de 3 a 12 µm. Poseen una terminación libre y la otra unida a la célula que le permiten a la bacteria impulsarse a través del medio (Slepecky & Hemphill, 2006; Madigan, et. al., 2015).

### *Pared Celular*

Al ser un género Gram positivo, las especies de *Bacillus* poseen paredes celulares compuestas hasta un 90% de peptidoglicanos y grandes cantidades de un polímero aniónico, como el ácido teicóico o el ácido teicurónico que están unidos a residuos de ácido murámico. Debido a su carga negativa el ácido teicóico es responsable de la carga negativa neta de la pared celular, puede unirse y regular el movimiento de cationes a través de la célula, también pueden asumir roles en el crecimiento celular, prevenir rompimiento excesivo de la pared celular y posible lisis (Tortora, et al, 2010; Slepecky & Hemphill, 2006; Madigan, et al, 2015).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Propagación de aislados microbianos

Para el desarrollo experimental del presente trabajo de tesis, se utilizaron ocho aislados microbianos identificados simplemente como A, B, C, D, E, F, FL y G denominados así de acuerdo al sitio de donde fueron aislados y proporcionados por miembros del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental (Dra. Aseneth Herrera Martínez y Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez). Estos ocho aislados microbianos se propagaron en medio agar Reasoner's 2A (R2A) (Extracto de levadura 0.5g/l, peptona 0.5g/l, peptona acida de caseína 0.5g/l, glucosa 0.5g/l, almidón soluble 0.5g/l, piruvato de sodio 0.3g/l, fosfato dipotásico 0.3g/l, sulfato de magnesio 0.05g/l, agar 15.0 0.5g/l); este medio fue seleccionado por su bajo contenido nutricional que estimula, en largos periodos de incubación, el crecimiento de bacterias bajo estrés y de crecimiento lento. Los aislados fueron incubados a 35.5°C por 24 horas para cada experimento.

### 5.2. Conservación de aislados microbianos en Glicerol 15%

Para preservar los ocho aislados microbianos por periodos prolongados, cultivos jóvenes de no más de 24 horas, fueron adicionados con glicerol a una concentración del 15% para su posterior almacenamiento a -20 °C. Para esto, se preparó medio R2A líquido, como previamente se indicó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El medio R2A contenido en los tubos fue inoculado tomando una asada, esta operación se hizo por duplicado para cada uno de los aislados microbianos. Los distintos cultivos se incubaron a 35.5 °C por 24 horas con agitación oscilatoria de 120 rpm. Ulteriormente, en condiciones de esterilidad, se tomaron 500 µl de un cultivo y se colocaron en microtubos de 1.5ml

estériles con 500µl de Glicerol al 30% previamente esterilizado para lograr una concentración final de glicerol de 15%. Esta operación se realizó por triplicado para cada uno de los aislados trabajados en la presente investigación. Los microtubos fueron colocados sobre hielo durante este proceso para después almacenarse a -20°C hasta ser requeridos en la experimentación.

### 5.3. Tinción de Gram

Como parte del proceso de identificación diferencial, se realizó tinción de Gram a cada uno de los ocho aislados microbianos. Para esto, se colocó al centro de un portaobjetos limpio una gota de agua destilada, posteriormente se tomó con un asa microbiológica estéril una pequeña cantidad de cultivo puro de 24 horas de edad, se mezcló con la gota de agua, se esparció uniformemente a lo largo del portaobjetos sin tocar los bordes y se fijó por calor colocando el portaobjetos sobre la flama hasta que el agua se evaporara completamente.

Se añadió el colorante cristal violeta a lo largo de la muestra y se dejó reposar durante un minuto en posición horizontal. Se lavó el exceso de colorante con agua y se escurrió el exceso. A continuación, se agregó al frotis la solución de lugol, y se dejó reposar por un minuto en posición horizontal, luego de esto, el frotis fue lavado al chorro de agua y se escurrió el exceso de agua. Posteriormente, el frotis fue decolorado inmediatamente agregando una solución de alcohol/acetona a lo largo del frotis. Se dejó reposar por 40 segundos, se lavó nuevamente al chorro de agua y se eliminó el exceso de agua. Se cubrió el frotis con el colorante de contraste safranina fuschia durante 45 segundos, para luego lavar con agua y se quitó el exceso de agua. Las laminillas con las muestras microbianas

teñidas se dejaron secar a temperatura ambiente para poder ser analizados bajo el microscopio. Cada una de las laminillas se observó al microscopio a 100x colocando previamente aceite de inmersión a las muestras. Se tomaron fotografías de lo observado al microscopio.

## 5.4. Pruebas Bioquímicas

### 5.4.1. Motilidad, producción de indol y actividad ornitina descarboxilasa

Estas pruebas fueron realizadas utilizando el medio MIO (Motilidad, Indol, Ornitina descarboxilasa) (MCD LAB) preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se colocaron 7ml del medio en tubos de ensayo de 15ml y se esterilizaron a 121°C y 15 lbs de presión durante 15 minutos. El medio se dejó solidificar a temperatura ambiente en posición vertical. Los ocho diferentes aislados microbianos, provenientes de cultivos puros de no más de 24 horas, se inocularon por separado y por punción con asa, en el medio MIO contenido en los tubos. Para ello, se tomó una colonia del aislado con la punta del asa, se insertó en el centro del medio y se empujó el asa a través del medio hasta llegar a 0.5cm de la base de la superficie del medio. El medio ya inoculado se incubó 35°C de 24 a 48 horas con las tapas ligeramente sueltas y se analizaron resultados. Al finalizar se añadieron unas gotas del reactivo de Kovac para evaluar la producción de indol. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada aislado.

### 5.4.2. Producción de lisina descarboxilasa y sulfuro de hidrógeno

Estas pruebas fueron realizadas utilizando el medio LIA (Lysine Iron Agar) (MCD LAB). Éste fue preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se colocaron 7ml en tubos de ensayo de 15ml y se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Los tubos conteniendo el medio ya estériles, se dejaron solidificar a temperatura

ambiente colocándolos a aproximadamente 35° de inclinación para lograr una forma de cuña (slant), posteriormente se inocularon los aislados a estudiar, provenientes de cultivos puros de no más de 24 horas, por medio de punción con asa recta. Para lo que se tomó una colonia del aislado con la punta del asa, se insertó en el centro del medio y se empujó el asa a través del medio hasta llegar a 0.5cm de la base del tubo, se extrajo el asa y arrastró sobre la superficie del medio en zig-zag. Se incubó a 35°C de 24 a 48 horas con las tapas ligeramente sueltas y se analizaron resultados. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada aislado microbiano.

#### 5.4.3. Fermentación de dextrosa, lactosa y producción de sulfuro de hidrógeno

Estas pruebas fueron realizadas utilizando el medio KIA (Kliger Iron Agar) (MCD LAB). Éste fue preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se colocaron 7ml en tubos de ensayo de 15ml y se esterilizaron bajo las condiciones anteriormente descritas. Los tubos, conteniendo el medio ya estéril, se dejaron solidificar a temperatura ambiente colocándolos a aproximadamente 35° de inclinación para lograr una forma de cuña (slant). Se inocularon los aislados a estudiar, provenientes de cultivos puros de no más de 24 horas, por medio de punción con asa recta tocando una colonia del aislado con la punta del asa, se insertó en el centro del medio y se empujó el asa a través del medio hasta llegar a 0.5 cm de la base del tubo, se extrajo el asa y se arrastró sobre la superficie del medio en zig-zag. Los inóculos en medio KIA se incubaron a 35°C de 24 a 48 horas con las tapas ligeramente sueltas y se analizaron resultados. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada aislado.

#### 5.4.4. Degradación de ADN por actividad desoxirribonucleasa

Estas pruebas fueron realizadas utilizando el medio DNase Test Agar (DIFCO BD). Éste fue preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se esterilizó a las condiciones antes mencionadas. Se vaciaron alrededor de 25ml del medio en cajas Petri estériles de 100mm x 15mm, luego de esto las cajas con medio se dejaron solidificar en una superficie nivelada a temperatura ambiente. Los aislados a estudiar, provenientes de cultivos puros de no más de 24 horas, se inocularon en forma de una sola estría. Las placas ya inoculadas, se incubaron invertidas a 35°C de 24 a 48 horas. Posteriormente, las cajas con crecimiento fueron inundadas con ácido clorhídrico 1 N durante 3 minutos para evaluar la actividad de la enzima desoxirribonucleasa. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada aislado.

#### 5.4.5. Prueba de la Catalasa

Para esta prueba se colocó en el centro de un portaobjetos limpio una gota de peróxido de hidrógeno al 30%, a continuación, una asada de una colonia de los distintos aislados microbianos bajo estudio, provenientes de cultivos puros de no más de 24 horas, y se mezcló con el peróxido de hidrógeno. Se dejó reposar por 2 minutos la mezcla y se procedió a registrar las observaciones.

### 5.5. Evaluación de tolerancia de los aislados microbianos a valores distintos de pH

Para evaluar la tolerancia de los aislados a diferentes pHs, éstos se inocularon por triplicado en medio R2A, adicionado con HCl hasta alcanzar valores de pH en el medio de 5, 8, 9 y 10. Los inóculos fueron incubados a 35 °C por 24 horas y se registraron las observaciones.

## 5.6. Evaluación de halotolerancia

Para evaluar la halotolerancia de los aislados, éstos se inocularon por triplicado en medio R2A adicionado con NaCl para obtener concentraciones de 0%, 5%, 9%, 12%, 15% y 18% de sal. Posteriormente, las placas de R2A a las distintas concentraciones de NaCl ya inoculadas se incubaron a 35 °C por 48 horas y se registraron las observaciones.

## 5.7. Evaluación de capacidad hemolítica

La capacidad hemolítica de los aislados se evaluó utilizando el medio diferencial agar sangre adicionado al 5% con sangre humana. Para la realización del agar sangre se prepararon 400ml de Base de Agar Sangre (MCD LAB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se esterilizó y se dejó enfriar a 50°C. En condiciones asépticas se extrajeron 20ml de sangre venosa humana y se vertieron en un matraz estéril de 125ml con aproximadamente 20 cc de perlas de agitación estériles (Russel, et al., 2006). Se tapó el matraz y se agitó manualmente a aproximadamente 100 rpm por 10 minutos. Después se vertió la sangre en la base de agar sangre a través de una gasa estéril para retener las perlas de agitación. Se mezcló la sangre con la base de agar sangre hasta obtener una solución homogénea y se vertieron aproximadamente 20ml de la mezcla en cajas Petri estériles. Las cajas con medio agar sangre solidificado se sometieron a prueba de esterilidad por 24 horas. Posteriormente, se inocularon dos placas por estría cruzada con uno de los distintos aislados. Esta operación se realizó por duplicado para cada uno de los aislados microbianos. Luego se incubaron a 35.5 °C por 72 horas y se registraron las observaciones.

## 5.8. Evaluación de capacidad microbiana para producir sideróforos

Se analizó la capacidad de los aislados microbianos para producir sideróforos cultivándolos en placas de medio Cromo azurol S (CAS) adicionado con medio casitona y

extracto de levadura (CYE, por sus siglas en inglés) al 20%. El medio CAS fue preparado de acuerdo a la metodología descrita por Schwyn y Neilands en 1987 y con las modificaciones de Pérez Miranda en el 2007, añadiendo la solución B a la solución A en condiciones asépticas, estas dos soluciones, al igual que el medio CYE, fueron esterilizadas bajo las condiciones mencionadas en otros apartados de materiales y métodos. Se mezclaron el medio CAS y el medio CYE en condiciones de esterilización al alcanzar 50 °C. A continuación, se vaciaron, en condiciones asépticas, aproximadamente 20 ml de la mezcla de medios en cajas Petri estériles de 90mm x 14mm y se dejaron solidificar a temperatura ambiente en una superficie nivelada. Una vez solidificadas las placas con medio, se inocularon los aislados microbianos, tomando con un asa bacteriológica una colonia de un cultivo puro, de no más de 24 horas de crecimiento, formando un *spot* denso sobre la superficie del medio CAS-CYE 20%. Una vez inoculadas las placas, éstas se incubaron invertidas a 35°C durante 5 días y se analizaron y registraron los resultados de acuerdo a Neilands (1995) y Pérez-Miranda et al. (2007).

### 5.9. Cinética de Crecimiento y producción de biosurfactantes microbianos

Para monitorear el crecimiento bacteriano y la producción de biosurfactante, se realizaron cinéticas de crecimiento de todos los aislados que no formaran paquete celular en cultivo líquido. Se preparó un stock de medio MSM agregando a un litro de la solución A estéril (2.5g NaNO<sub>3</sub>, 0.4g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1g NaCl, 1g KCl, 0.05g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 10ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 7.2 un mililitro de solución B, que conteniendo por cada 100ml (50mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 30mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 15ml CoCl<sub>2</sub>, 15mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y 10mg NaMo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O). Se adicionó glucosa al medio a una concentración final de 2%. Posteriormente, en 30ml de medio MSM glucosa 2% estéril y contenidos en un

matraz de 125 ml se inoculó una asada de una sola colonia de un cultivo puro de no más de 24 horas para generar preinóculos de cada uno de los ocho cultivos trabajados en esta investigación. Los preinóculos fueron incubados a 35.5°C con agitación oscilatoria de 120 rpm hasta lograr una turbidez con una densidad óptica (DO) de 0.4 a una longitud de onda de 600nm. Luego de esto, se seleccionaron los cultivos que presentaron crecimiento y no formaron pellets (B, C y F). De los cultivos seleccionados se inocularon, en condiciones de esterilidad, 300µl de preinóculo en 300ml de medio MSM glucosa 2% contenidos en un matraz de 500ml, estos nuevos inóculos se incubaron a 35.5°C por ocho días con agitación oscilatoria de 120 rpm. Se tomaron alícuotas de 100µl del cultivo en crecimiento a las 0, 12 y 24 horas para conteo en placa. A partir de las 24 horas se tomaron alícuotas de 100µl cada 6, 8 o 12 horas según la turbidez observada en los cultivos. De las alícuotas tomadas de cada uno de los cultivos se hicieron diluciones seriales y se sembraron por extensión con varilla 100 µl de cada una de estas diluciones en placas de R2A. Esto se hizo por duplicado. Las placas de R2A ya sembradas se incubaron a 35°C de 18 a 24 horas según se requiriera. Se realizó el conteo de colonias por placa y se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) de cada aislado.

#### 5.10. Cuantificación de Actividad Tensoactiva

Los aislados microbianos se inocularon por separado en 50ml de medio MSM glucosa 2%, contenidos en matraces de 125 ml, y se incubaron a 35.5°C con agitación oscilatoria de 120 rpm. Durante el tiempo de cultivo, se tomaron alícuotas de 15ml de los cultivos a las 48hrs y 120hrs para evaluar la capacidad productora de biosurfactantes de los aislados microbianos. Para la cuantificación de la actividad tensoactiva de los productos celulares generados por los aislados, durante la cinética de crecimiento en medio MSM

glucosa 2%, se utilizó un tensiómetro CSC-DuNouy 70535 (Bodour et al., 2003). Las alícuotas de 15ml, tomadas a los tiempos antes indicados, se colocaron en tubos para centrífuga de 50ml y se centrifugaron a 4000rpm durante 20min o hasta lograr la formación de un paquete celular, se decantó el sobrenadante en tubos de 50ml nuevos y estériles y se desechó el paquete celular. Las mediciones de tensión superficial de los sobrenadantes se realizaron a temperatura ambiente vaciándolos sobre placas de Petri estériles según las instrucciones de calibración y uso descritas por el fabricante del tensiómetro DuNouy. Estas mediciones se realizaron por triplicado para cada uno de los sobrenadantes y se tomó como resultado el promedio de los triplicados.

#### 5.11. Índice de Emulsificación E24

La capacidad de los biosurfactantes, producidos en medio MSM glucosa 2%, de formar emulsiones estables fue analizada mediante la prueba del índice de emulsificación E24 de acuerdo a Cooper y Goldenberg (1987). Para ello, se tomaron 3 ml de muestras de los cultivos a las 72hrs pues a este tiempo se presentó mayor turbidez debida al crecimiento poblacional. Se centrifugaron las muestras a 4000rpm por 30 min. Se agregaron 3ml de diésel y 2 ml de sobrenadante, para cada uno de los cultivos bajo estudio, en un tubo de ensaye de vidrio de 15ml, estas mezclas se agitaron vigorosamente en vortex por 2 minutos y se dejaron reposar verticalmente a temperatura ambiente por 24 horas. El índice de emulsificación se calculó dividiendo la altura de la capa emulsificada entre la altura total las fases (acuosa y no acuosa), multiplicada por 100. Se registraron los datos obtenidos.

## 5.12. Extracción y secuenciación de ADN de los distintos aislados microbianos

Se extrajo ADN de los aislados microbianos utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue Kit de QIAGEN. Los aislados se crecieron en 5 ml de R2A líquido a 35°C por 24 horas con agitación oscilatoria de 120 rpm. Para la extracción de ADN se realizaron modificaciones al protocolo indicado por el fabricante como se describe a continuación:

## 5.13. Pretratamiento para bacterias Gram Positivas

Los aislados microbianos que resultaron positivos en la prueba de Gram (B, C, D, F, FL y G) se colocaron en microtubos de 1.5ml nuevos y estériles, y se centrifugaron a 7.5krpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se repitió esta operación hasta obtener un paquete celular de aproximadamente 100ng de peso. Los paquetes celulares se resuspendieron en 180µl de buffer (20mM Tris-Cl, pH 8.0, 2mM EDTA, 1.2% Triton X-100), posteriormente se lisaron las células suspendidas en este buffer mediante sonicación a temperatura ambiente por 22 minutos en un sonicador de cubeta VWR Symphony. Luego de esto, a cada tubo se le añadieron 25µl de proteinasa K y 200µl de Buffer AL y se mezcló por vortex. Estas mezclas conteniendo los lisados celulares, fueron incubadas a 56°C por 30min. Después se añadieron 200µl de etanol y se mezclaron en vortex. Se continuó con la metodología descrita en “Protocolo para extracción de ADN” indicado en el punto 4.15 “Pretratamiento para bacterias Gram Negativas”.

Se tomaron alícuotas de 1.5ml de los cultivos Gram negativos (A y E) y se colocaron en microtubos de 1.5ml, se centrifugaron a 7.5krpm durante 10min, se desechó el sobrenadante y se repitió esta operación hasta obtener un paquete celular de aproximadamente 100ng de peso. Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 180µl de

buffer ATL. Posteriormente se rompieron las células por disrupción con sonicador a temperatura ambiente por 22 minutos. Luego se añadieron 20µl de proteinasa K, se mezcló con vortex y se procedió a incubar a 56°C por 30 minutos. Posteriormente, los lisados fueron agitados con vortex por 15 segundos, se añadieron 200µl de Buffer AL y se agitó nuevamente, después se agregaron 200µl de etanol (96-100%) y se agitaron una vez más utilizando el vortex.

#### 5.14. Protocolo para extracción de ADN

Después de los pretratamientos antes mencionados para bacterias Gram positivas y Gram negativas, la extracción de ADN bacteriano sigue el protocolo que se describe a continuación:

El contenido de cada microtubo fue transferido a una columna DNeasy Mini spin colocado en un tubo colector. Las muestras fueron centrifugadas a 8krpm por 1 minuto, al finalizar el líquido contenido en el tubo colector fue descartado. La columna fue colocada en un tubo colector nuevo, se le añadieron 500µl de buffer AW1 y se centrifugaron a 8krpm por 1 minuto. El líquido recolectado en el tubo colector fue desechado. Se colocó cada columna en un tubo colector nuevo, se le añadieron 500µl de buffer AW2, fueron centrifugados a 14krpm durante 3 minutos y el líquido depositado en el tubo colector fue desechado nuevamente.

Cada columna fue colocada en un microtubo de 1.5ml, se le añadieron 200µl de agua grado molecular y se centrifugaron a 8krpm durante 1 minuto para eluir del ADN. Se descartó la columna y se almacenaron los microtubos conteniendo el ADN a -20°C para su posterior análisis.

### 5.15. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Para el PCR se utilizó el PCR Master Mix (5x) de Gene and Cell Technologies. Se prepararon reacciones de 50µl siguiendo las proporciones y recomendaciones descritas por el fabricante. Cada reacción se realizó en microtubos para PCR de 200µl y contenían 38µl de agua ultra pura, 10µl de PCR Master Mix, 1µl de cada primer F y R, y 1µl de templete de ADN de los aislados una concentración entre 10pg/µl y 10ng/µl. Los cebadores utilizados para la PCR fueron los primers universales que amplifican el gen ribosomal 16S de bacterias 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3') y 1492F (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T3'). En la tabla 2 se indican las condiciones de corrida de la PCR en el termociclador.

---

Programa utilizado por el termociclador para realizar PCR

---

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	95°C	30 segundos
	95°C	30 segundos
30 ciclos	61.4°C	40 segundos
	72°C	1 minutos/kb
Extensión Final	72°C	5 minutos
Espera	4°C	indefinido

---

Para cada muestra de ADN se realizaron 2 reacciones de PCR de 50µl.

*Tabla 2 Programa utilizado por el termociclador para realizar PCR.*

## 5.16. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar que la extracción de ADN y la PCR fueron exitosas se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando una fuente de poder PowerPac Basic (Biorad) y una cámara de electroforesis con accesorios (BioRad). Se prepararon 40ml de agarosa al 1% agregando 0.4g de agarosa (Sigma) en 40ml de buffer TBE 1x (0.089M Tris base, 0.089M ácido bórico y 0.002M EDTA), se calentaron con agitación hasta hervir por 1 minuto y disolver por completo la agarosa. Se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación, cuando el gel alcanzó una temperatura de entre 50 y 45°C se vació en el portageles al que previamente se le colocó un peine de 8 pocillos de 1.0mm de espesor. El gel se dejó solidificar a temperatura ambiente en una superficie plana y nivelada. Una vez solidificado se colocó al interior de una cámara de electroforesis teniendo cuidado de colocar el lado del gel con los pozos en el polo negativo de la cámara. El buffer de corrida Tris Boric Acid-EDTA (TBE) fue agregado hasta cubrir el gel hasta el nivel indicado en la cámara asegurándose que no quedaran burbujas debajo del gel. Se retiró el peine del gel y se removieron las burbujas en caso de existir. Se cargó cada pocillo con 3µl de ADN o 5 µl de producto de PCR homogenizados con 1µl de buffer de carga 6x (ThermoScientific). La electroforesis se corrió a 75V por 90 minutos.

Al finalizar la electroforesis se tiñó el gel de agarosa durante 2 minutos con Bromuro de Etidio y posteriormente se enjuagó en buffer de corrida con agitación oscilatoria por 20 minutos.

Se escurrió el gel y se coloca en un fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad) para tomar y registrar la imagen del corrimiento electroforético de los productos de PCR y del ADN en el gel.

### 5.17. Purificación de ADN

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de extracción DNALand Scientific con modificaciones al protocolo del fabricante descritas a continuación:

A cada uno de los 100µl de PCR de cada muestra de ADN, se añadieron 0.5ml de buffer GP y se homogenizaron. Las columnas GP fueron colocadas en tubos colectores y se agregaron dentro de éstos la mezcla del paso anterior. Las columnas se centrifugaron por 60 segundos y se descartó el filtrado, a continuación se agregaron a las columnas 0.5ml de buffer WN, se centrifugaron por 60 segundos nuevamente y se descartaron los filtrados. Se agregó a las columnas 0.5ml de buffer WS, se centrifugaron por 60 segundos y se descartaron los filtrados. Las columnas fueron centrifugadas una vez más por 5 minutos para eliminar el etanol residual y se descartaron los filtrados. Las columnas fueron colocadas en un microtubo de 1.5ml nuevo, se dejaron destapadas durante 5 minutos. Se agregaron 10µl de agua grado molecular en el centro de las membranas, se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 14krpm por 2 minutos. Se agregaron nuevamente al centro de las membranas 15µl de agua grado molecular, se dejaron reposar por 5 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad por 2 minutos. Cada uno de los filtrados ~25µl se transfirieron por separado a microtubos de 1.5ml y se almacenaron a -20°C.

### 5.18. Comprobación de amplificación por electroforesis y cuantificación de productos de PCR

Para comprobar la PCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Adicionalmente se determinó la concentración de los productos de PCR en un espectrofotómetro tipo NanoDrop 2000 (ThermoScience) colocando 2 µl de muestra sobre el lector. Se empleó agua grado molecular como blanco. Se procedió a registrar los datos obtenidos.

### 5.19. Secuenciación

Los productos de PCR que mostraron una sola banda en la electroforesis en gel de agarosa y que tuvieron un nivel de pureza aceptable al ser analizado en el NanoDrop, en la relación 260/230 y 260/280, fueron enviados para su secuenciación al Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente se realizó el análisis de las secuencias obtenidas de los productos de la amplificación por PCR de un fragmento del gen ribosomal 16S para la identificación de seis de los aislados microbianos trabajados en la presente investigación Cabe mencionar que el ADN de los aislados A, D y E se degradó y no fue posible obtener un PCR confiable para tales muestras de ADN. Sin embargo, las secuencias obtenidas satisfactoriamente fueron comparadas con las registradas en la base de datos del GeneBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Identificación microbiológica de los aislados microbianos

Se realizó una caracterización de morfología colonial, tinción de Gram y pruebas bioquímicas para cada uno de los aislados microbianos provenientes de suelo de la Laguna Salada, Baja California de acuerdo a Ramírez, et. al. (1998). En la tabla 3 se muestran los resultados de esta caracterización en la presente investigación.

Tabla 3. Morfología colonial y tinción de Gram de los aislados microbianos

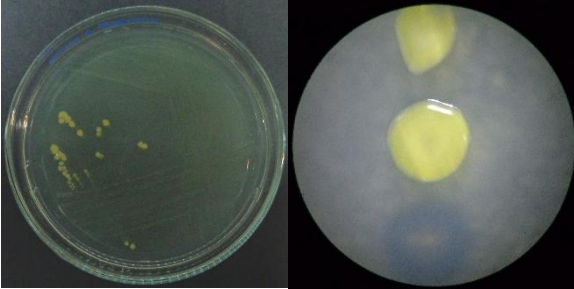
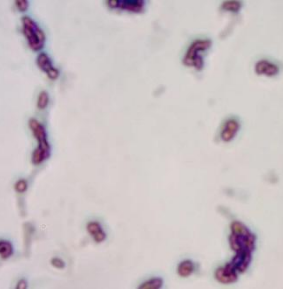
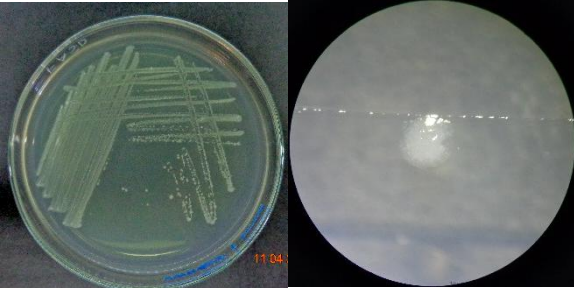
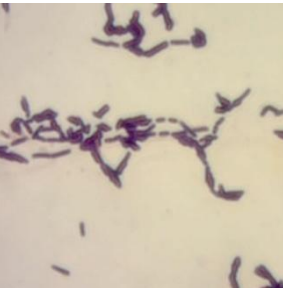
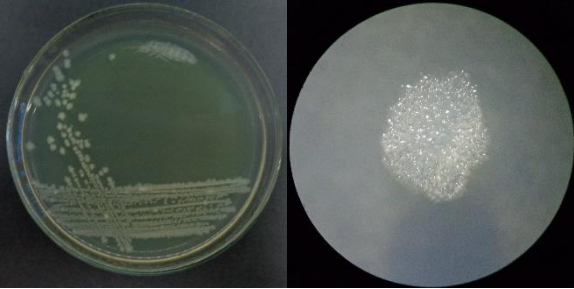
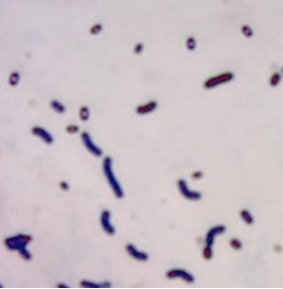
CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA COLONIAL	TINCIÓN GRAM	DESCRIPCIÓN:
A			<b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b> <b>PIGMENTACIÓN:</b> AMARILLO <b>FORMA:</b> PUNTIFORME <b>ELEVACIÓN:</b> CONVEXA <b>BORDE:</b> ENTERO <b>TEXTURA:</b> VISCOSA <b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b> DIPLOCOCOS <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> POSITIVA
B			<b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b> <b>PIGMENTACIÓN:</b> BLANCO <b>FORMA:</b> CIRCULAR <b>ELEVACIÓN:</b> RUGOSA <b>BORDE:</b> ONDULADO <b>TEXTURA:</b> VISCOSA <b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b> ESTREPTOBACIOS <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> POSITIVA
C			<b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b> <b>PIGMENTACIÓN:</b> BEIGE <b>FORMA:</b> CIRCULAR <b>ELEVACIÓN:</b> PLANA <b>BORDE:</b> CRENADO <b>TEXTURA:</b> MEMBRANOSO SECO <b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b> ESTREPTOBACIOS <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> POSITIVA

Tabla 3. Descripción morfológica de los aislados (Continuación).

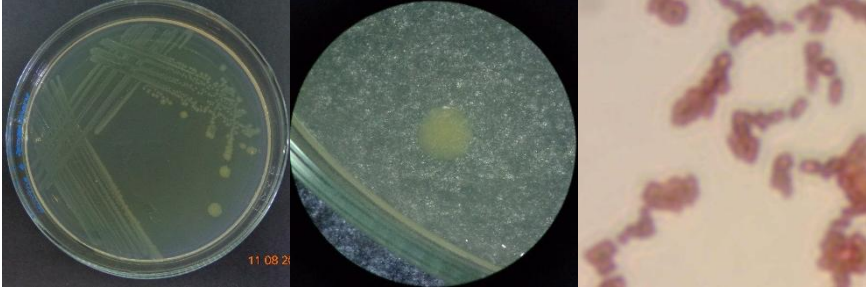

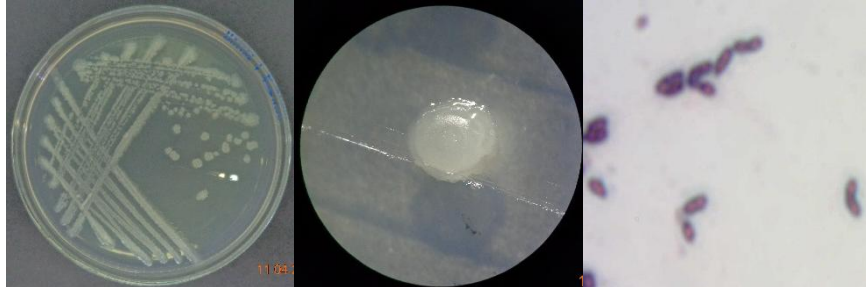
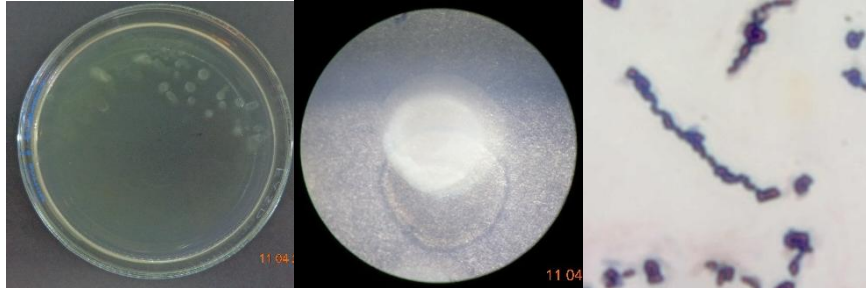

D		<p><b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>PIGMENTACIÓN:</b> AMARILLO CLARO  <b>FORMA:</b> CIRCULAR  <b>ELEVACIÓN:</b> ELEVADA  <b>BORDE:</b> ENTERO  <b>TEXTURA:</b> BUTIROSA</p> <p><b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b></p> <p>ESTAFILOCOCOS  <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> NEGATIVA</p>	
E		<p><b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>PIGMENTACIÓN:</b> AMARILLO CLARO  <b>FORMA:</b> CIRCULAR  <b>ELEVACIÓN:</b> ELEVADA  <b>BORDE:</b> ENTERA  <b>TEXTURA:</b> BUTIROSA</p> <p><b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b></p> <p>COCOS  <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> NEGATIVA</p>	
F		<p><b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>PIGMENTACIÓN:</b> BLANCO  <b>FORMA:</b> CIRCULAR  <b>ELEVACIÓN:</b> UMBOLONADA  <b>BORDE:</b> ONDULADO  <b>TEXTURA:</b> MEMBRANOSA</p> <p><b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b></p> <p>DIPLOBACILOS  <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> POSITIVA</p>	
FL		<p><b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>PIGMENTACIÓN:</b> BLANCO          TRANSLÚCIDO  <b>FORMA:</b> CIRCULAR  <b>ELEVACIÓN:</b> ELEVADA  <b>BORDE:</b> ENTERO  <b>TEXTURA:</b> ACUOSA</p> <p><b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b></p> <p>BACILOS  <b>TINCIÓN DE GRAM:</b> POSITIVA</p>	
CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA COLONIAL	TINCIÓN GRAM	ESTREPTOCOCOS DESCRIPCIÓN:

Tabla 3. Descripción morfológica de los aislados (Continuación).

CÓDIGO DE AISLADO	MORFOLOGÍA COLONIAL	TINCIÓN GRAM	DESCRIPCIÓN:
G			<p><b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA:</b></p> <p><b>PIGMENTACIÓN:</b> BEIGE</p> <p><b>FORMA:</b> RIZOIDE</p> <p><b>ELEVACIÓN:</b> RUGOSA</p> <p><b>BORDE:</b> FILAMENTOSO</p> <p><b>TEXTURA:</b> MEMBRANOSO SECO</p> <p><b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA:</b></p> <p>DIPLOCOCOS</p>

Las imágenes presentadas en la tabla 3 corresponden (de izquierda a derecha) a los cultivos por estría cruzada de los aislados microbianos, colonias de dichos cultivos observadas al el estereoscopio a 32x, y observaciones al microscopio a 1000x de las laminillas con tinciones de Gram de los cultivos.

En la tabla 3 se resume la caracterización morfológica de los aislados microbianos. Puede observarse el crecimiento colonial de dichos aislados, cabe mencionar que ninguno de los aislados microbianos requirió componentes especiales para su crecimiento y se cultivaron en condiciones de aerobiosis a 35.5°C en medio R2A sin suplementos. La tinción diferencial de Gram de los aislados A, B, C, F, FL y G resultó ser Gram positivo y los aislados microbianos E y D Gram negativos. Las observaciones al microscopio de las tinciones de Gram mostraron que los aislados microbianos E, D y G son cocos mientras que los aislados A, B, C, F y FL corresponden a bacilos Gram (+), lo cual es característico del género *Bacillus*.

El aislado F mostró 2 morfologías coloniales distintas al cultivar una alícuota, proveniente de medio MSM glucosa 2%, en medio R2A. Esto nos hizo suponer que se trataba de algún tipo de contaminación, se aislaron por estría cruzada ambos morfotipos, se

crecieron por separado en medio MSM glucosas 2% líquido y se realizó conteo en placa en medio R2A observándose nuevamente los 2 morfotipos coloniales en las placas. Se investigó al respecto especulando podría tratarse de microorganismos simbioses y se designó a uno de los morfotipos como FL y al otro como F. Sin embargo, los resultados de la secuenciación de estos dos aislados mostraron que ambos compartían identidad con *Bacillus atrophaeus*. De acuerdo a reportes del 2009 de Ruiz Sella *et al.*, al germinar las esporas de *B. atrophaeus*, en algunos medios de cultivo, éstas pueden presentar dos morfologías coloniales diferentes. Las morfologías coloniales reportadas para *B. atrophaeus* coinciden con las encontradas en el presente trabajo para los aislados F y FL, por lo que muy probablemente estos dos morfotipos correspondan al mismo microorganismo.

## 6.2. Pruebas Bioquímicas

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a cada uno de los aislados microbianos para caracterizar su actividad metabólica y apoyar su identificación microbiológica. A continuación, se describen dichos resultados para cada uno de los aislados microbianos bajo estudio:

El aislado A, de acuerdo a la prueba con agar de hierro Kligler, tiene la capacidad de fermentar dextrosa y lactosa. En pruebas con agar de hierro y lisina se determinó que es capaz de desaminar lisina y es negativo para la descarboxilación de lisina y la producción de sulfuro de hidrógeno. Este aislado presentó actividad de la enzima ornitina descarboxilasa y no presentó motilidad ni producción de indol en la prueba con el medio MIO. Además, fue capaz de producir la enzima catalasa y resultó positivo en la prueba de producción de desoxirribonucleasa.

El aislado B presentó la capacidad de fermentar sólo dextrosa en la prueba con agar de hierro Kligler. La prueba realizada con agar de hierro y lisina demostró que no es capaz de descarboxilar o desaminar lisina y no produce sulfuro de hidrógeno. Según la prueba realizada con el medio MIO el aislado presenta motilidad, ausencia de la enzima ornitina descarboxilasa y no produce indol. Este aislado resultó positivo a la prueba de catalasa y fue capaz de sintetizar la enzima desoxirribonucleasa.

El aislado C no es fermentó dextrosa ni lactosa según los resultados obtenidos en la prueba con el agar de hierro Kligler. En la prueba con agar de hierro y lisina se encontró que descarboxila lisina y no produjo sulfuro de hidrógeno ni presenta actividad para desaminar lisina. Este aislado no presentó motilidad ni produjo indol y presentó actividad de la enzima ornitina descarboxilasa según los resultados en la prueba con el medio MIO. Además, sintetizó las enzimas catalasa y desoxirribonucleasa.

Tabla 4. Tabla concentrado de resultados de pruebas bioquímicas

**PREUEBAS BIOQUÍMICAS**

	CATALASA	DNASE	FERMENTACIÓN DE DEXTROSA	FERMENTACIÓN DE LACTOSA	PRODUCCIÓN DE GAS	DESCARBOXILACIÓN DE LISINA	DESAMINACIÓN DE LISINA	PRODUCCIÓN DE (H <sub>2</sub> S)	MOTILIDAD	ORNITINA DESCARBOXILASA	INDOL
A	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
C	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
D	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
E	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
FL	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
G	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

El aislado D sólo fermentó dextrosa de acuerdo a las pruebas con agar de hierro Kligler. La prueba de agar de hierro y lisina fue negativa lo que indica que no descarboxila o desamina lisina ni produce sulfuro de hidrógeno. De acuerdo a la prueba con medio MIO, este aislado presentó motilidad, ausencia de la enzima ornitina descarboxilasa y producción de indol. No es productor de desoxirribonucleasa y sintetiza catalasa.

El aislado E presentó, en la prueba de agar de hierro Kligler, la capacidad de fermentar dextrosa y no lactosa. Fue negativo, según las pruebas con agar de hierro y lisina, para la descarboxilación y desaminación de lisina y la producción de sulfuro de hidrógeno. Presenta motilidad y no descarboxiló ornitina ni produjo indol según la prueba de medio MIO. Es productor de la enzima catalasa y no sintetiza desoxirribonucleasa.

El aislado F no fermentó dextrosa o lactosa en la prueba de agar de hierro Kligler. Además, descarboxiló lisina y no desaminó lisina ni produjo sulfuro de hidrógeno según la prueba de agar de hierro y lisina. Este aislado presentó motilidad, producción de indol y sintetizó la enzima ornitina descarboxilasa en la prueba realizada con medio MIO. También produjo las enzimas catalasa y desoxirribonucleasa.

El aislado FL presenta motilidad, producción de indol y sintetiza la enzima ornitina descarboxilasa en la prueba realizada con medio MIO. Es capaz de producir las enzimas catalasa y desoxirribonucleasa.

El aislado G no fermenta dextrosa o lactosa de acuerdo a la prueba de agar de hierro Kligler. Es negativa para la descarboxilación y desaminación de lisina, así como para la producción de sulfuro de hidrógeno. Presenta motilidad y no presenta actividad ornitina descarboxilasa, no producción de indol según la prueba realizada con el medio MIO.

Produjo la enzima catalasa y resultó positivo en la prueba de producción de desoxirribonucleasa.

*Tabla 5. Resultados de prueba de tolerancia a diferentes pH*

Aislado	pH						
	5	7.4	8	9	10	11	
A	-	+	++	+	+	+	
B	+	++	+++	+++	++	++	
C	++	++	++	+++	++	++	
D	+	+	+	+	+	+	
E	+	+	+	+	+	+	
F	+	++	++	++	+	+	
FL	+	+	+	+	+	+	
G	+	+	+	+	+	+	

*(-) Sin crecimiento. (+) Crecimiento menor al presentado en pH neutro. (++) Crecimiento similar al presentado en pH neutro. (+++) Crecimiento mayor al presentado en pH neutro.*

### 6.3. Evaluación de tolerancia de los aislados microbianos a diferentes pH

La tabla 5 muestra los resultados de la prueba de tolerancia de los aislados a diferentes condiciones de pH. El aislado A fue incapaz de crecer en condiciones de acidez y fue tolerante a condiciones de alcalinidad elevadas. Se observa que los aislados B, C, D, E, F, FL y G son capaces de crecer tanto en condiciones de acidez (pH 5) y elevada alcalinidad (pH 11). El crecimiento óptimo de los aislados A, B, C y F se dio a valores de

pH entre 8 y 9, lo cual es consistente con los valores de pH 8.3 y 9.4 presentes en el suelo del que fueron aislados los microorganismos y reportados previamente por el grupo del cuerpo académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental en los trabajos de tesis de López-Arreguín y Sánchez Leyva del 2015. Los aislados D, E, FL y G no presentaron diferencias en el crecimiento a diferentes pH. Esto indica que todos los aislados son microorganismos alcalófilos facultativos o alcalitolerantes por su capacidad de crecer en condiciones de alcalinidad elevada y en condiciones de pH neutro.

*Tabla 6. Resultados de prueba de Halotolerancia*

Aislado	Concentración de Cloruro de Sodio en Porcentaje						
	0	5	9	12	15	18	
A	++	+++	+++	+++	—	—	
B	+++	+++	++	++	+	—	
C	+++	+++	++	++	—	—	
D	++	++	+	+	—	—	
E	+++	++	+	+	—	—	
F	+++	++	++	++	+	—	
FL	+++	++	++	++	+	—	
G	++	+++	++	++	+	—	

*(-) Sin crecimiento. (+) Crecimiento menor al presentado en pH neutro. (++) Crecimiento similar al presentado en pH neutro. (+++) Crecimiento mayor al presentado en pH neutro.*

#### 6.4. Evaluación de halotolerancia de los aislados microbianos

La tabla 6 muestra los resultados de la prueba de halotolerancia a la que fueron sometidos los aislados microbianos. Se observa que los aislados crecieron en medio R2A suplementado con NaCl hasta 15%, pero que no requieren de esta concentración de NaCl para su sobrevivencia. El aislado A mostró un crecimiento óptimo en condiciones de 5, 9 y 12% de NaCl y no creció a concentraciones iguales o mayores a 15% de NaCl. El aislado B presentó un crecimiento óptimo en concentraciones de 0 y 5% de NaCl y creció en medio suplementado con NaCl hasta 15%. El aislado C creció en concentraciones de salinidad de hasta 12% y creció de manera óptimo a 0 y 5% de NaCl. El aislado D mostró crecimiento óptimo a 0 y 5% de NaCl y no sobrevivió en concentraciones de NaCl iguales o mayores a 15%. El aislado E creció óptimamente en condiciones de 0% de NaCl y toleró concentraciones hasta 12% de NaCl. Los aislados F y FL resistieron concentraciones de hasta 15% de NaCl y presentaron un crecimiento óptimo a 0% de NaCl. El aislado G mostró crecimiento óptimo a 5 %de NaCl y resistió hasta 15% de NaCl. Todos estos resultados indican que los ocho aislados microbianos son organismos halotolerantes.

### 6.5. Prueba de índice de emulsificación 24 (IE-24)

Como se observa en la tabla 7, los sobrenadantes obtenidos de los cultivos microbianos A y E, en medio MSM glucosas 2%, no mostraron emulsificación, los sobrenadantes de los

Tabla 7. Evaluación de capacidad emulsificadora

ID	IE 24	ID	IE 24	ID	IE 24
A	0 %	B	29 %	C	43 %
D	11 %	E	0 %	F	49 %
FL	6 %	G	46 %	CONTROL (-)	0 %

(ID) código asignado a cada aislado; (IE24) al índice de emulsificación a las 24 horas.

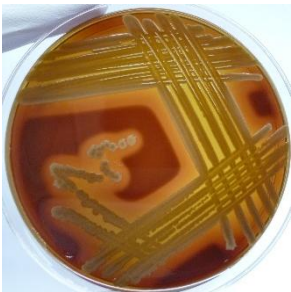

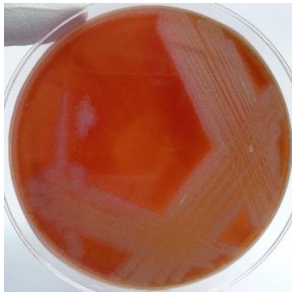





aislados FL, D y B mostraron índices de emulsificación (IE 24) del 6, 11 y 29% respectivamente, mientras que los sobrenadantes de los aislados C, G y F mostraron los mayores valores de IE de 43, 36 y 49% respectivamente. Estos valores representan la

capacidad de los surfactantes producidos por los aislados de formar emulsiones estables entre dos fases inmiscibles, en este caso el sobrenadante libre de células y diesel. Prueba de hemólisis con agar sangre.

#### 6.6. Prueba de hemólisis con agar sangre

Los aislados A, C, G, F y FL mostraron hemólisis tipo alfa al crecerlos sobre agar sangre luego de la incubación a 35.5°C durante 48 horas mientras que los aislados microbianos B, D y E mostraron hemólisis tipo gama bajo las mismas condiciones de incubación (Tabla 8). La hemólisis  $\alpha$  indica la degradación parcial de eritrocitos, la hemólisis  $\beta$  indica la degradación total de eritrocitos y la hemólisis  $\gamma$  indica que los eritrocitos no fueron degradados por el microorganismo. Los biosurfactantes tienen la capacidad de causar la lisis de eritrocitos por lo que esta metodología es útil para la identificación, aunque de forma indirecta de microorganismos productores de biosurfactantes.

Tabla 8. Evaluación de actividad hemolítica de los aislados microbianos

ID	AISLADO	HEMÓLISIS	ID	AISLADO	HEMÓLISIS
A		HEMÓLISIS $\alpha$	E		HEMÓLISIS $\gamma$
B		HEMÓLISIS $\gamma$	F		HEMÓLISIS $\alpha$
C		HEMÓLISIS $\alpha$	FL		HEMÓLISIS $\alpha$
D		HEMÓLISIS $\gamma$	G		HEMÓLISIS $\alpha$

Hemolisis  $\alpha$ : degradación parcial de eritrocitos, Hemolisis  $\beta$ : degradación total de eritrocitos, Hemolisis  $\gamma$ : no degradación

## 6.7. Evaluación de producción de sideróforos por los aislados microbianos

En la tabla 9 se muestra la capacidad de producción de sideróforos de los ocho aislados microbianos en medio CAS-CYE 20%.

Tabla 9. Evaluación de producción de sideróforos de los aislados microbianos

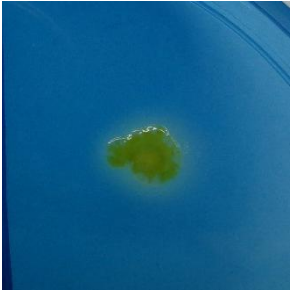
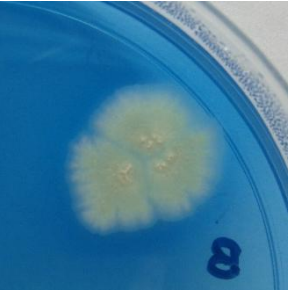





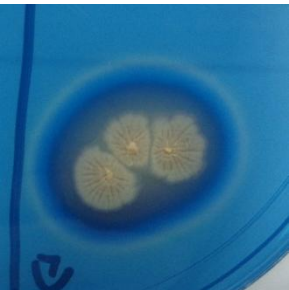
ID	AISLADO	DESCRIPCIÓN DEL HALO OBSERVADO
A		PRESENCIA: SI COLORACIÓN: AMARILLO CLARO ESPESOR: 1 mm TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO
B		PRESENCIA: AUSENTE O NO SIGNIFICATIVO COLORACIÓN: N/A ESPESOR: 0 mm TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: NEGATIVO
C		PRESENCIA: SI COLORACIÓN: AMARILLO CLARO ESPESOR: 3 mm TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO
D		PRESENCIA: SI, AUNQUE DIFUSO COLORACIÓN: AMARILLO CLARO ESPESOR: 1 mm TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO

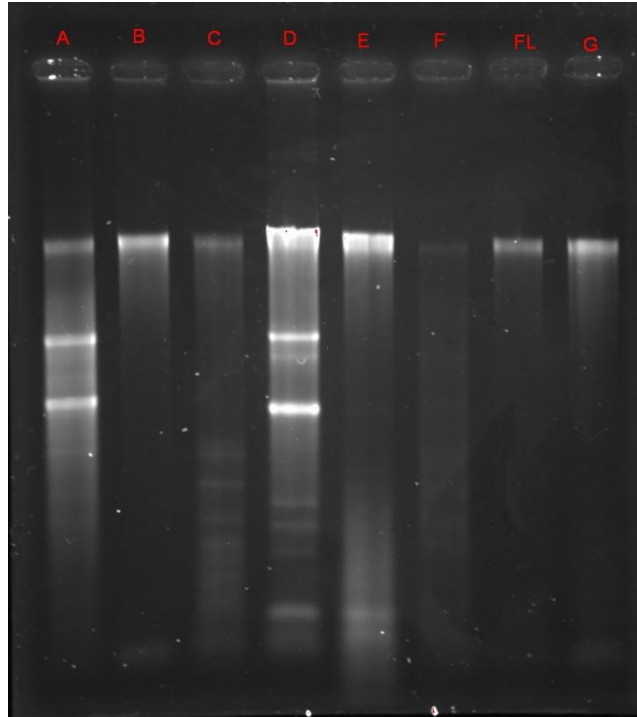
Tabla 9. Evaluación de producción de sideróforos de los aislados microbianos (Continuación).

ID	AISLADO	DESCRIPCIÓN DEL HALO OBSERVADO
E		<p>PRESENCIA: SI, AUNQUE DIFUSO</p> <p>COLORACIÓN: AMARILLO CLARO</p> <p>ESPESOR: 1 mm</p> <p>TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO</p>
F		<p>PRESENCIA: SI</p> <p>COLORACIÓN: AMARILLO CLARO</p> <p>ESPESOR: 2 mm</p> <p>TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO</p>
FL		<p>PRESENCIA: SI</p> <p>COLORACIÓN: AMARILLO CLARO</p> <p>ESPESOR: 2 mm</p> <p>TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CARBOXILATO</p>
G		<p>PRESENCIA: SI</p> <p>COLORACIÓN: PRESENTA TRES COLORACIONES DIFERENTES. DEL CENTRO HACIA AFUERA CAFÉ/MORADO, AZUL INTENSO, AMARILLO CLARO</p> <p>ESPESOR: HALO CAFÉ/MORADO 3mm, AZUL INTENSO 2mm, AMARILLO CLARO 1mm</p> <p>TIPO DE SIDERÓFORO PRODUCIDO: CATECOL Y CARBOXILATO</p>

Se puede observar que 7 de los aislados (A, C, D, E, F, FL y G) presentaron producción de sideróforos por la presencia de un halo alrededor de las colonias microbianas. Para el caso de estos 7 aislados la coloración del halo fue amarilla indicando sideróforos del tipo carboxilato según Pérez- Miranda et al. (2007). La cantidad de sideróforos producido es proporcional a la longitud radial del halo alrededor de la colonia. El aislado B no presentó halo alrededor de la colonia lo cual indica que no sintetiza sideróforos. Los aislados con mayor producción de sideróforos fueron C y G. El aislado G presentó halos de 3 colores diferentes lo que puede indicar la producción de sideróforos no caracterizados para esta prueba o algún otro compuesto capaz de interactuar con el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el medio CAS-CYE-20%.

Se compararon los resultados anteriores con los reportados para las bacterias con secuencias de ADN similares en GeneBank del NCBI y se encontró que de acuerdo a Yu y colaboradores (2011), *B.subtilis* produce un sideróforo catecólico presentado un halo amarillo en la prueba de agar CAS al igual que el aislado "C". Temirov y colaboradores (2003) reportaron la producción de un sideróforo catecólico en *B. licheniformis*, similar al producido por el aislado G en el presente trabajo de tesis. Han y colaboradores (2015) reportaron la producción de sideróforos por cepas de *B. atrophaeus*, del mismo tipo que los producidos por los aislados microbianos F y FL.

## 6.8. Obtención del ADN microbiano



*Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de ADN extraídas de los ocho aislados microbianos (A, B, C, D, E, F, FL y G) bajo estudio.*

Como puede observarse en la figura 4, la calidad e integridad de los ADNs microbianos totales, extraídos con el kit Qiagen DNeasy, son aceptables indicando podían ser empleados en reacciones subsecuentes.

## 6.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los ADN microbianos

Las muestras de ADN del apartado anterior fueron empleadas como templado para PCR. Los productos de amplificación por PCR se indican en la figura 5 y puede observarse la amplificación de una sola banda de aproximadamente 1.5 Kpb. De izquierda a derecha se encuentran: control negativo (sin ADN), producto de PCR amplificados de las muestras de ADN de los aislados microbianos B, C, D; E, F, FL y G respectivamente. El PCR del templado A no se realizó por fallas experimentales con la muestra.

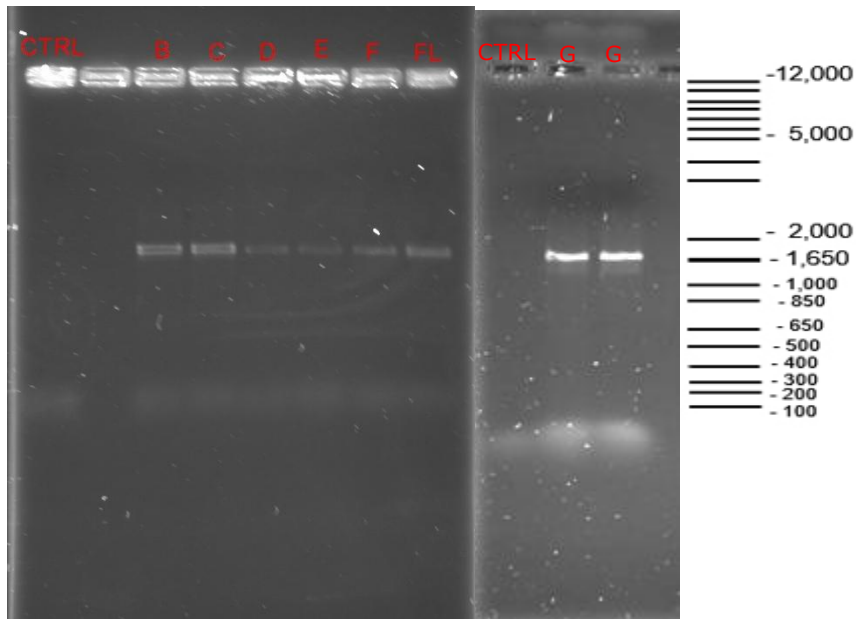


Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados microbianos (B, C, D, E, F, FL y control (-): CTRL).

## 6.10. Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Tabla 10. Concentraciones y grados de pureza de las muestras de ADN de los aislados microbianos.

Aislado microbiano	Concentración de AND (ng/μl)	Absorbancia		Índice de Pureza	
		A260 nm	A280 nm	A (260/280)	A (260/230)
B	19.4	0.389	0.189	2.05	1.83
C	23.8	0.476	0.237	2.01	1.76
D	10.4	0.207	0.084	2.46	1.16
E	9.4	0.188	0.081	2.33	0.32
F	13.6	0.272	0.0138	1.97	1.49
FL	18.8	0.375	0.189	1.99	1.68
G	12.6	0.251	0.128	1.96	1.18

Los productos de PCR fueron purificados con el kit DNALand Scientific. Éstos se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) y se determinó su índice de pureza con base a la relación de absorbancia 260/280 y 260/230 (Tabla 10). De los siete productos de PCR analizados se seleccionaron los correspondientes a los aislados microbianos B, C, F, FL y G para su secuenciación. Los ADN de los aislados D y E absorbieron a 230 nm como se muestra en la tabla 10 y en la figura 6 indicando presencia de etanol por lo que se decidió no secuenciar dichas muestras.

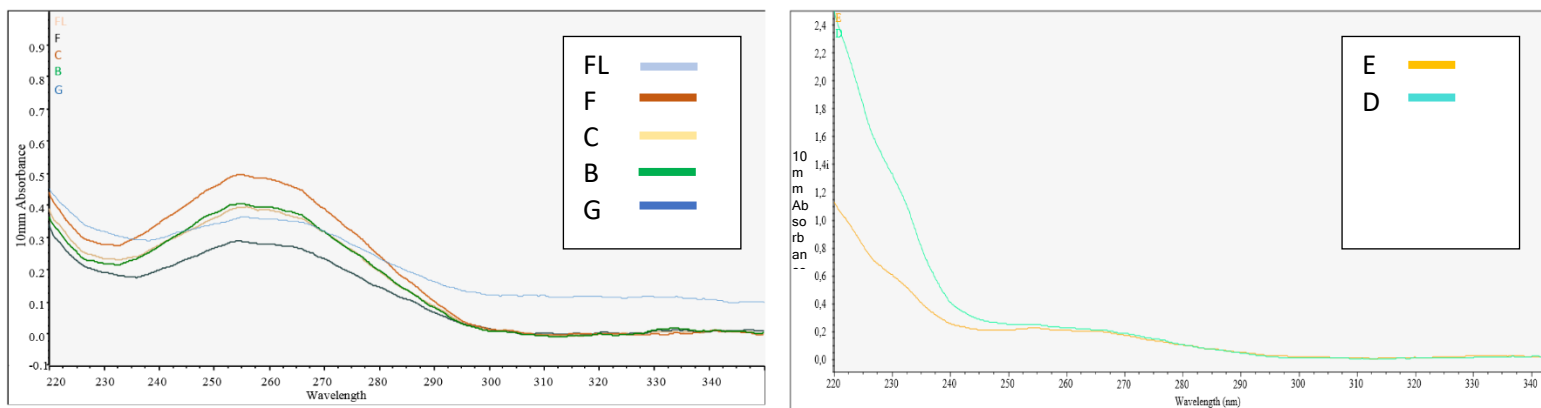


Figura 5. Cuantificación y grado de pureza de las muestras ADN. "Longitud de onda vs. Absorbancia".

## 6.11. Cinéticas de Crecimiento

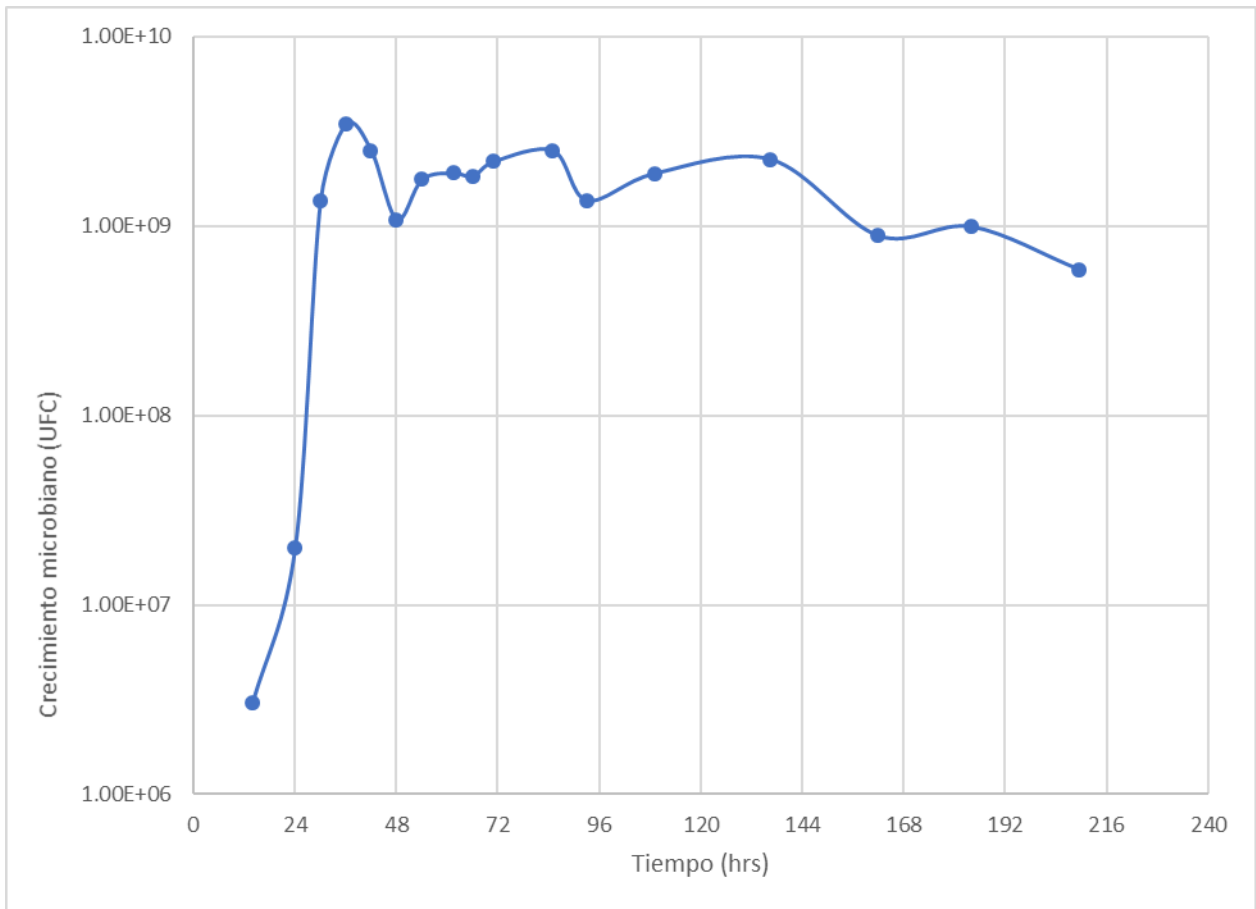


Figura 6 Cinética de crecimiento en horas del aislado microbiano C.

La figura 7 muestra la cinética de crecimiento del aislado C en donde se observan las fases de crecimiento del cultivo microbiano. De 0 a 36 horas, el cultivo presentó la fase de crecimiento exponencial, de 36 a 144 horas el crecimiento estacionario y de 144 horas en adelante la fase de decaimiento. Los aislados A, E y D no crecen bien en medio líquido por lo que no fue posible realizar su cinética de crecimiento.

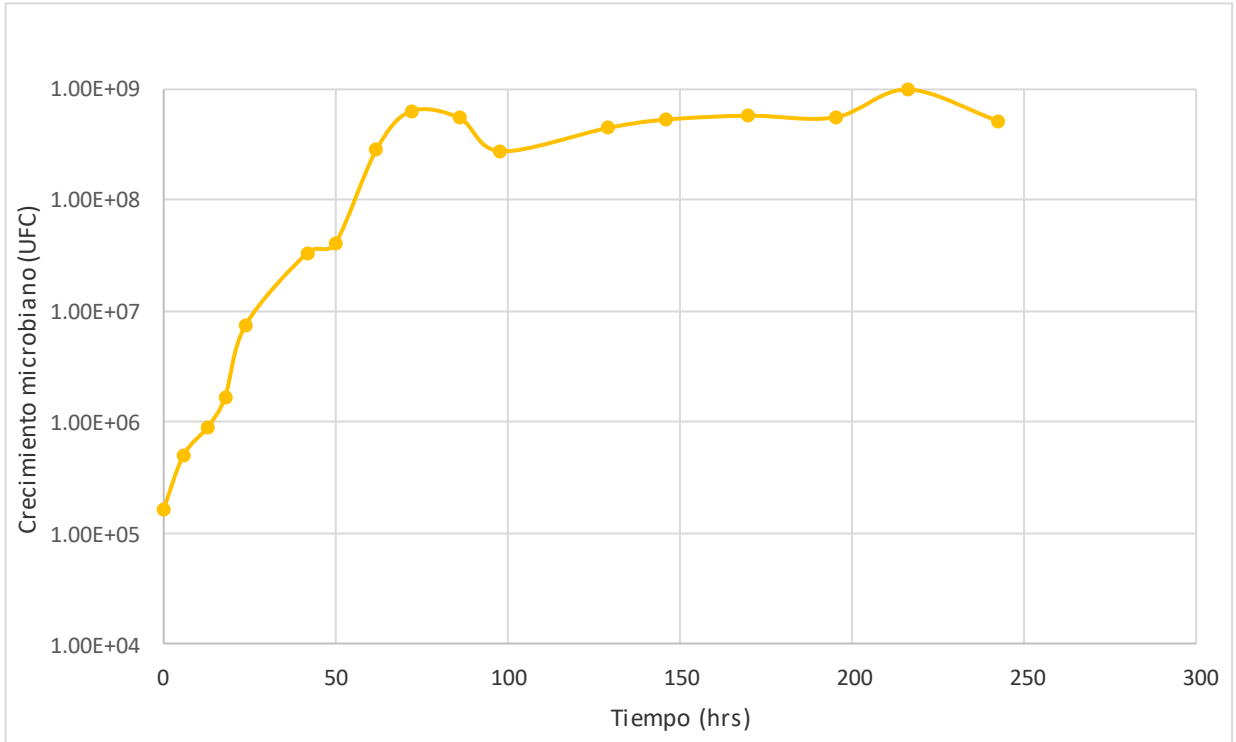


Figura 7 Cinética de crecimiento del aislado microbiano F

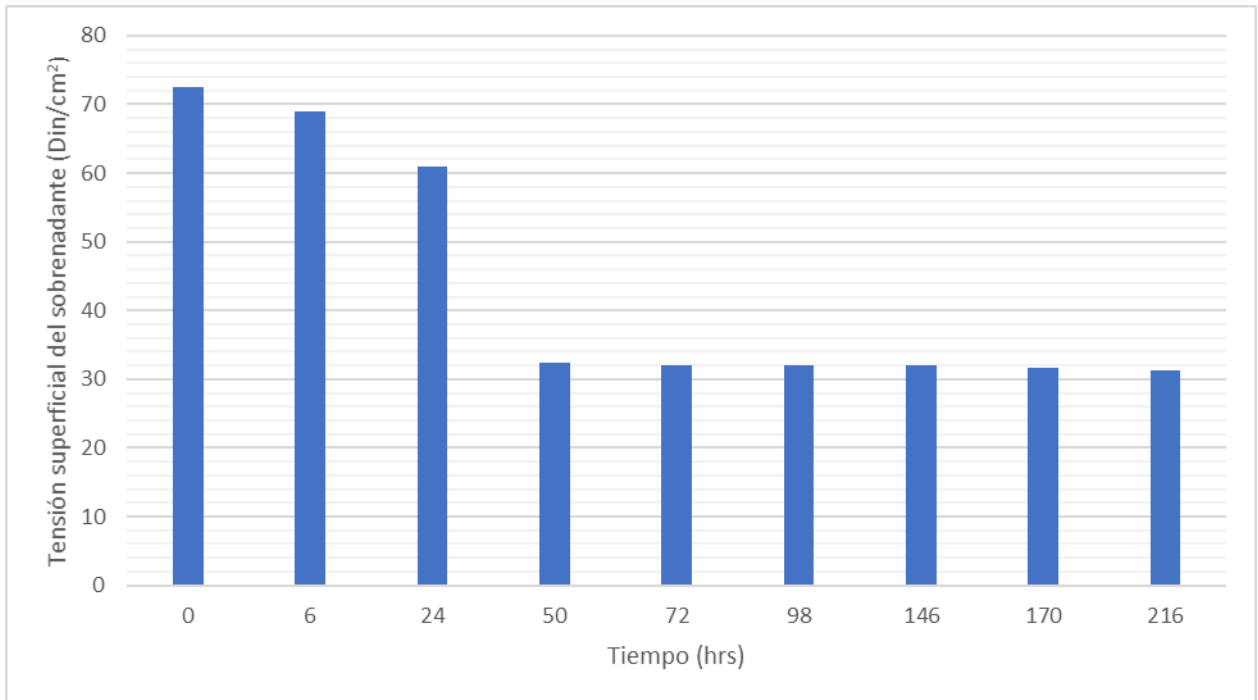


Figura 8 Gráfica tensión superficial con respecto al tiempo del sobrenadante del cultivo del aislado F en medio MSM glucosa 2%.

La figura 8 muestra la cinética de crecimiento del aislado F, donde se observan las diferentes fases de crecimiento. De 0 a 72 horas se presentó el crecimiento exponencial, de 72 a 250 horas la fase estacionaria. La figura 9 muestra los valores de tensión superficial del sobrenadante del cultivo del aislado F en cada fase de crecimiento, se observa cómo la tensión superficial se reduce gradualmente hasta llegar a su valor mínimo en 50 horas y permanece constante lo cual indica que a partir de las 50 horas de cultivo se alcanza la producción máxima de biosurfactante producido por el aislado F.

La figura 10 muestra la cinética de tensión superficial del aislado G. Se observa la fase de crecimiento exponencial de 0 a 72 horas, de ahí hasta 72 horas se encuentra en fase estacionaria. La figura 11 muestra los valores de tensión superficial del sobrenadante en cada fase de crecimiento del aislado G. Se observa cómo la tensión superficial se reduce gradualmente hasta llegar a su valor mínimo  $35.6 \text{ Din/cm}^2$  a las 86 horas de vida del cultivo, a partir de 129 horas se mantuvo un valor promedio de  $50 \text{ Din/cm}^2$  y permanece constante. Esto indica que a las 86 horas de cultivo el aislado G alcanza su máximo de producción de biosurfactante y que luego de este tiempo disminuye un poco el biosurfactante presente en el medio de cultivo, lo cual puede deberse a que el biosurfactante producido podría estar secuestrando algunos micronutrientes presentes en el medio que son integrados a la célula.

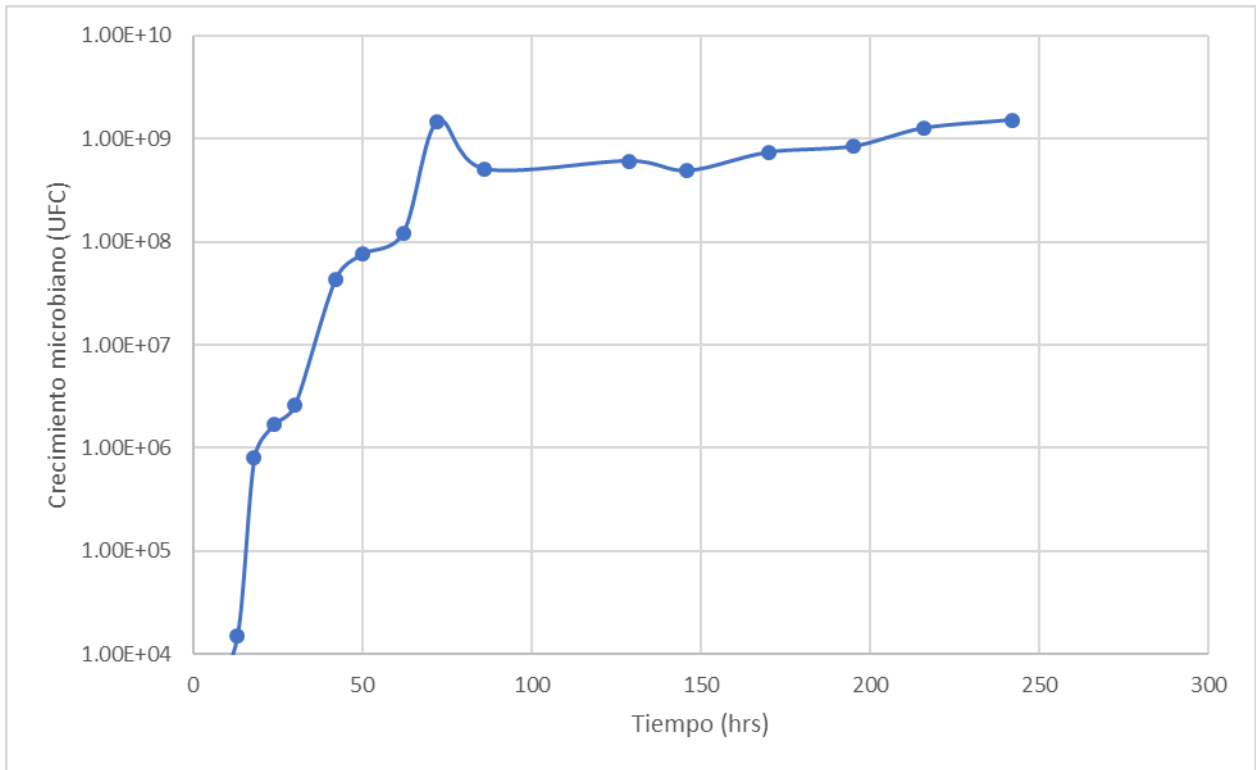


Figura 10 Cinética de crecimiento del aislado microbiano G

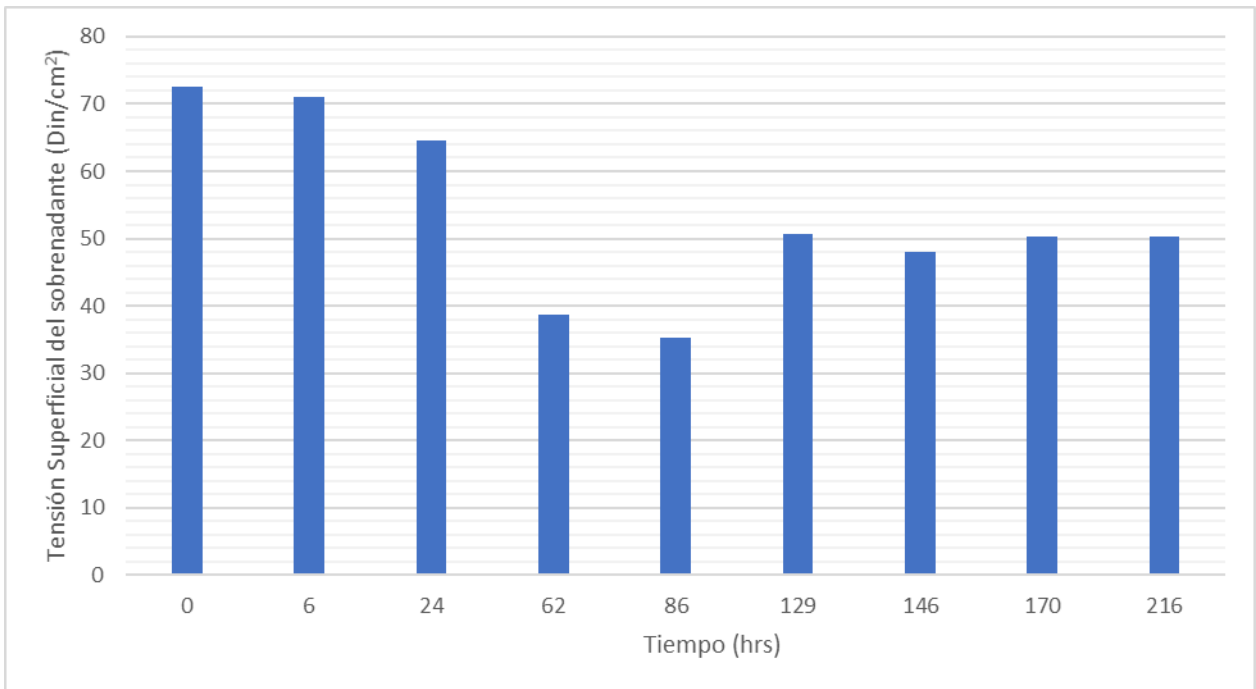


Figura 9. Tensión superficial con respecto al tiempo del sobrenadante del cultivo del aislado G en medio MSM glucosa 2%.

*Tabla 11. Tensión superficial de los sobrenadantes de los distintos aislados a las 48 vs 120 hrs.*

Medición de tensión superficial expresado en unidades de fuerza (Din/cm <sup>2</sup> )		
Aislado	48 hrs	120 hrs
A	67.1	65.2
B	46.3	49.3
C	34.1	34.15
D	71.4	72.3
E	65.1	64.95
F	32.6	31.6
FL	59.6	55
G	38.3	50.8

#### 6.12. Resultados de Medición de tensión superficial

Como se observa en la tabla 11, bajo las condiciones experimentales utilizadas no se obtuvieron valores numéricos de actividad tensoactiva con mucha variación a las 48 y 120hrs de cultivo en medio MSM glucosa 2% de los aislados microbianos. Comparando el valor numérico de la tensión superficial del medio MSM glucosa 2% (71 Din/cm<sup>2</sup>) con el de los sobrenadantes de los cultivos en dicho medio, puede observarse que todos los aislados, en mayor o menor grado, fueron capaces de reducir la tensión superficial del

medio lo cual es una manera indirecta indicativa de producción de algún tipo de biosurfactante. Los aislados microbianos que mostraron mayor reducción de tensión superficial fueron F y C, seguidos por los aislados B y G. Basados en este resultado, se seleccionaron los aislados microbianos antes mencionados para la identificación del género microbiano al que pertenecen mediante secuenciación y análisis de secuencias de un fragmento del gen ribosomal 16S amplificado por PCR.

La efectividad de los biosurfactantes producidos por los aislados C, G, B, F y FL fueron comparados con los reportados para los microorganismos con los que se encontró mayor identidad en la base de datos del GeneBank del NCBI. El aislado C redujo la tensión superficial a 34.1 mN/m, un valor muy cercano al presentado por el microorganismos *B. subtilis*, de 27mN/m (Gudiña, et al, 2013), la secuencia de los aislados G y B identificados como *Bacillus. licheniformis* reducen a 38.3 y 50.6 mN/m respectivamente, mientras que un trabajo previo con *B. Licheniformis* muestra una reducción de la tensión superficial de 36nN/m (El-Sheshtawy, et al., 2015). Se ha reportado que *Bacillus atrophaeus* es capaz de disminuir la tensión superficial hasta 25.82 mN/m (Zhang, et al., 2016) mientras que los aislados F y FL utilizados en el presente trabajo redujeron la tensión a 31.6 y 55 mN/m respectivamente.

### 6.13. Secuenciación

El fragmento del gen rRNA 16S que se logra amplificar con los oligos universales 27F y 1492R es de aproximadamente 1.5 kpb. La metodología empleada para la secuenciación de los fragmentos del gen ribosomal 16S proporcionaron alrededor de 600 bases confiables.

Las secuencias del gen rRNA 16S de cada uno de los aislados secuenciados se analizaron y editaron con el programa Chromas 2.6.4 y las secuencias fueron comparadas

en la base de datos GeneBank del NCBI tanto para el segmento secuenciado con el oligo 27F como para los segmentos secuenciados con el oligo 1492R. En la tabla 12 se muestran los porcentajes de identidad obtenidos por comparación con secuencias reportadas en el GenBank.. Las secuencias del gen ribosomal 16S de los aislados B y G mostraron una identidad del 99% con la secuencia para el mismo gen de *Bacillus Licheniformis*. El segmento del gen ribosomal 16S del ADN del aislado microbiano C mostró identidad con *Bacillus Subtilis del 100%*, mientras que la secuencia de los segmentos de ADN de los aislados F y FL comparten identidad del 99% con *Bacillus atrophaeus* y 100% de identidad con *Bacillus Subtilis*.

Los aislados B y G presentan identidad del 99% con *Bacillus licheniformis* aunque presentan diferente morfología colonial y metabolismo entre sí, es posible que se trate de dos microorganismos genéticamente similares y será necesario alinear y secuenciar el resto del gen rRNA16S para poder identificarlas con mayor certeza.



Tabla 12. Comparación de secuencias obtenidas con la base de datos de GeneBank.

ID	OLIGO	ORIGEN GEN RIBOSOMAL 16S	SCORE	QUERY	%ERROR	% ID
B	27F	<i>Bacillus</i> sp. MN10	1033	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus aerius</i> cepa CJLT 16S	1033	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus licheniformis</i> cepa F198	1024	100%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus licheniformis</i> cepa RPRR12	1365	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus licheniformis</i> cepa SY23	1365	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus</i> sp. cepa 16MFT24	1365	100%	0.0	100%
C	27F	<i>Bacillus subtilis</i> cepa FA26	1404	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus subtilis</i> cepa 51	1404	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus</i> sp. cepa 2N-12	1404	100%	0.0	100%
	1492R	<i>Bacillus subtilis</i> cepa PSTJ-83	1421	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus subtilis</i> cepa WL-11	1421	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus</i> sp. cepa	1421	100%	0.0	100%
F	27F	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1312	86%	0.0	99%
		<i>Bacillus atrophaeus</i> cepa 47(8)il	1312	86%	0.0	99%
		<i>Bacillus atrophaeus</i> cepa ZSR15	1312	86%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa PSTJ-120	1421	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus subtilis</i> cepa PSTJ-83	1421	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus subtilis</i> cepa WL-11	1421	100%	0.0	100%
FL	27F	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1345	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus atrophaeus</i> cepa 47(8)il	1345	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus atrophaeus</i> cepa ZSR15,	1345	100%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus subtilis</i> cepa WL-11	1400	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa CBSYD1	1400	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. inaquosorum cepa V1	1400	100%	0.0	99%
G	27F	<i>Bacillus</i> sp. DV9-56	1142	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus</i> sp. DV9-9	1142	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus licheniformis</i> cepa B12	1138	99%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus</i> sp. cepa HMOS12	1273	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus licheniformis</i> cepa ABTNL 1,	1273	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus</i> sp. cepa N27	1273	100%	0.0	100%

## 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo comprueba la presencia de bacterias del género *Bacillus* alcalitolerantes, acidotolerantes, halotolerantes, termoresistentes y productoras de sustancias de interés biotecnológico como sideróforos y potentes biosurfactantes de la Laguna Salada, Baja California con características similares a las reportadas en microorganismos provenientes de ecosistemas similares. Además, algunas de las bacterias son capaces de fermentar azúcares y sintetizar enzimas como desoxirribonucleasa, catalasa y ornitina descarboxilasa.

La aplicación de estas biomoléculas en la industria requiere una mejora en la producción y calidad de las mismas. En el caso de los biosurfactantes, esto se puede llevar a cabo utilizando diversas fuentes de carbono, aeración y suplementos en el medio de cultivo, ya que se conoce que distintas fuentes de carbono pueden variar la cantidad y tipo de biosurfactantes producidos. Se conoce también que la producción de sideróforos incrementa en presencia de iones  $Mn^{+2}$ , ya que este influye en la activación de genes codificadores.

No todas las cepas de la misma especie producen la misma biomolécula bajo las mismas condiciones, las biomoléculas pueden presentar ligeras diferencias que pueden cambiar significativamente sus propiedades o ser completamente diferentes. Por lo tanto, es necesario caracterizar por medio de espectrometría de masas y espectrometría infrarroja la composición y estructura de la molécula para predecir y evaluar su posible aplicación en la industria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abyaneh, A. S., & Fazaelpoor, M. H. (2015). Evaluation of rhamnolipid (RL) as a biosurfactant for the removal of chromium from aqueous solutions by precipitate flotation. *Journal of Environmental Management*.
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Hegde, S. (2011). Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* sps. on Biodegradation Crude Oil. *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*. Singapore.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 427-444.
- Bosch, S., de Beaurepaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chretien, D., . . . Bach, J.-M. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Nature*.
- Brito, E., Piñón-Castillo, H., & Guyoneaud, R. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 369–378.
- Chen, W.-C., Juang, R.-S., & Wei, Y.-H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 158-169.
- Contreras, J., Martín-Barajas, A., & Herguera, J. C. (14 de 4 de 2005). Subsidence of the Laguna Salada Basin, northeastern Baja California, Mexico, inferred from Milankovitch climatic changes. *Geofísica Internacional*, 103-111. Obtenido de Introducción a los Bioreactores de Membranas: [http://www.fcca.es/static\\_media/file\\_uploads/IntroMBR.pdf](http://www.fcca.es/static_media/file_uploads/IntroMBR.pdf)
- Delbeke, E. I., Lozach, O., Gall, T. L., Berchel, M., Montier, T., Jaffres, P., . . . Stevens, C. (2013). Evaluation on the transfection efficacies quaternary ammonium salts prepared from sophorolipids. *Royal society of chemistry*.

- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J., Banat, & Ibrahim, M. (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid. Sci*, 617-627.
- Gunawan, S., Vorderbruggen, M. A., & Armstrong, C. (2015). *US Patente n° US20150299556 A1*.
- Harris, E. D. (s.f.). *Biochemical facts behind the definition and properties of metabolites*. Texas A&M University. FDA. Obtenido de [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3942b1\\_08\\_Harris%20Paper.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3942b1_08_Harris%20Paper.pdf)
- Hommel, R. K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms . *Biodegradation*, 107-119.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 735-750.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Collins, N. C., & Mwatha, W. E. (1994). Alkaliphiles: Diversity and Identification. En *Bacterial Diversity and Systematics* (págs. 195-230).
- Joshi, A. A., Kanekar, P. P., Kelkar, A. S., Shouche, Y. S., Vani, A. A., Borgave, S. B., & Sarnaik, S. S. (2008). Cultivable Bacterial Diversity of Alkaline Lonar Lake, India. *Micob Ecol*, 163-172.
- Kruijt, M., Ha, T., & Raaijmakers, J. M. (2008). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of Applied Microbiology*.
- Paulino, B. N., Pessoa, M. G., Rodriguez, M. C., Molina, G., Neri-Numa, I., & Pastore, G. M. (2016). Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 10265-10293.
- Perez, K. J., Viana, J. d., Lopes, F. C., Pereira, J. Q., dos Santos, D. M., Oliveira, J. S., . . . Nardi, R. M. (2017). *Bacillus* spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. *Frontiers in Microbiology*.

- Pradham, A. K., Pradhan, N., Mall, G., Panda, H. T., Sulka, L. B., Panda, K. P., & Mishra, B. K. (2013). Application of Lipopeptide Biosurfactant Isolated from a Halophile: *Bacillus tequilensis* CH for Inhibition of Biofilm. *Appl Biochem Biotechnol*, 1362-1375.
- Ramírez D, N., Serrano R., J. A., & Sandoval, H. T. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 56-71.
- Reddy, A. S., Chen, C.-Y., Baker, S. C., Chen, C.-C., Jean, J.-S., Fan, C.-W., . . . Wang, J.-C. (2009). Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent. *Material Letters*, 1227-1230.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 146-167.
- Russel, F., Biribo, S., Selvaraj, G., Oppedisano, F., Warren, S., Seduadua, A., & Mulholland, E. C. (2006). As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 3346-3351.
- Salager, J.-L., & Fernandez, A. (2004). Surfactantes. *Modulo de enseñanza en fenomenos interfaciales*. Universidad de los Andes.
- Schwyn, B., Neilands, & J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 47-56.
- Slepecky, R. A., & Hemphill, H. E. (2006). The Genus *Bacillus*- Nonmedical. *Prokariotes*, 530-562.
- Souza, E. C., Vessoni-Penna, T. C., & de Souza Oliveira, P. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88-94.

- Sponza, T. D., & Gok, O. (2010). Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. *Bioresource Technology*, 914-924.
- Temirov, Y. V., Esikova, T. Z., Kashparov, I. A., Balashova, T. A., Vinokurov, L., & Alakhov, Y. B. (2003). A Catecholic Siderophore Produced by the thermoresistant *Bacillus Licheniformis* VK21 Strain. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 542-549.
- Van Bogaert, I. N., Searens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 23-34.
- Vijaykumar, S. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*.
- Walia, N. K., & Cameotra, S. S. (2015). Lipopeptides: Biosynthesis and Applications. *Microbial & Biochemical Technology*.
- Zion. (2015). *Microbial Biosurfactants Market (Rhamnolipids, Sophorolipids, Mannosylerythritol Lipids (MEL) and Other) for Household Detergents, Industrial & Institutional Cleaners, Personal Care, Oilfield Chemicals, Agricultural Chemicals, Food Processing, Textile and. Zion.*